



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Efectos de la separación materna sobre el consumo de glutamato monosódico y la memoria espacial en ratas macho

Carlos Andrés Sierra Murgeitio

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología
Bogotá, D.C. Colombia
2020

Efectos de la separación materna sobre el consumo de glutamato monosódico y la memoria espacial en ratas macho

Carlos Andrés Sierra Murgeitio

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Fisiología

Directora:
PhD., Zulma Janeth Dueñas Gómez

Línea de Investigación:
Estrés crónico
Grupo de investigación:
Neurobiología y Comportamiento

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología
Bogotá, D.C. Colombia
2020

Everything is theoretically impossible, until it is done.

Robert A Heinlein

Agradecimientos

A Dios por darme fuerza y madurez para lograr este sueño, a mis padres por animarme a persistir. A mi Tía Carlotta Gil de Botero por apoyarme a levantarme en los días soleados y grises. A la Profesora Zulma Dueñas, por modelar nuestras vidas académicas y empoderar nuestras fortalezas. Agradezco a Isabel Cristina Peña Gaviria, compañera y maestra de vida. A todos los jóvenes semilleros del Laboratorio de comportamiento Animal de la Universidad Nacional, por la enorme paciencia y el gusto por lo que hacen. A los chicos del grupo de investigación de neurofisiología comportamental, aquellos que compartieron club de revistas conmigo, quienes fueron mis cómplices, identificados con mis causas y sueños, un millón de gracias por estar presentes en momentos claves, y por darme ánimo. A la facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia junto con su personal, Don Arturo y Camilo, por orientarme de una manera pronta y amable.

Finalmente agradecer a la maestría en fisiología, el departamento y la facultad de medicina por permitirme pasar por la mejor universidad del país.

Resumen

Seres humanos y roedores, como la mayoría de los mamíferos, comparten en las primeras etapas de vida un vínculo dado por la relación madre-hijo, que permite la supervivencia y buen desarrollo del neonato. Se ha demostrado que la disrupción de este vínculo genera efectos negativos en la vida posterior de las crías a corto, mediano y largo plazo, alterando la respuesta neuroendocrina y comportamental. Utilizando un modelo animal de separación materna, se mostró que crías que habían sido separadas de su madre por períodos cortos durante la lactancia, en la adolescencia incrementaban su consumo de edulcorantes y comida altamente palatable. Por su parte el glutamato monosódico (GMS) es un aditivo alimentario ampliamente utilizado para potenciar y mejorar la aceptación los alimentos, además de estar relacionado con neurotoxicidad y consecuencias a largo plazo en modelos animales. El objetivo de este estudio fue determinar si la separación materna durante la lactancia (SMDL) influye en el consumo de glutamato monosódico (GMS) y si estos dos factores producen cambios en el aprendizaje, la memoria espacial y el peso de ratas macho separadas; comparadas con su grupo control. El protocolo de SMDL se realizó a partir del día postnatal 1 al 21 separando las crías 180 minutos en la mañana y 180 en la tarde, durante la fase de oscuridad. El grupo control correspondió a los animales que no se sometieron al protocolo de separación materna y se manipularon únicamente para el cambio respectivo de cama. El día postnatal 30 los animales previamente asignados comenzaron tratamiento con GMS. Se manejaron en total 4 grupos de trabajo distribuidos así: Grupo control: machos sin GMS y sin separación materna (n=7); machos con SMDL y GMS (n=12), machos sin SMDL y con GMS (n=11) y finalmente machos con SMDL y sin GMS (n=10). Durante un mes los grupos con GMS tenían dos botellas con agua, una de ellas con GMS. Se realizaban cambios de la solución cada 1.5 días. Se registró el consumo de GMS cada 24 horas, el peso corporal cada 3 días y al día 60 las ratas fueron expuestas a la prueba del laberinto de Barnes. Se encontró que los animales sometidos al paradigma de SMDL, se generó un aumento de peso corporal cuando se comparó con

sus controles ($p < 0.05$), No se encontraron diferencias en el consumo de la solución que contenía GMS, para ningún grupo evaluado. Adicionalmente en las pruebas aprendizaje y recobro no se encontraron diferencias significativas para los individuos que se expusieron a SMDL. Los resultados indican que el estrés temprano podría estar asociado con cambios importantes en los patrones de ingesta alimentaria y que la adición de GMS únicamente se podría relacionar con cambios en el peso corporal, sin tener efectos en la actividad cognitiva.

Palabras clave: Separación materna, glutamato monosódico, estrés temprano, memoria espacial, laberinto de Barnes.

Abstract

Humans and rodents, like most mammals, share in the early stages of life a bond given by the mother-child relationship, where it has been shown that disruption generates negative effects on the later life of the offspring in the short, medium and long term, altering the neuroendocrine and behavioral response. Monosodium glutamate (MSG) is a food additive widely used to enhance and improve food acceptance, in addition, it has been related to neurotoxicity and long-term consequences in animal models. The objective of this study was to determine if maternal separation during breastfeeding (MSDB) influences the consumption of MSG and whether these two factors produce changes in learning, spatial memory, weight and water intake of separate male rats; compared to their control group. The MSDB protocol was performed from day 1 to 21 of life for a period of 360 minutes daily: 180 in the morning and 180 in the afternoon, during the dark phase. The control group was the animals that did not undergo the maternal separation protocol, nor did they receive GMS. On the postnatal day 30 the animals previously assigned started treatment with MSG. Four work groups were managed: Control group: males without GMS and without maternal separation ($n = 7$): males with MSDB and GMS ($n = 12$), males without MSDB and with MSG ($n = 11$), and finally males with MSDB and without MSG ($n = 10$). During one month, the MSG groups were adjudged two bottles with the same amount of water, one containing the MSG and the other just water, which was changed every 2 days. MSG was given every 24 hours, body

weight was taken every 3 days, and finally at day 60 rats were exposed to the widely valid cognitive task of the Barnes maze. It was found that animals subjected to the MSDB paradigm, an increase in the consumption of MSG, possibly related to an increase in weight found in the same experimental group. Additionally, in the learning and retrieval tests, significant differences were not found for individuals who were exposed to the MSDB paradigm, but tending to perform worse in spatial memory tests when compared to their respective controls. The results indicate that early stress may be associated with changes in eating patterns but not with cognitive effects

Key words: Maternal separation, monosodium glutamate, early stress, spatial memory, Barnes Maze

Contenido

	Pág.
	Resumen V
	Lista de figuras XI
	Introducción 1
1. <u>Pregunta de investigación e hipótesis</u>	3
2. <u>Planteamiento del problema</u>	5
3. <u>Justificación</u>	7
4. <u>Objetivos</u>	9
4.1 <u>Objetivo general</u>	9
4.2 <u>Objetivos específicos</u>	9
5. <u>Marco teórico</u>	11
5.1 <u>Estrés temprano y sus mecanismos</u>	11
5.2 <u>Separación materna durante la lactancia</u>	13
6. <u>Glutamato Monosódico</u>	17
6.1 <u>Bioquímica del GMS</u>	19
6.1.1 <u>Evidencias en animales de experimentación</u>	20
6.1.2 <u>Inducción de obesidad y diabetes en roedores tratados con GMS</u>	20
6.1.3 <u>El GMS induce hepatotoxicidad y estrés oxidativo</u>	21
6.1.4 <u>El GMS como neurotóxina</u>	22
6.1.5 <u>Efectos clínicos en seres humanos</u>	23
6.1.6 <u>Efectos del GMS en el apetito y a ingestión de alimentos</u>	23
6.1.7 <u>GMS y otros tejidos</u>	25
6.2 <u>Separación materna y GMS</u>	25
6.3 <u>Memoria espacial</u>	26
6.4 <u>Memoria espacial y separación materna</u>	27
6.5 <u>Memoria espacial y glutamato monosódico</u>	29
6.6 <u>Laberinto de Barnes</u>	30

6.7 Laberinto de Barnes y separación materna	31
	7. Metodología 33
7.1 Diseño de estudio	33
7.2 Sujetos experimentales	33
7.2.1 Muestra	33
7.2.2 Grupos	34
7.2.3 Variables	35
7.3 Protocolos de intervención	35
7.3.1 Separación Materna Temprana	35
7.4 Agua y comida, manejo de animales destetados y formación de grupos	36
7.4.1 Administración de glutamato monosódico	37
7.4.2 Medición del peso corporal	39
7.5 Instrumentos	39
7.5.1 Laberinto Circular de Barnes	39
7.5.2 Variables Dependientes, medidas en el laberinto de Barnes	41
7.6 Consideraciones éticas	43
7.7 Diseño experimental	434
7.8 Análisis Estadísticos	45
	8. Resultados 47
8.1 Peso corporal	47
8.2 Consumo de GMS y consumo de agua	478
8.3 Prueba de laberinto de Barnes	50
8.3.1 Prueba de laberinto de Barnes	50
8.3.2 Entrenamiento	52
8.3.3 Pruebas por ensayo intergrupales	53
8.3.4 Memoria	54
	9. Discusión 57
9.1 Separación materna, GMS y ganancia de peso corporal	57
9.2 Efecto del GMS sobre el consumo de agua	60
9.3 Efecto de la Separación materna sobre las tareas de memoria y el laberinto de Barnes	62
	10. Conclusiones 67
	Anexos 69
	Bibliografía 115

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Esquema de la activación de los receptores GR, MR y el eje HPA.....	
13	
Figura 2. Mecanismos relacionados con la toxicidad del GMS por múltiples vías de administración.....	
18	
Figura 3. Metabolismo del GMS, y los diferentes transportadores en el enterocito...	
20	
Figura 4. Esquema las medidas del laberinto de Barnes (Medidas aproximadas)...	
31	
Figura 5. Laberinto circular de Barnes.....	
40	
Figura 6. Diseño experimental usado.....	
44	
Figura 7. Ganancia de peso corporal en (gr).....	
47	
Figura 8. Consumo promedio (+SEM) de GMS, medido en gr, considerando la cantidad que se determinó a partir de una dosis de 4mg/gr.....	49
Figura 9. Consumo de agua (ml). Se tomaron en cuenta los volúmenes que se originaron durante el consumo que contenía el GMS.....	
49	
Figura 10. Promedio (\pm SEM) de latencia (segundos) del tiempo de llegada al agujero meta, durante el entrenamiento en todos los grupos.....	
50	

Figura 11. Promedio (\pm SEM) de distancia recorrida (cm) durante el entrenamiento para todos los grupos.....
51

Figura 12. Promedio (\pm SEM) de distancia recorrida, durante el entrenamiento, para todos los grupos.....
51

Figura 13. Prueba de memoria, prueba con caja (PCC). No se observaron diferencias significativas en ningún grupo.....
54

Figura 14. Prueba de memoria, prueba sin caja (PCC). No se observaron diferencias significativas en ningún grupo.....
56

Introducción

La separación materna durante la lactancia (SMDL) es un modelo animal, que permite manipular de manera controlada el vínculo madre-hijo, considerando este como un elemento moderador fundamental en el neurodesarrollo de las crías (Levine 1967, Harlow & cols, 1966). Dicha manipulación permite predecir los efectos nocivos que puede tener la ausencia de la madre, considerando variables como el tiempo y la intensidad. De este modo, los efectos adversos estarían relacionados con niveles tróficos superiores, involucrando los sistemas nervioso y endocrino, lo cual se ve reflejado en la vida posterior al destete, con una marcada tendencia a las alteraciones metabólicas, comportamentales y cognitivas (Levine 1967, Meaney & Plotsky 1993, Meaney & Cols 1996, León Rodríguez & Dueñas Z, 2012, Juruena 2013, Aya Ramos & cols 2017.). Otros efectos vinculados de manera directa con las alteraciones descritas incluyen la sensibilidad aumentada al consumo de sustancias de abuso y la tendencia por la ingestión de alimentos altamente palatables independientemente de su valor nutricional, lo que se vincula de manera general con problemas de obesidad y alteraciones metabólicas (Aya Ramos & Cols 2017). Considerando los hábitos dietarios en nuestro país, se determinó que existe una tendencia marcada a la inclusión de productos comestibles con altas cantidades de aditivos desde edades muy tempranas, siendo la edad escolar la etapa más vulnerable (ENSIN 2015). Estas cifras además se correlacionan a nivel epidemiológico con un incremento en las tasas de la obesidad y sobrepeso en la misma población (ENSIN 2015)

Pese a que se han demostrado los efectos negativos de la separación materna durante la vida neonatal, aun no se cuenta con algún indicio sobre la posible interacción entre este factor y el consumo de GMS (Glutamato monosódico), un aditivo alimentario usado ampliamente a nivel mundial, dadas sus características como mejorador de la palatabilidad y aceptación tanto en alimentos procesados como caseros y al cual

múltiples estudios con resultados polémicos le atribuyen posibles efectos neurotóxicos, así como la tendencia a desencadenar patologías como la diabetes y el síndrome metabólico.(Guidiño & cols 2012, Hata & Cols, 2012).Considerando estos antecedentes, se determinó investigar si existen cambios en los patrones de ingesta del aditivo por parte de ratas Wistar macho, sometidas a separación materna y si dichos elementos pueden tener un efecto negativo en el desarrollo de tareas espaciales, usando para dicho fin la prueba del laberinto de Barnes. Las evidencias recabadas en la literatura describen una relación aparente y constante entre la edad y la susceptibilidad (cuanto menor sea la edad de exposición, mayor posibilidad de efectos negativos) de especie para los efectos deletéreos del aditivo (particularmente roedores), así como la vía de administración. (Guidiño, & cols, 2010, kazmi & cols 2018). Con los resultados obtenidos se espera generar un cuerpo de evidencias que aclaren si estos factores pueden tener una sinergia negativa en el desarrollo de actividades cognitivas, promover cambios en el consumo tanto de la sustancia como de agua y sentar bases para el desarrollo de otros estudios que permitan aclarar las divergencias encontradas en la literatura sobre el papel negativo del consumo crónico de este tipo de aditivos alimentarios y el estrés temprano.

1.Pregunta de investigación e hipótesis

¿Puede la separación materna afectar el consumo oral de GMS en ratas Wistar y promover alteraciones en la realización de tareas de memoria espacial en el laberinto de Barnes e incidir de alguna forma en variables como el peso y el consumo de agua?

Hipótesis

La separación materna incide sobre el consumo de GMS, y el desarrollo de tareas espaciales en el laberinto de Barnes, además de provocar algunos cambios antropométricos como el aumento de peso y el consumo de agua.

2.Planteamiento del problema

Estudios evidencian los efectos negativos de la interrupción del vínculo madre-hijo durante las primeras etapas del desarrollo, lo cual genera alteraciones permanentes sobre la regulación de sistemas tróficos como los neuroendocrinos, metabólicos y comportamentales (León Rodríguez y Dueñas Z 2010, Dueñas Z & Cols., 2014, Corredor L y Dueñas Z, 2014, Caicedo J y Dueñas Z 2015, Aya & Dueñas 2015). De esta forma, el maltrato, el descuido parental y el abuso durante la infancia podrían estar relacionados con la presentación de alteraciones en los patrones de consumo de alimentos, y por lo tanto en la predisposición ante una miriada de consecuencias como la obesidad y enfermedades psiquiátricas (Plotsky & Cols.1998, Maraz PM & cols 2017). Publicaciones científicas ponen de manifiesto que, ante períodos de exposición a estrés neonatal, los mecanismos de regulación hormonal interactúan modificando genes responsables de la ingestión de alimento y el balance energético, alterando de manera importante el fenotipo y el comportamiento alimentario en conjunto con otros factores como los epigenéticos, determinados por el ambiente, y que requieren mayores exploraciones experimentales en entornos como el nuestro (Meaney & cols 2002, Rodriguez y Dueñas 2012, Corredor y Dueñas 2014, Caicedo M y Dueñas 2015, Aya y Dueñas 2015, Aya y cols 2017).

Adicionalmente, en niños la incidencia de sobrepeso y otros trastornos relacionados con la alimentación se han incrementado de manera notoria, pasando de 18,8 % en 2010 a 24,4% en 2015 (ENSIN, 2015). Esta situación se ve relacionada por el uso del tiempo libre, horas frente a dispositivos electrónicos, falta de actividad física y el consumo de alimentos procesados. Así mismo, en la literatura disponible existen evidencias que sugieren el impacto negativo que puede tener el glutamato monosódico (GMS) ingrediente frecuente de alimentos procesados, cuando se consume de manera crónica, cuyos efectos negativos se han demostrado en diversos modelos animales, pero con resultados controversiales y divergentes en estudios humanos (Guidiño & cols 2005, Kazmi y cols 2018).

Como las evidencias permiten apreciar, las alteraciones descritas relacionadas con la separación materna durante la lactancia y la ingestión constante de glutamato en forma de GMS, podrían establecer un efecto sinérgico deletéreo. Sin embargo, hasta la fecha no existen reportes que describan cómo la separación materna afecta el consumo de GMS, considerando que es un aditivo altamente palatable y que por lo tanto tendría la capacidad de modificar la aceptación y el consumo de los alimentos, independientemente de su valor nutricional. Por esta razón y de acuerdo con la bibliografía consultada, se consideró pertinente determinar el impacto de la separación materna y el consumo de GMS sobre la memoria espacial, en un modelo animal, que permita explorar parcialmente si existe o no algún tipo de interacción entre dichos factores, ya sea de manera individual o de efectos aditivos, además de establecer si los mismos tienen influencia en el peso corporal de los animales, el consumo de agua y la ingesta del aditivo.

3. Justificación

La disrupción abrupta o periódica del vínculo madre- hijo se traduce en la generación de individuos vulnerables, con respuestas mal adaptativas ante el estrés y predisposición frente a patologías de diversa índole, donde el impacto de estas se relaciona directamente con el tiempo de exposición al agente estresor (Plotsky & Cols., 1998, Macrí & Cols. 2006, De Kloet 2006, Juruena 2013, Spencer & Deak, 2016). Estos eventos tienen consecuencias tardías que se manifiestan a lo largo de la vida posterior a la lactancia, pero que son difíciles de registrar. Por esta razón, se hace pertinente desarrollar un modelo animal, en donde se exploren cambios relacionados con estos eventos y se hagan correlaciones y descripciones desde diferentes perspectivas. Dichos modelos han permitido obtener extrapolaciones de las experiencias adversas en la infancia del ser humano describiendo consecuencias que podrían explicar parcialmente la alta incidencia de enfermedades crónicas que impactan en la calidad de vida posterior y se traducen en problemas de salud pública.

Datos en Colombia, indican que el promedio de embarazos en jóvenes menores de 17 años es de 1 por cada 5, (DANE 2016), dadas las condiciones sociales y económicas, dichos embarazos usualmente derivarán en una disrupción abrupta y prematura del vínculo madre hijo, partiendo de la necesidad que tendrán las madres para la búsqueda de recursos monetarios, donde se delegaron los cuidados maternos a terceros. La lactancia materna exclusiva se ha descrito como determinante en el desarrollo general del ser humano, y durante los primeros 6 meses de vida es esencial para la ontogenia del sistema nervioso e inmune. Datos recopilados en la ENSIN 2015, para Colombia, muestran que 1 de cada 3 menores de 6 meses, (36.1 %) consumen leche materna como dieta exclusiva, lo cual aún está por debajo del 50%, meta internacional fijada por la OMS. (OMS,1984) De igual modo, la duración total de la lactancia materna registra datos muy por debajo de lo recomendado (14, 8 meses, ENSIN 2010), comparando lo

establecido por la WHO, de 24 meses. El tiempo de lactancia total descrito para nuestra nación escasamente bordea los 14.5 meses totales, considerando como punto de comparación lo estipulado por la OMS: un periodo de 24 meses (OMS, 1984). No es distinto para el caso de la lactancia materna exclusiva donde las cifras describen un periodo promedio de 1,8 meses y lo recomendado por el ente internacional es de 6 meses (ENSIN 2015).

Por otro lado, estas encuestas revelan malos hábitos de consumo de alimentos por parte de la mayoría de la población, considerando que para el 2015, uno de cada cuatro colombianos (24,5 %), consumía comidas rápidas a diario, y uno de cada siete (14.8%) admitió consumir alimentos ultraprocesados con la misma frecuencia. Para la población infantil entre 5 y 12 años, ENSIN 2015 reveló que había un incremento en el tiempo de consumo de televisión y videojuegos, lo que se relaciona con disminución de la actividad física, tendencia al consumo de alimentos procesados y desarrollo de obesidad. Considerando todas las evidencias hasta aquí expuestas, el diseñar un modelo animal de SMDL, donde se evalúe memoria espacial y se realice una intervención adicional con el GMS, permitirá arrojar luces sobre los posibles efectos aditivos que tengan estos factores. Dicha información permitirá realizar estudios más específicos y servirá como antecedente en el diseño de investigaciones en seres humanos, como los niños abandonados y en situación desfavorable, víctimas del conflicto entre otras poblaciones vulnerables. Finalmente, y a largo plazo se espera que los resultados de esta investigación engrosen el cuerpo de evidencias que resalta la importancia de los cuidados de primera infancia, con el fin de implementar estrategias que permitan diseñar políticas públicas donde se mejore el tiempo de permanencia de la madre con el hijo en el periodo de lactancia.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar si en ratas Wistar macho, el estrés crónico inducido por separación materna durante la lactancia (SMDL) incide en el consumo oral de glutamato monosódico (GMS) y en las tareas de aprendizaje y memoria espacial

4.2 Objetivos específicos

- Determinar si la SMDL incide en el consumo oral de GMS, en ratas macho de la cepa Wistar.
- Identificar si la SMDL y el consumo de GMS afectan el desarrollo de tareas de memoria espacial, medidas en la prueba ampliamente validada del laberinto de Barnes.
- Determinar si hay diferencias entre los pesos de los animales que se sometan a SMDL, y si el consumo de GMS tiene alguna influencia en estos cambios.
- Comparar si existen diferencias en cuanto al consumo de GMS entre animales que se sometieron al protocolo de SMDL y su control respectivo.

5. Marco teórico

5.1 Estrés temprano y sus mecanismos

La relación madre e hijo en mamíferos se caracteriza por tener una gran flexibilidad, propiedad que permite a las crías establecer adaptaciones que se ajustan a la variabilidad ambiental (Elkund y Arborelius 2007, León Rodríguez y Dueñas 2012). De este modo, las características de esta relación, como la intensidad y latencia de los comportamientos maternos, permiten hacer una predicción sobre el ambiente futuro y serán uno de los principales modeladores del desarrollo del sistema neuroendocrino y la conducta de esta descendencia. (Bowlby, 1995, Matthews y Robbins 2003, León Rodríguez y Dueñas, 2012). El estrés en etapas tempranas de la vida está asociado con un rango de consecuencias psiquiátricas definidas (Jurueña 2013, Park & Cols 2014).

Evidencias indican que el estrés en etapas tempranas de la vida puede inducir cambios permanentes en la respuesta del eje HPA (hipotálamo-hipofisario-adrenal) para responder ante estímulos estresores en la vida adulta y que dichos mecanismos generan mayor susceptibilidad a ciertos tipos de psicopatologías como la depresión y el síndrome de estrés postraumático (Plotsky & Cols., 1998, Macrí & Cols. 2006, De Kloet 2006, Jurueña 2013, Spencer & Deak, 2016). Una amplia variación en la concentración del cortisol (corticosterona en roedores, CORT, para corticoides en general), ha sido observada entre individuos ante la respuesta frente a un estresor. Esta variabilidad es mucho más marcada que cualquier otra, lo cual no permite distinguir una respuesta ante el estrés de un pulso espontáneo (Plotsky & Cols. 1998). Los glucocorticoides controlan su liberación y síntesis mediante un sistema que incluye un asa de retroalimentación negativa en la hipófisis anterior, hipocampo, hipotálamo y otras estructuras de control central incluyendo la formación reticular mesencefálica (Rosenfeld & Cols.1991, Meaney & Plotsky 1993, Suchecki & Cols.1993, Plotsky & Cols. 1998, Roozendaal 2002). La concentración circulante de CORT, es la mayor influencia para el hipotálamo y la hipófisis

(Meaney & Plotsky 1993, Romeo & Cols. 2003, Aisa 2007, Juruena 2013). Como sistema cerrado, el eje HPA está finamente regulado por la inhibición de la liberación de CORT mediante dos receptores intracelulares: receptores MR y receptores GR (Meaney & Plotsky 1993, Boccia 2001, Aisia 2007, Juruena 2013, Spencer & Deak, 2016). Los receptores MR se caracterizan por tener una distribución limitada al hipocampo y ciertas áreas del hipotálamo y el septum en ratas. Tienen una alta afinidad por los CORT endógenos y se relacionan con respuesta a estrés moderado, además de ser considerados importantes dentro del papel de la regulación del eje HPA, siguiendo patrones de regulación tónica (Spencer & Cols 1998). Por otro lado, los receptores GR están ubicados en una zona anatómica más amplia, encontrándose en la corteza cerebral, sistema límbico y cerebelo. Se relacionan con picos altos de liberación de CORT, como una amenaza, además de su baja afinidad por CORT endógenos. Bajo condiciones basales de CORT, la retroalimentación negativa está mediada por los MR, en el hipocampo, mientras que bajo condiciones de estrés y altas concentraciones de CORT, los GR, menos sensibles en el hipocampo, hipotálamo, e hipófisis entran en juego (Meaney & Plotsky 1993, Meaney & Cols 1996, Juruena 2013.). El balance entre MR y GR es de crucial importancia como punto de equilibrio en la actividad del eje HPA. Spencer & Cols. (1998) y De Kloet & Cols. (2006), demostraron que la activación de GR es necesaria para la retroalimentación del eje HPA, cuando los niveles de glucocorticoides son altos (respuesta al estrés, ritmo circadiano), pero a su vez los MR también constituyen un importante papel por la modulación de los GR. Dado que los CORT son los efectores del sistema HPA, la predictibilidad en su funcionamiento como efectores intracelulares, depende en su totalidad de los factores ambientales que regulen su actividad, además de servir como una señal hormonal utilizada por la totalidad de las células de un organismo (Spencer & Deak, 2016)

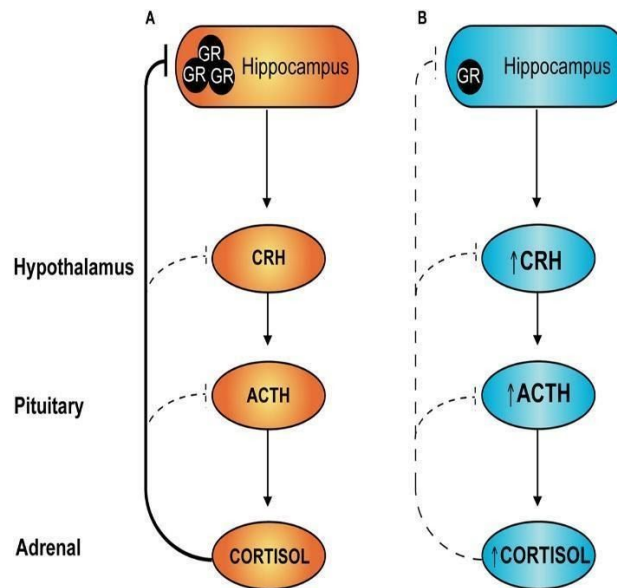


Figura. 1. Esquema de la activación de los receptores GR, MR y el eje HPA

Las líneas punteadas indican un déficit en la retroalimentación negativa. En azul se puede apreciar un esquema de receptores GR con poca expresión hipocampal, comparándose con un eje HPA normal. Al no haber retroalimentación negativa, los niveles basales de CORT, ACTH y CRH se incrementan, dando lugar a una disfunción permanente del eje. Tomado de Cotrell C y Selk R J, Prenatal Stress, Glucocorticoids and the programming of adult disease. 2009, Behavioral Frontiers in neuroscience, Frontiers.

5.2 Separación materna durante la lactancia

Un número importante de evidencias soportadas en la literatura científica dan cuenta del papel imprescindible que tiene la presencia de la madre ante sus crías durante la lactancia, con el fin de evitar la presentación de alteraciones neurológicas y endocrinas irreversibles en la descendencia. La manipulación postnatal ha permitido determinar la diversidad de los efectos asociados al estrés temprano, interviniendo directamente la cantidad o la calidad de la relación madre- infante (Maraz P M & Baram T Z, 2015). En estos procedimientos se altera el tiempo de permanencia de las crías con sus madres y se analiza el impacto que pueda generar esta separación en pruebas posteriores, en las crías a nivel comportamental y neuroendocrino (Meaney & Plostky 1993, Macrí & Cols 2006). Dentro de los protocolos que se pueden encontrar hasta la fecha existe una

variedad considerable abarcando desde algunos minutos, hasta las 24 horas (Levine 1967). Una variedad de procesos fisiológicos es afectada por la presencia de la madre, en las ratas infantas, los cuales incluyen la frecuencia cardiorrespiratoria y diferentes procesos hormonales, que se regulan durante la lactancia (Levine 1967, Levine y Thoman 1969, Rosenfeld & Cols, 1991). Lo anterior es una demostración de ejemplos estimulantes de la presencia de la madre ante las crías, sin embargo, hay al menos una respuesta inhibitoria muy importante: la activación del eje HPA (Meaney & Cols. 1996, Mueller & Bale 2007). En etapas tempranas del desarrollo dicho sistema está profundamente suprimido (Rosenfeld & Cols 1991). En el caso de las ratas, este periodo de nula actividad en relación con el eje HPA está dentro de los 4 a 14 días postnatales, donde los niveles de corticosterona, el principal corticoide en roedores permanece en concentraciones muy bajas, lo que hace que la respuesta ante estímulos que normalmente terminarían en gran producción de esta hormona sea casi nula (Levine & Thoman 1967, Maras P M & Baram T Z 2015). Dicho periodo se conoce con el nombre de periodo hiporresponsivo, o periodo de hiporresponsividad ante el estrés, (SHRP, siglas en inglés) (Levine 1967). Se ha propuesto que el posible mecanismo para esta hiporresponsividad esté relacionado con una supresión exagerada derivada de una retroalimentación negativa que parece conferir una protección contra algún efecto generado por la activación de este eje en etapas del neurodesarrollo (Jurueña 2013, Maras P M & Baram T Z 2015) Otras hipótesis sugieren una posible inmadurez en la inervación del sistema (Jurueña 2013). Maraz PM & Baram T, 2015, describen que la actividad inhibitoria en la expresión de CRH (hormona liberadora de corticotropina) dependiente de glucocorticoides no aparece sino hasta después de la primera semana postnatal, situación que explicaría parcialmente los efectos negativos que tiene el estrés, sobre el neurodesarrollo cuando ocurre dentro de dicha ventana temporal (Maras P M & Baram T Z 2015) Hay evidencias extensas de que la separación materna prolongada lleva a una marcada hiperreactividad adrenal en respuesta a la liberación de ACTH (Meaney y cols 1996, Rosenfeld y cols 1991, Roozendaal 2002, Romeo y cols 2003, Raone 2007). Como en otros procesos bajo regulación materna, los efectos de la separación materna se desarrollan lentamente. De este modo, son necesarias un mínimo de dos horas de separación materna para poder detectar un ligero incremento de

los niveles basales de CORT (corticosterona) y más horas para lograr cambios sustanciales en la actividad del eje HPA. La separación materna induce hiperresposividad a la ACTH junto con otras alteraciones. Una de estas tiene que ver precisamente con el crecimiento neuronal, la supervivencia, formación de conexiones y mielinización en los sistemas nerviosos en desarrollo. (Matthews y Robbins 2003, Mueller y Bale 2007, Aisa 2007). Los mecanismos propuestos para la alteración de la actividad del eje HPA tienen relación con la liberación exagerada de CORT y el daño ocasionado a los receptores de corticoides a nivel celular, situación que se describió anteriormente (Jurueña 2013). Investigaciones a nivel comportamental demostraron un perfil de agresividad en ratones adolescentes expuestos a un paradigma de separación materna. Dichos hallazgos fueron corroborados cuando se realizaron pruebas cognitivas y comportamentales, obteniéndose un patrón de respuesta asociado a ansiedad en el laberinto en cruz elevado. Estudios de electrofisiología en el hipocampo de estos animales mostraron una alteración en el registro para LTP (Long term potentiation, potenciación a largo plazo), en las zonas C3 y las fibras musgosas, siendo esto compatible con una pérdida sináptica importante, explicando parcialmente la disminución en la plasticidad y el desarrollo de patrones de comportamiento agresivo y ansiedad, en los animales que se sometieron a SMDL (Shin & Cols., 2016). Otros efectos asociados a la separación materna incluyen patrones de comportamiento similares al Alzheimer en modelos murinos, junto con sus correspondientes características histológicas como el depósito de placas seniles y la pérdida de neuronas colinérgicas (Hui & Cols 2017). Evidencias descritas por estudios del grupo de neurofisiología comportamental de la Universidad Nacional, demostraron hallazgos importantes en la respuesta al estrés asociada a experiencias adversas tempranas. Riveros & Dueñas (2015) demostraron que la SMDL provocaba cambios basales en las concentraciones plasmáticas de hormonas relacionadas con la respuesta al estrés. ACTH, corticosterona, oxitocina y vasopresina fueron medidas en machos y hembras. Los resultados mostraron concentraciones elevadas para ACTH en los animales adultos de ambos sexos sometidos a SMDL comparados con su respectivo control, así como valores elevados de oxitocina en hembras adultas y vasopresina disminuida en animales separados. Estos resultados demuestran que el estrés temprano al que fueron sometidas las ratas, generó

cambios en las respuestas del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, las cuales variaron según el sexo y la edad. Caicedo-Mera JC & Dueñas Z (2015), diseñaron un estudio con el objetivo de determinar el impacto diferencial del estrés temprano, en tres componentes: celular, animal y en seres humanos. Dichas escalas de comparación permitieron dejar en evidencia no solo los efectos descritos previamente para el estrés temprano, sino que además se pudo determinar la acción que tienen las hormonas esteroides ováricas, con efectos de neuroprotección, para el modelo celular. En cuanto al modelo animal, hallazgos morfológicos postmortem determinaron patrones de cambios relacionados con comportamientos similares a ansiedad en hembras y alteraciones cognitivas en machos, que se correlacionaron con una prueba comportamental de campo abierto. Finalmente, el componente desarrollado en humanos exploró las consecuencias de los antecedentes de adversidad y de dificultades en la consolidación del vínculo madre-hijo durante el primer año de vida, en relación con los patrones de respuesta hormonal frente al estrés psicosocial en niños y niñas diagnosticados con TDAH (trastorno de déficit de atención). Los resultados mostraron un patrón de dimorfismo con prevalencia de una respuesta desadaptativa en el género masculino, dada por una disminución en los niveles de cortisol salival después de la aplicación de un protocolo de estrés; efecto que se asoció también a condiciones de adversidad temprana como la presencia de signos de afecto depresivo materno (Caicedo. J.C & Dueñas Z., 2015).

Por otro lado, el advenimiento de la epigenética ha establecido un cambio importante de paradigma a nivel general sobre el peso de factores como el ambiente y la alimentación en la manifestación de conductas deletéreas asociadas a estrés temprano. Champagne & Meaney (2003), demostraron a través de la evaluación de la conducta materna en forma detallada, cómo esta influye de una manera importante en el desarrollo general de los roedores, y que los patrones de conducta establecidos durante dicho trabajo para el comportamiento materno derivados de alteraciones generadas por marcas en el DNA parecen tener una alta heredabilidad en las hembras de la descendencia, es decir las futuras madres. De igual manera, modificaciones epigenéticas como la metilación del DNA en promotores genómicos y la alteración de la funcionalidad de las histonas, han sido implicadas en la patogénesis de múltiples desórdenes psicológicos. (Tsankova,

Renthal, Kumar, & Nestler, 2007). Sasagawa & cols (2017), describen en un estudio como la SMDL reduce el comportamiento asociado a recompensa en ratones hembra. Tales efectos parecen estar vinculados a una hipermetilación de islas CpG en la región promotora para la expresión de los receptores de dopamina D1, lo que disminuiría la presencia de dicho receptor en las zonas relacionadas con este comportamiento como el núcleo accumbens (NAc) y el área tegmental ventral (VTA). (Sasagawa & cols 2017).

6. Glutamato Monosódico

El Glutamato monosódico (MSG, monosodium glutamate, por sus siglas en inglés, GMS) es una sal del aminoácido no esencial glutamato, que debido a sus propiedades como potenciador de sabor (“umami” por los receptores que ocupa en la lengua de los mamíferos) (Hermanusen y Tresguerres 2002), es utilizado como aditivo en alimentos. Organismos como JECFA (Join Experts Commitee on Food Aditives por sus siglas en inglés), una organización adscrita a la FAO, y otros agentes de carácter internacional que determinan la regulación del uso de alimentos, lo describen como una sustancia segura para el consumo en seres humanos (Jinap, Hajeb, 2010). Sin embargo, estudios en modelos animales han ofrecido resultados controversiales, vinculando al GMS como inductor de obesidad, además de otros impactos a nivel dietario en poblaciones humanas. (Olney & Cols 1969, Olney, 1976, C.W., Nogeira & Cols, 2014). En julio de 2017 la EFSA (European Union Food Safety Authority) estipuló que la dosis segura del compuesto para seres humanos es de 30 mg por kilogramo de peso/día. (EFSA, 2017)

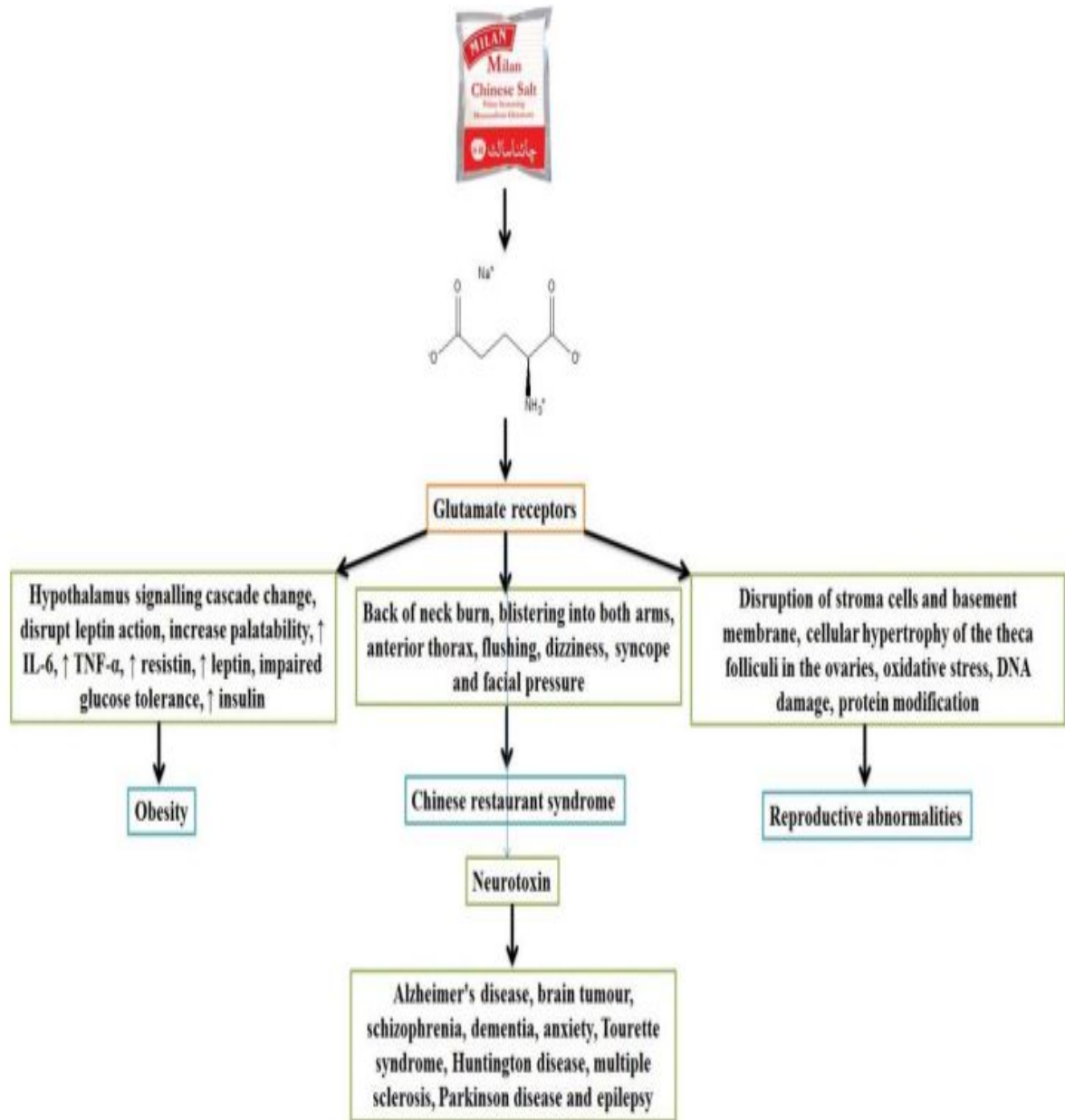


Figura 2. Mecanismos relacionados con la toxicidad del GMS por múltiples vías de administración. Tomado de Al-Azawi, M., Altattan, D., Khamis, S., & Abu Khader, M. (2018). Examining the use of taste enhancers in instant noodles and public perception of monosodium glutamate in Muscat, Oman. *Current Nutrition & Food Science*, 14. doi: 10.2174/1573401314666180820153837

6.1 Bioquímica del GMS

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más abundante en el organismo, cuenta con una variedad de transportadores y receptores distribuidos en toda la economía corporal (Kazmi & cols 2018). Inicialmente en la cavidad oral se une a unos receptores específicos, contenidos en los botones gustativos de la lengua, los mGluR tipo 1 y 4, metabotrópicos y T1R1+T1R3, que también parecen estar involucrados en la sensibilidad hacia sabores dulces, en donde se origina la sensación característica del GMS, su gusto “umami”. En el intestino delgado se llevan a cabo la gran mayoría de reacciones metabólicas de aminoácidos (aá) no esenciales como glutamina, glutamato y aspartamo. En el hígado una gran cantidad de ATP se genera, derivada de la conversión de aminoácidos a glucosa. Estudios en modelos animales y humanos demuestran que el glutamato es extensamente oxidado en el intestino, donde luego es transportado desde la porción apical de los enterocitos, hacia su interior. Los transportadores principales para dicho aá, son el EAAC-1 (transportador para aá's excitatorios tipo 1), GLT-1, y GLAST-1 (transportador de glutamato-aspartato-1). Una vez dentro del enterocito, el catabolismo comienza en la mitocondria y el citosol en un proceso denominado transaminación, mediante la acción de las enzimas aspartato aminotransferasa, alanino aminotransferasa, aminotransferasa de cadena ramificada y enzimas glutamato deshidrogenasas. El α -ketoglutarato es el producto final. Este es transformado a CO_2 donde entra en el ciclo de Krebs, siendo utilizado en diversas reacciones metabólicas, en donde también sirve como sustrato para originar a otros aá (Sharma & cols 2013, Sharma & cols 2015, Kazmi & cols 2017, Al-Azawi & cols 2018).

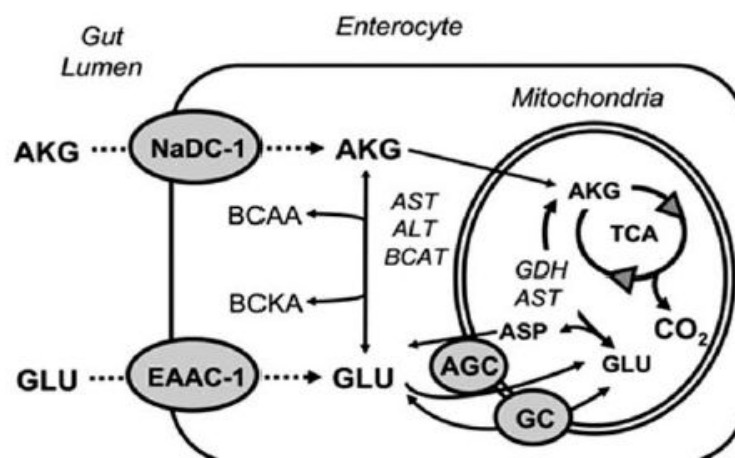


Figura 3. Metabolismo del GMS, y los diferentes transportadores en el enterocito. NaDC-1

Tomado de Kazmi, Z., Fatima, I., Perveen, S. and Malik, S. (2017). Monosodium glutamate: Review on clinical reports. *International Journal of Food Properties*, pp.1-9.

6.1.1 Evidencias en animales de experimentación

El GMS ha sido reportado como tóxico en humanos y animales de experimentación (Kazmi & cols 2018). Los efectos colaterales pueden resumirse como digestivos, metabólicos, respiratorios, circulatorios o nerviosos. Se ha determinado que la administración neonatal en roedores generalmente por vía parenteral genera lesiones en los órganos circunventriculares como el núcleo arcuato (N.A) y el núcleo ventromedial hipotalámico (NVH), lo que da como resultado un incremento en el peso corporal, deposición de la grasa corporal, disminución en la actividad motora y secreción alterada de la hormona de crecimiento (Farombi & Oneyama 2006).

6.1.2 Inducción de obesidad y diabetes en roedores tratados con GMS

La diabetes humana ha sido estudiada extensamente durante varias décadas y actualmente se cuenta con modelos animales. De este tipo de modelos se han reconocido muchas sustancias químicas que inducen el estado diabético. Se ha postulado que el GMS parece ser una sustancia que posee características para inducir la patología, ya que genera un estado de obesidad que podría originar diabetes de manera

indirecta. En un estudio, Nagata y cols 2010 encontraron que ratones machos y hembras que recibieron una inyección neonatal de GMS a dosis de 2 mg /g, desarrollaron glucosuria y otras alteraciones clínicas a las 29 semanas de edad. Dentro de estas alteraciones se describieron hiperglicemia, insulina plasmática elevada y colesterol y triglicéridos aumentados cuando se compararon con sus respectivos controles. A nivel histológico, el páncreas mostraba un patrón de hipertrofia celular en los islotes, lesión compatible con diabetes mellitus (Farombi y Oneyama 2006, Nagata & cols 2010, Tawfik & cols 2012). Otros experimentos llevados en ratas sugieren que una inyección intraperitoneal en animales neonatos durante 5 días también generaba obesidad en ratas hipertensas con mayor frecuencia que cuando eran comparadas con sus controles. Boonnate y cols, 2015, demostraron que el GMS dietario en ratas Wistar macho, afecta de manera importante el parénquima pancreático generando una reducción del número de islotes de Lagerhans, sin llegar a impactar la homeostasis de la glucosa, en tiempos de 1, 6 y 9 meses de exposición (Boonate & cols 2015). Otras evidencias recientes indican la existencia de cambios importantes en la señalización hipotalámica relacionada con el estrés, generación de intolerancia a la glucosa, incremento de citoquinas proinflamatorias, aumento de la producción de la resistina en adipocitos y alteraciones en los niveles plasmáticos de leptina. (Al-Azawi & cols 2017).

6.1.3 El GMS induce hepatotoxicidad y estrés oxidativo

El hígado como órgano principal en la detoxificación y metabolismo, es un blanco principal para los efectos principales y secundarios de sustancias potencialmente tóxicas como el GMS (Farombi y Oneyama 2006, Tawfik, M.S.; Al-Badr, N 2012,). De acuerdo con Oneyama y cols, 2006 la administración en ratas a dosis de 0,6 mg /g durante diez días, generaba signos clínicos de alteraciones hepáticas. Modificaciones significativas en la peroxidación lipídica e incremento en la actividad enzimática (Glutación S transferasa, catalasa y superóxido dismutasa) se pudieron apreciar en el hígado de dichas ratas. En contraste los niveles de glutatión decayeron en escala temporal, dando cuenta de una progresión del daño oxidativo derivado de la actividad de radicales libres. Adicionalmente la administración de GMS incrementa la expresión de enzimas como ALT (alanino-aminotrasferasa), AST (aspartato-aminotrasferasa) y GGT (γ -glutamil

transferasa) y disminuye la concentración de albúmina, proteínas totales y bilirrubina. (Oneyama & cols 2006)

6.1.4 El GMS como neurotóxina

Desde que se ha postulado la acción del glutamato como neurotransmisor se ha determinado que concentraciones excesivas llevan al desarrollo de excitotoxicidad, causando daño neuronal severo y otras complicaciones, como daño tisular extenso y edema cerebral. Investigaciones llevadas a cabo en ratas demostraron que la administración crónica de GMS por vía parenteral generaba una estimulación continua de los receptores de glutamato con la generación de convulsiones y otras alteraciones comportamentales, derivadas de daños en el hipotálamo y órganos circunventriculares como el núcleo arcuato y accumbens. Esta hiperreactividad y daño celular a nivel central estarían regulados por la permeabilidad y madurez de la barrera hematoencefálica, donde a menor edad frente a la exposición al GMS, mayores consecuencias, tanto posteriores como inmediatas. (López-Perez y cols. 2005; Hermanusen y Tresguerres 2002, 2003 y 2006, Gonzales- Burgos & cols. 2009, Urueña y cols. 2009). Urueña y cols. (2009), llevaron a cabo trabajos sobre el efecto de la sustancia en la expresión GABAérgica de la corteza e hipocampo de ratas Wistar, que recibieron dosis supra fisiológicas en edades postnatales tempranas, registrando una disminución en proteínas asociadas a estos circuitos (GAD65, GAD 67, y transportadores asociados a GABA), midiéndose estas cuando los animales tenían 60 días de vida. Considerando la conclusión de los investigadores, pérdidas asociadas a circuitos GABAérgicos en estas estructuras, generarían una disminución en el umbral excitatorio y la capacidad para inducir convulsiones epileptiformes en los sujetos de estudio. Fisiológicamente, los receptores tipo NMDA, permiten la entrada de calcio, generando potenciales de acción sostenidos, necesarios para los procesos de plasticidad sináptica (Rivera-Cervantes & cols. 2009). Urueña y cols 2009, mencionan la activación de la vía molecular p38 MAP kinasa, conllevando una sobreexpresión de receptores ionotrópicos glutamatérgicos (AMPA, NMDA y kainato), junto con la activación de TNF α durante la apoptosis. Sin embargo, la hiperactividad de estos receptores generada por una concentración extracelular mayor de glutamato desencadena un influjo masivo de calcio, superior al habitual en las neuronas,

lo que se traduce en disfuncionalidad y muerte celular. (Gonzales-Burgos & cols, 2009, Rivera-Cervantes 2009).

6.1.5 Efectos clínicos en seres humanos

Estudios en seres humanos han reportado una posible asociación entre la ingesta del compuesto y la presentación de diversos síntomas, que van desde cefaleas, hasta debilidad generalizada, descrito con el nombre de “síndrome de restaurante chino” (Yang y cols., 1997). Sin embargo, los reportes no son consistentes, aunque Yang y cols. (1997), demostraron en un estudio doble ciego una posible correlación entre el consumo de la sustancia y presentación de signos clínicos en personas declaradas como sensibles. Los mecanismos para esta reacción no se conocen, aunque no están relacionados con la alergia típica asociada a Ig E (Yang y cols. 1997). Hermanusen y Tresguerres (2003) proponen que es posible que altos contenidos del aminoácido glutamato, en forma de GMS incluidos en la dieta puedan alterar blancos hipotalámicos para la señalización de la leptina, una hormona involucrada en el metabolismo de los lípidos y asociada a la acción fisiológica de péptidos orexigénicos que modularían los niveles normales de la ingesta. De este modo es posible que se explique la posible asociación entre el consumo de GMS y una tendencia a generar patrones de metabolismo asociados a obesidad y diabetes tipo 2, situación demostrada en modelos animales (Hermanusen y Tresguerres 2003, Hermanusen y Tresguerres 2005). Considerando otras evidencias, un grupo de autores han descrito una posible asociación entre el consumo de altas cantidades de alimentos de consumo masivo, cuya característica es la de contener niveles elevados de lípidos y carbohidratos, conocidos colectivamente como “dieta de cafetería” dentro de la cual es probable encontrar potenciadores de sabor como el aspartamo y el GMS. (Insawang y cols 2011, Jaimes & Cols, 2005, Macedo & cols, 2012).

6.1.6 Efectos del GMS en el apetito y a ingestión de alimentos

Muchos estudios reportan la capacidad que tiene el GMS de aumentar el consumo de alimentos cuando este es añadido a alimentos. Una investigación llevada a cabo con 36 sujetos humanos, donde se les ofreció sopas con y sin la sustancia, demostró una

preferencia por el alimento que contenía el aditivo calificándolo con adjetivos como “delicioso”, “más placentero” y “más satisfactorio” (Kazmi & cols 2017). Otro estudio con 100 hombres franceses donde se ofreció una dieta de sopa y vegetales fue apreciable el consumo de alimentos que contenían el aditivo, aumentando con esto el consumo de otros elementos contenidos en el alimento como calcio, sodio y grasas (Tawfik, M.S, Al-Badr, N 2012). De acuerdo con estos hallazgos es posible que además exista una relación entre el desarrollo de obesidad y el consumo de alimentos con la sustancia. En el caso de modelos animales, la evidencia es abundante, especialmente en modelos murinos (Gonzales-Burgos & cols, 2009, Rivera-Cervantes 2009). Una investigación conducida en Tailandia con 752 individuos sanos, tuvo como objetivo determinar si el consumo de GMS tenía una relación con el desarrollo de la obesidad, se observó una correlación positiva con un incremento en BMI (índice de masa corporal). En aquellos consumidores de GMS se encontró además un incremento en el peso corporal, comparado con las personas no consumidoras, independientemente de la actividad física y el consumo diario de energía. (Insawang y cols 2011)

En otras investigaciones llevadas a cabo durante 5 años no se demostró una relación directa del consumo de GMS y la ganancia de peso (Zumin Shi & cols 2010). Otro estudio conducido en una población tailandesa de 394 sujetos, demostró que el consumo de GMS estaba vinculado a la generación de síndrome metabólico (Insawang & cols 2011). Volviendo a los modelos animales un estudio concluyó que el consumo oral de GMS en ratas gestantes provocaba un bajo peso al nacimiento en sus camadas. Esto deja otra evidencia de que el GMS administrado de forma oral también podría tener repercusiones tóxicas. Se ha reportado daño neuronal, voracidad y alteraciones en las concentraciones sanguíneas de la hormona de crecimiento. Pepino & cols 2010, determinaron en un estudio realizado en mujeres con sobrepeso y mujeres con peso normal, la diferencia entre la respuesta de los receptores umami estimulados por GMS en la lengua y sus umbrales de despolarización. En este caso las mujeres con sobrepeso mostraron umbrales más altos y requerían de mayor cantidad del aditivo para poder lograr una estimulación de los receptores específicos. De esta manera, la evidencia presentada sugiere que el consumo de GMS como aditivo alimentario debería de hacerse

con precaución, y que la presencia de otras sustancias que podrían tener impactos importantes comprobados como lípidos y glúcidos potenciaría aún más la aceptación de la sustancia.

6.1.7 GMS y otros tejidos

De acuerdo con la bibliografía revisada, este aditivo está relacionado además con un incremento en la actividad secretora de las glándulas digestivas en general, durante la fase cefálica de la digestión. (Kondoh & Torii, 2008). Dicha respuesta fisiológica parece estar regulada a su vez por la actividad del sistema parasimpático, representado en el nervio vago, que distribuye aferencias por todas las estructuras descritas. (Kondoh y Torii, 2008). Pizzi y cols. (1977), evaluaron los efectos de la ingesta oral de la sustancia en animales durante la lactancia, sobre el desarrollo sexual, encontrando una atrofia de las glándulas involucradas en el proceso metabólico y reproductivo (tiroides, gónadas de machos y hembras, pituitaria) y una disminución en el tamaño y peso de la camada de las hembras sometidas a reproducción, todo esto relacionado con el consumo temprano del GMS. Recientes hallazgos demostraron que el GMS adicionalmente tiene la capacidad de generar saturación en los sistemas de homeostasis de los radicales libres (Reactive Oxygen Species, ROS, siglas en inglés), interactuando con motores metabólicos y bioquímicos tan importantes como el ciclo de Krebs, en órganos con una alta demanda metabólica como el hígado y riñón en modelos animales. (Sharma y cols. 2014). Este fenómeno explicaría parcialmente los efectos metabólicos a largo plazo, incluyendo la obesidad, hipercolesteremia, dislipidemia y sería otro mecanismo deletéreo a nivel de sistema nervioso central, donde el aporte sanguíneo se ve comprometido por la hipertensión secundaria a las condiciones previamente mencionadas. Cortini y cols 2017, usando ratas y cols 2015, hallazgos muy similares, en cuanto a la exposición crónica del GMS, de la cepa Wistar, demostraron mediante un diseño experimental muy similar al de Sharma considerando la diferencia particular en el uso inicial del aditivo junto con el alimento sólido, además de realizar mediciones relacionadas con marcadores hematológicos de función renal y oxidación hepática en los sujetos sometidos al protocolo establecido (Cortini & cols 2017).

6.2 Separación materna y GSM

Hasta la fecha no se ha encontrado bibliografía sobre la interacción del consumo de GSM y la SMDL, sin embargo; antecedentes con otros aditivos alimentarios, sugieren que eventos como la separación materna parecen favorecer una conducta donde prevalece la predilección por la ingesta de alimentos altamente palatables. (Willner y cols 1987, Park y cols 2014, Aya L y Dueñas 2017). Como se describió anteriormente, modelos de SMDL que involucran la ingestión de dietas ultra procesadas y con grandes concentraciones de calorías y aditivos (“dieta de cafetería”), en roedores han dado cuenta de diversas consecuencias, relacionadas con cambios bioquímicos en neurotransmisores mejorando en cierto modo la disponibilidad de triptófano, datos que pueden ser comparados con estudios a nivel humano donde los niveles de este aminoácido han sido medidos y correlacionados con una mejora en el estado de ánimo de sujetos sometidos a protocolos de estudio (Manian J. y M.J. Morris 2010). Park y cols 2014, demostraron en un experimento llevado a cabo en ratas Sprague Dawley, sometidas a paradigma de separación materna durante la lactancia, las alteraciones que acarrea el consumo de alimentos altamente palatables, donde se ven afectadas las respuestas del eje HPA, y el núcleo accumbens, lo que se traduce en animales con comportamientos similares a la depresión y con altas concentraciones basales de corticosterona. Dichas observaciones se corroboraron al realizar inmunohistoquímica para la proteína c-fos y test de comportamiento con la prueba de nado forzado, donde la movilidad en el agua se encontró reducida (Park y cols 2014). Evidencias encontradas por el grupo de neurofisiología comportamental de la Universidad Nacional de Colombia, sugieren que el estrés crónico generado por la separación materna en ratas Wistar estaría asociado a una tendencia de consumo mayor a sustancias muy palatables, para este caso edulcorantes, con alteraciones en la modulación de la ingesta, y demostrando además déficits cognitivos en la prueba de campo abierto. (Aya-Ramos L, Dueñas Z, 2015). En este trabajo se buscó determinar si el GSM administrado por vía oral a ratas adolescentes puede generar cambios deletéreos basados en la ingestión oral, que serán

medidos en base a la función de la memoria espacial, en la prueba del laberinto de Barnes.

6.3 Memoria espacial

Se define la memoria espacial como el almacenamiento de información que tienen los seres vivos sobre sí mismos y sobre el ambiente que los rodea. (Olton 1977). El propósito de la memoria espacial es la codificación, almacenamiento, reconocimiento y recuperación de información espacial sobre el ambiente y los individuos que se encuentran en él. Como todo proceso relacionado con aprendizaje la memoria espacial también se desarrolla por los mecanismos implícitos que siguen un curso temporal bien delimitado: adquisición de la información, consolidación o establecimiento de la información adquirida recientemente, y por último la recuperación de esta información y aquellas respuestas que demuestran aprendizaje (Vargas, López y cols 2011, Ortiz Montero y cols, 2010, Purves & cols 2018). Cuando la memoria se activa se puede generar un estado de labilidad donde la información adquirida puede ser reforzada (reconsolidada) o extinguida. Cuando se reconsolidada la información, la memoria pasa de un estado lábil a uno permanente y duradero (Vargas-López y cols 2011). Dentro de este contexto, la formación y consolidación de memoria a largo plazo está relacionada con cambios transitorios en la eficiencia neural, junto con modificaciones de larga duración a nivel morfológico y funcional, en varias áreas del cerebro, incluyendo de manera importante el hipocampo, una estructura crucial para el desarrollo de memorias declarativas, y el caso particular de memorias espaciales (Izquierdo y Medina 1997). En efecto, se ha demostrado que pequeñas lesiones en el hipocampo están relacionadas con un deterioro en la memoria espacial. Para medir en general la integridad de la memoria espacial, se han desarrollado en roedores múltiples maneras de evaluarlas, mediante diferentes paradigmas de aprendizaje como lo son el laberinto acuático de Morris, el laberinto de brazos radiales y el laberinto circular de Barnes (Barnes 1979).

6.4 Memoria espacial y separación materna

A pesar de que no se ha medido directamente, la elevación temprana de los niveles de cortisol (corticosterona en roedores), como ocurre después de la exposición a experiencias negativas en edades tempranas, genera una alteración en la ontogenia del hipocampo, lo que se traduce en una disfunción de esta estructura en la respuesta de retroalimentación negativa del eje HPA. Para evaluar el nivel de compromiso de la ontogenia hipocampal, Lajud y cols (2012), desarrollaron un estudio donde se midió la densidad de células granulares en el hipocampo de ratas sometidas a separación temprana durante la lactancia, comparándose a nivel comportamental con la capacidad de respuesta al afrontar situaciones adversas (coping en inglés). Los resultados demostraron una disminución de BrDU un marcador de activación genómica, en la zona subgranular hipocampal, baja densidad celular y un pobre desempeño en la prueba de nado forzado, confirmando la disfunción en la neurogénesis hipocampal sin una alteración importante en la concentración de corticoides circulantes (Lajud y cols.2012). Una posible explicación a este fenómeno corresponde a la interacción de la sobre activación del eje HPA en el periodo hiporesponsivo al estrés, lo que generaría una alteración estructural sobre los receptores de glucocorticoides. El hipocampo es una estructura que contiene gran cantidad de estos receptores, y es particularmente sensible durante estos estados. La exposición crónica al estrés o a los glucocorticoides en la estructura hipocampal genera numerosos cambios documentados, como modificaciones en su neuroquímica, excitabilidad, neurogénesis, citoarquitectura y hasta muerte celular. (Conrad. 2010). Por su parte Baqueri & cols, 2017, diseñaron tareas de memoria espacial en ratas de la cepa Wistar, utilizando dos paradigmas temporales de SMDL, además de medir el comportamiento energético cerebral mediante la cuantificación por inmunohistoquímica (IHC) de la enzima citocromo oxidasa, en las áreas anatómicas que se relacionan con el desarrollo de tareas espaciales. Adicionalmente, las pruebas cognitivas desarrolladas en el laberinto acuático de Morris demostraron que los animales que habían sido separados durante 10 días (MS 10, PND 1-10) mostraron mejor desempeño en el desarrollo de la prueba, comparados con los animales sometidos a

SMDL durante 21 días (MS 21, PND 1-21). Aunque en suma el desempeño de la tarea espacial no se mostró afectada por la SMDL, este estudio evidenció un cambio en los patrones de consumo energético a nivel cerebral, ya que la IHC de la citocromo oxidasa para el grupo MS 10 mostró una actividad más alta que sus pares MS 21. Pese a que se desconocen los mecanismos exactos por los cuales se desencadenan eventos de pérdidas en poblaciones celulares, hallazgos recientes indican que hay vías metabólicas que se han comenzado a proponer como posibles responsables. Una de estas es la autofagia, un proceso de regulación donde se preserva la homeostasis de la celularidad, o se desencadena la apoptosis en situaciones hostiles. La autofagia involucra la remoción de organelas dañadas y agregados de proteínas. Dicho proceso a pesar de generar en ocasiones efectos deletéreos, se ha considerado como fundamental en la regulación celular (Liu & cols 2018). Por otro lado, estos mismos autores, además de documentar en sus estudios la autofagia en áreas relacionadas con la memoria espacial en animales sometidos a SMDL, demostraron también un aumento en la actividad de los receptores glutamatérgicos en diferentes zonas del encéfalo de sujetos sometidos al paradigma. Esta actividad parece estar regulada por la expresión de múltiples proteínas celulares asociadas a microtúbulos, como la beclina 1, mostrando un incremento en la autofagia de zonas como el hipocampo y una disminución en la corteza, alterando de manera importante el recambio celular en dichas áreas. Para realizar valoración cognitiva se utilizó la prueba de campo abierto, laberinto elevado en cruz y prueba de nado forzado, las cuales se usan para medir de manera objetiva comportamientos relacionados con ansiedad en animales sometidos a estrés.

6.5 Memoria espacial y glutamato monosódico

Los efectos centrales del GMS en animales de laboratorio han sido descritos desde el primer reporte de Olney (1969). Se sabe bien desde esa época que la exposición neonatal a la sustancia conlleva alteraciones de varias áreas del sistema nervioso central, entre ellas el giro dentado y otras estructuras hipocampales (Olney, 1976). La literatura disponible describe alteraciones puntuales en áreas periventriculares asociadas a excitotoxicidad en animales jóvenes, así como disfuncionalidad en el eje HPA y el hipotálamo. Urueña y cols (2009), describen la susceptibilidad del hipocampo a pérdidas

neuronales, inducidas por el GMS, cuando se administra por vía parenteral. Gonzales-Burgos & cols, (2009), proponen una relación directa entre la inmadurez de la barrera hematoencefálica y los efectos deletéreos de la molécula. Collison y cols. (2010), demostraron que la combinación de factores dietarios como altas concentraciones de grasas trans y GMS, producen impactos negativos en funciones de memoria, en animales de la cepa C57BL/6J, donde se usó el paradigma del laberinto acuático de Morris para los estudios cognitivos pertinentes. Los efectos negativos exhibidos por los animales sometidos a tratamiento se atribuyeron a la generación de eventos metabólicos que de manera indirecta crearían déficits cognitivos relacionados con dislipidemia y deposición de colesterol, junto con la ya descrita excitotoxicidad generada por la administración del GMS. (Olivera- Cortes y cols 2005, Collison y cols 2010). Dief y cols 2014, utilizaron ratas de la cepa Wistar con 5 semanas de edad, donde se comparó la administración de GMS, vía oral y subcutánea. Esta vez la prueba de medición cognitiva fue el laberinto en cruz, donde los animales tratados, mostraron comportamientos asociados a ansiedad. Los estudios histológicos demostraron una disminución en la expresión de la enzima AMP kinasa, en el área del hipocampo, junto con una expresión aumentada del ligando Fas (como marcador de apoptosis), así como una deposición de β -amiloide, lo que contemplaría un modelo de neurodegeneración muy similar al que se observa en seres humanos con la enfermedad de Alzheimer, como consecuencia de la administración del GMS. Hasta la fecha no parece haber estudios reportados en la literatura científica considerando los efectos del consumo o la administración oral de GMS, y el desarrollo de tareas espaciales en animales de experimentación.

6.6 Laberinto de Barnes

El laberinto de Barnes es un aparato desarrollado con el fin de evaluar la actividad visuo espacial relacionada con aprendizaje y memoria. Este laberinto consiste en una plataforma circular con 18 hoyos, (Barnes 1970) distribuidos eventualmente en el perímetro de dicha circunferencia. Los animales son motivados con luz aversiva y el efecto del espacio abierto, para lograr el estímulo negativo que genere motivación a la búsqueda, y a su vez se utilizan pistas espaciales que permitan generar referencias para

la orientación de los sujetos de estudio, durante una determinada cantidad de tiempo. (Barnes y cols 1980). En estudios para evaluación de memoria espacial se han observado ventajas del uso del laberinto de Barnes, comparado con otros dos aparatos que miden a su vez el aprendizaje y la memoria visoespacial: el laberinto radial de 8 brazos y el laberinto acuático de Morris (Barnes y cols 1980, Lehmann y cols 1999, Kritzer y cols 2007, Mueller y cols 2007). A diferencia del laberinto de 8 brazos, en el laberinto de Barnes no es necesaria una privación de agua o alimento, lo cual hace que el desempeño de los animales sometidos a la prueba no se vea afectado por el hambre o por la sed (Barnes y cols 1980). Adicionalmente, caminar por el laberinto de Barnes puede ser menos desgastante física y psicológicamente, comparado con la actividad que se desarrolla en el laberinto acuático de Morris, evitando ruidos potenciales creados por efectos relativos al aparato. (Rooszendaal y cols 2002, Vargas-López y cols, 2011).

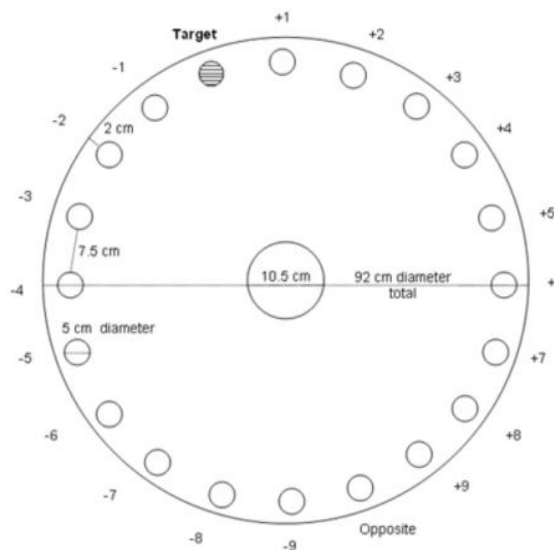


Figura 4. Esquema las medidas del laberinto de Barnes (Medidas aproximadas). El laberinto consiste en una plataforma circular (92 cm de diámetro), elevada a 105 cm del suelo con 18 agujeros a igual distancia, (cada uno con 5 cm de diámetro, a 7,5 cm distancia entre los mismo). Los agujeros se enumeran +1 hasta +9 desde el lado derecho del agujero meta, y desde -1 hasta -9 hacia la izquierda del agujero de meta. Todos los agujeros se encuentran ubicados a 2 cm de distancia del borde del perímetro de la plataforma. Tomado de <http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/349#/figures>.

6.7 Laberinto de Barnes y separación materna

Como se vio anteriormente la memoria espacial se ve afectada con la liberación excesiva de cortisol y su actividad general relacionada con la hiperresposividad del eje HPA. La separación materna es un paradigma que está considerado como una experiencia adversa a temprana edad y que genera alteraciones importantes a nivel cognitivo, emocional y comportamental, más allá de la vida neonatal. Infortunadamente la información relacionada a este tipo de laberinto no es tan extensa, aunque los experimentos llevados a cabo en otras estructuras utilizadas para medir memoria espacial como el laberinto acuático de Morris, demostraron déficits importantes en animales sometidos a separación materna, en relación con marcadores de sinaptogénesis y disfunción en las pruebas de comportamiento (Aisa y cols 2009). Roozeendaal y cols, (2002) determinaron la importancia de la inducción del estrés y la liberación aguda del cortisol, en procesos de consolidación de la memoria, donde se obtuvieron valores negativos asociados a tareas de aprendizaje y medición de memoria sobre el laberinto de Barnes, en los individuos que eran sometidos a estímulos estresores previos al entrenamiento en la plataforma. Trabajos publicados por el grupo de neurofisiología del comportamiento de la Universidad Nacional, revelaron una importante relación entre la pérdida de capacidades cognitivas y la separación materna, representada en el desarrollo de tareas espaciales en el laberinto de Barnes (Ramírez y Dueñas 2009, Corredor V y Dueñas 2014). Ramírez y Dueñas 2009, demostraron una diferencia significativa entre hembras y machos de la cepa Wistar, donde el estrés crónico generado durante la separación materna no afectó el proceso de adquisición y recuperación de las hembras, comparadas con sus pares machos, teniendo estos últimos un peor desempeño en la prueba de memoria espacial. Por su parte Corredor V y Dueñas Z. (2015), describieron además del déficit cognitivo en memoria espacial en ratas macho relacionado con el protocolo de SMDL, pérdidas importantes en marcadores de actividad neuronal como BDNF, y marcadores específicos de astrocitos como GFAP, resultados corroborados por inmunohistoquímica en tejido hipocampal, resultados

estrechamente relacionados con los encontrados en la literatura sobre este tópico (Corredor y Dueñas 2015).

7. Metodología

7.1 Diseño de estudio

- Estudio experimental controlado y aleatorizado. (Zar,1974)
- Se asignaron cuatro grupos, ratas de la cepa Wistar, machos de igual edad.

7.2 Sujetos experimentales

Ratas de la cepa Wistar, recién nacidas obtenidas del bioterio de producción de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. Las ratas se sometieron a un proceso de habituación al ambiente donde se mantuvieron en la fase experimental, al fin de alcanzar una adaptación al ciclo de luz invertido que se usó como parte del presente estudio.

7.2.1 Muestra

Considerando la fórmula para el tamaño de la muestra (en teoría infinita o desconocida) (Reynoso-Robles, Ponce Macotela, Rosas-López, & Ramos-Morales, 2015)

$$n = \frac{Z^2(2) \sigma^2(2*) p*q}{e^2} \quad n = \frac{[1,96]^2 * 0,5 * 0,5}{[0,15]^2} = 43$$

Dónde:

$Z^2 \sigma^2$ = Nivel de confiabilidad

p = es la probabilidad positiva del fenómeno

q = es la probabilidad negativa del fenómeno

e^2 = error de estimación (que para el 95% de confianza es de 0,0025)

Considerando el nivel de confianza del 95%, el tamaño de la muestra incluye a 43 sujetos. Adicionalmente se hizo atención a los principios éticos que le son propios al trabajo con animales de laboratorio, se consideró el principio de las 3R: Reducción, refinamiento y reemplazo; de tal manera que se utilizaron como referencia trabajos previos en el campo de la neurobiología comportamental y aquellos que también estaban relacionados con las modificaciones neuroendocrinas relacionadas con separación materna y estrés temprano. De este modo, Riveros y Dueñas 2016, indican que una muestra entre 8 y 10 unidades experimentales por grupo, con una pérdida experimental del 10%(1 unidad experimental), puede demostrar significancia estadística. Se determinó una muestra de mínimo 8 a 13 sujetos por cada grupo experimental asignado.

7.2.2 Grupos

Los grupos establecidos para este estudio se organizaron como grupo control, y tres grupos sujetos a experimentación en diferentes niveles. La cantidad de animales por jaula, los cuales se ubicaron considerando el grupo experimental al cual pertenecían, se ordenaron en un número promedio de 5. Teniendo en cuenta lo anterior, los animales de estudio se ordenaron así:

1. Animales que estuvieron en paradigma de separación materna durante la lactancia, que serán sometidos al consumo de GMS (SMGMS), partiendo del día 30 al día 65, edad donde aún se considera la pubertad de acuerdo con las curvas de crecimiento relacionadas en la literatura (Guidiño y cols 2003, Hermanussen y Tresguerres 2005, Sharma & cols 2015, Jubaidi & cols ,2019). n=12. Para tener en cuenta, fue necesario hacer correcciones de grupo, en pruebas comportamentales y antropométricas, considerando los individuos que estaban en valores $2 \frac{1}{2}$ SD por encima de la media del grupo (outliers)
2. Animales que se sometieron al paradigma de estrés temprano, pero que no consumirán GMS (SMNGMS), donde se utilizó un protocolo similar al anterior. n=10

3. Animales que no sufrieron separación materna, pero que recibieron GMS (NMSGMS). n=11
4. Animales que no sufrieron separación materna, y que a su vez sólo se sometieron a las pruebas cognitivas en el laberinto de Barnes (CTRL). n=7. Al igual que el primer grupo se corrigieron outliers

Como factor diferenciador en estos grupos, se dispuso de una botella adicional a la que se contaba para el suministro de agua de bebida, donde se ofreció la disolución que contenía el GMS, en los grupos previamente establecidos. Dicha solución se preparó cada 3 días considerando el peso promedio y el consumo que se tenía de la misma.

7.2.3 Variables

Variable	Definición operacional	Unidad de medida
Peso	Cantidad de masa corporal de la unidad experimental, cuantificada por una báscula	Gramos
Consumo de agua	Cantidad de la unidad experimental, cuantificada con un recipiente de laboratorio, como medida estándar utilizada para todas las medidas	Mililitros
Consumo de alimento	Cantidad de alimento consumido, medido en gramos, para un periodo de 24 horas.	Gramos
Desempeño en el laberinto de Barnes, memoria espacial	Variable implícita en el estudio. Comportamental, dependientes de tiempo e instalaciones específicas	Medidas de tiempo segundos procesadas en planillas y estadísticas inferenciales
Separación materna	Variable implícita en el estudio	Variable implícita en el estudio, no aplica
Consumo de GMS	Variable implícita en el estudio, se hizo uso de una balanza analítica de laboratorio cada vez que se calculaba la dosis	Gramos

7.3 Protocolos de intervención

7.3.1 Separación Materna Temprana

Se contó el día del nacimiento de las crías como 0. Desde el día postnatal 1 hasta el día postnatal 21, que es el periodo en el cual se establece la lactancia, se hizo una separación diaria de aproximadamente 360 minutos durante la fase oscura. (Dividida en dos periodos, cada uno de 180 minutos, desde las 7:30 am hasta las 10:30 am y a las 13:30 p.m. hasta las 16:30 pm). El protocolo utilizado fue el siguiente (Ver anexo 1):

- Se tomaron las jaulas de cada uno de los grupos, donde se retiraron una por una las crías que se sometieron a separación materna.
- Dichas crías se trasladaron a otra jaula con acondicionamiento previo, donde tenían una cama de viruta proveniente de la jaula materna, con el fin de evitar rechazos por parte de la madre una vez terminado el tiempo de separación
- Estas jaulas se trasladaron a otra habitación con acondicionamiento de temperatura (30° C), la cual se mantuvo por el uso de un sistema de calefacción portátil, humedad y control de ruidos, donde permanecieron por un periodo de 180 minutos.
- Finalizado dicho periodo de tiempo, se regresaron las jaulas al cuarto original, donde se devolvieron una a una las crías a sus respectivas madres con el fin de continuar su proceso normal de cuidados y alimentación.

7.4 Agua y comida, manejo de animales destetados y formación de grupos

Posterior al protocolo de separación materna, se realizó el destete a los 21 días postnatales, donde a partir del día 22 se hizo la respectiva separación por sexos y grupos de acuerdo con los protocolos experimentales. Para el caso presente se tuvieron en cuenta solo animales machos, como se mencionó anteriormente.

Se establece un periodo de habituación a las condiciones de temperatura ($22C^{\circ} \pm 2C^{\circ}$), humedad y ciclo de luz /oscuridad, (12/12), que comenzó con oscuridad desde las 7 am y luz a las 7 pm. Este ciclo se invirtió debido a las características fisiológicas de la rata Wistar, ya que es un animal nocturno y por motivos de manipulación y tiempo se prefirió manejar en horas del día, cuando se ha establecido el periodo de oscuridad, donde son activas. Se administró agua y comida ad libitum para todos los animales. (Labdiet®-laboratory Rodent diet). Debido a la naturaleza de la prueba del laberinto de Barnes (un día de habituación, 24 horas después, una sesión de entrenamiento, 24 horas después una sesión de recobro y finalmente una sesión de aprendizaje 24 horas después.) La población de madres se anido en tiempos distintos y los animales parentales se acondicionaron en edades diferentes, considerando los factores que se evaluaron en las pruebas comportamentales llevadas a cabo.

7.4.1 Administración de glutamato monosódico

El DPN 30 se definió para comenzar con el protocolo de administración del GMS. Se utilizó para dichos fines, 1 kg de L- glutamato monosódico con una pureza de 99 %, en forma de polvo soluble, de la marca Sigma-Aldrich® (L-MSG, L-monosodium glutamate, Sigma Aldrich, St Louis, M.O USA).Referencias recientes indican que la cantidad de ingesta máxima aceptada por entes europeos (EFSA) es de 30 mg por kilo, en el caso de los seres humanos. Sin embargo, se tomó como base una dosis de 4mg/g de peso vivo, reportada con frecuencia en la literatura disponible (intervalo entre 2 a 10 mg/g) (Abu-Taweel & cols 2014, Jubaidi & cols 2019) Se consideró dicha dosis, ya que parece ser la más reportada por parte de investigadores, sin llegar a generar incomodidad o disminución de la aceptación del aditivo. Para establecer entonces la cantidad de GMS por animal se determinaron los siguientes pasos:

1. Se pesaron todos los animales, incluidos aquellos que fueron sometidos al protocolo de experimentación con GMS. (Digital Scale OMRON 400®)
2. Dado que los animales estaban asignados en grupos considerando la edad y el grupo experimental como parámetros de agrupación, se tomaron todos los pesos de los

mismos y por cada caja (grupo experimental), se hizo un promedio de peso, con el cual se realizó el cálculo del compuesto a administrar en solución acuosa (GMS), expresado en gramos (g).

3. Se administró una dosis de 4 mg de GMS, por gramo de peso vivo.
4. Considerando lo anterior la fórmula que se manejó para calcular la dosis en gramos de GMS para administración oral en disolución acuosa estará expresada así:

$$\bar{X} \text{ peso grupo experimental} \cdot \text{dosis de GMS expresada en gramos} \cdot (n \text{ grupo experimental}) \\ = \text{Dosis GMS para disolución expresada en gramos.}$$

Dónde: $\bar{X} \text{ peso grupo experimental}$ = Peso promedio de cada grupo experimental
(por tratamiento)

$(n \text{ grupo experimental})$ = Número de individuos por cada grupo experimental

5. Se determinó la cantidad de agua consumida, durante los 3 días anteriores al comienzo del experimento. Se consideró un valor promedio, tomando en cuenta la medida de estos tres días, con la que se determinó el volumen sobre el cual se hizo la disolución de GMS. Dicha medida se hizo teniendo en cuenta que el aforo para bebederos es de 500 ml y que estos recipientes tenían marcas de volumen sobre su superficie expresadas en ml, que se utilizaron para registrar el volumen consumido de agua. Adicionalmente se hizo una comparación de volumen con un vaso de precipitado (beaker) en el laboratorio de fisiología. Esta medida se hizo por cada caja o jaula, teniendo en cuenta el consumo determinado para el grupo, dando origen a un valor donde se pudo estimar el consumo de cada animal, dividiendo el número de ml consumidos sobre el promedio de peso de los animales en cada jaula.

De acuerdo con los datos expresados en la primera fórmula se hará un aforo para preparar la solución en el volumen completo de agua que presentan los bebederos.

Para este caso:

$$\frac{\text{Dosis GMS para disolución} \times \text{volumen de agua del bebedero}}{\text{volumen de consumo de agua del grupo experimental}}$$

6. Se preparó la solución considerando que el consumo de GMS para cada animal fuese cercano a los 4 mg / g P.V, ofreciéndose con el fin de que el animal consumiera la solución a voluntad. Se ofreció a su vez un bebedero con agua sin aditivo.

Se tomaron medidas de peso por lo menos dos veces a la semana con el fin de mantener la dosis y se modificó la cantidad en gramos de acuerdo con la variación de los pesos registrados en los sujetos de estudio con el fin de mantener la dosis cercana a los 4 mg/g de peso vivo. Los animales tuvieron buena aceptación de la solución y no se vio la necesidad de administrar el aditivo de manera forzada.

7.4.2 Medición del peso corporal

A partir del día postnatal 22, después de la asignación de los animales en los distintos grupos experimentales, se realizó la primera medición de peso, con el fin de tener una medida básica para referencia. Como se describió en el apartado anterior la medición se determinó además como un elemento primordial para establecer la metrología y dosificación del GMS en vehículo acuoso. La medición del peso, para todos los animales se repitió dos veces por semana, en promedio cada 3 días, de manera que se tuviera un registro en los cambios de esta variable, durante el desarrollo del protocolo experimental del GMS, es decir durante 30 días (DPN 60), y también en el cambio de cada fase experimental, en el desarrollo de la tarea espacial del laberinto de Barnes.

7.5 Instrumentos

7.5.1 Laberinto Circular de Barnes

La evaluación del aprendizaje espacial se llevó a cabo usando el Laberinto Circular de Barnes (Barnes, C., 1979) (Anexo 1). Este laberinto está conformado por una plataforma circular de acrílico negro de 122 cm de diámetro, elevada a 80 cm del suelo, y apoyada

en un pilar central. En la periferia de la plataforma se encuentran un total de dieciocho agujeros circulares, ubicados de forma regular, con una separación de 20°; cada agujero mide 9,5 cm de diámetro y su centro se encuentra ubicado a 10 cm del margen de la plataforma. La caja de escape o caja meta (24 cm de largo x 8,75 cm de ancho x 10 cm de alto) puede emplazarse bajo cualquiera de los dieciocho agujeros. La caja de salida (elaborada en acrílico blanco, 17 cm de diámetro x 15 cm de alto), ubicada en el centro de la plataforma, es la que da lugar al comienzo de la exploración por parte del animal después de que ha permanecido durante treinta segundos, bajo la misma. En el momento en que la caja de salida es levantada utilizando un sistema de poleas, en la cabina experimental se enciende una luz intensa (508 lx) que se acompaña de un ruido blanco (90 decibeles).

En la sala experimental, en tres de las paredes se ubican estímulos visuales de color negro, contrastando con el fondo blanco de la habitación; éstas son las claves espaciales extra laberínticas que sirven como pistas espaciales para orientar el aprendizaje de la tarea (Figura 5).

Un circuito cerrado de televisión permitió el registro de las sesiones experimentales las cuales se grabaron empleando un grabador de DVD, para ser analizadas posteriormente. El registro comportamental se llevó a cabo haciendo uso del programa X-Plo-Rat 2005 1.1.0., desarrollado en el Laboratorio de Comportamiento Exploratorio de la Universidad de Sao Paulo (Cárdenas y cols 2005).

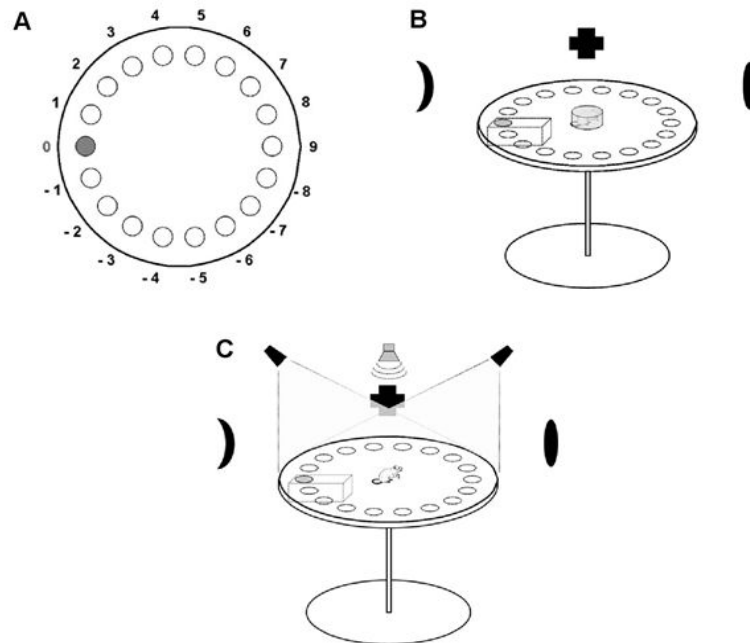


Figura 5. Laberinto circular de Barnes A. Vista superior del instrumento; se observa la ubicación de los 18 agujeros, siendo 0 el agujero meta (en gris oscuro). B. Los animales se ubican en la caja de salida (en gris claro) antes de iniciar el ensayo; la caja meta está emplazada en la plataforma, bajo el agujero 0; se observan las claves extra-laberínticas, ubicadas en las paredes de la habitación. C. Se retira la caja de salida y, simultáneamente, se enciende la luz y el ruido blanco. Figura modificada de Troncoso & cols (2010).

7.5.2 Variables Dependientes, medidas en el laberinto de Barnes

Para los experimentos de memoria espacial, las variables dependientes evaluadas durante la prueba de retención fueron:

- Latencia de llegada a meta (o latencia de escape). Tiempo (en segundos) que el animal tardó en explorar por primera vez el agujero bajo el cual estuvo emplazada la caja meta durante el entrenamiento (agujero meta).
- Latencia de inicio. Tiempo (en segundos) que el animal tardó en realizar la primera exploración a cualquier agujero del laberinto.

- Errores de exploración. Número de exploraciones de agujeros diferentes al agujero meta, realizadas antes de explorar dicho agujero por primera vez.
- Errores ponderados. Errores de exploración ponderados por su distancia al agujero meta. Cada error de exploración se multiplicó por su distancia en centímetros al agujero meta.
- Distancia recorrida. Longitud (en cm) de la trayectoria entre los agujeros explorados hasta la primera exploración del agujero meta.
- Distancia media a meta. Promedio de la longitud (en cm) de la trayectoria entre los agujeros explorados hasta la primera exploración del agujero meta. Para esta medida, se dividió la distancia recorrida entre el número de agujeros explorados. Esta variable da información acerca de qué tan cercana al azar es la exploración que realiza el animal.
- Velocidad media. Distancia recorrida dividida por la latencia de llegada al agujero meta.

Estos indicadores son denominados como “primarios” de acuerdo con Harrison y cols. (2006), debido a que se basan en el desempeño observado hasta la primera exploración del agujero meta. Dichos indicadores también se utilizaron para analizar el desempeño de los animales durante el entrenamiento. Considerando lo expuesto por Harrison y cols. (2006), estos indicadores primarios son más sensibles que los indicadores totales (medidas tomadas hasta el ingreso a la caja meta durante el entrenamiento) ofreciendo una mejor información acerca del aprendizaje del animal sobre la ubicación de la caja de escape en un momento determinado del entrenamiento. De acuerdo con los autores, esto se debe principalmente a que las medidas totales, a diferencia de las primarias, pueden parecer aumentadas por las tendencias exploratorias de los animales.

Además de las medidas primarias, durante la prueba de retención se emplearon otros indicadores que tienen como referencia el patrón de exploración registrado durante toda la prueba:

- Frecuencia total de exploración. Número total de las exploraciones a agujeros realizadas durante la prueba de retención.
- Tiempo total de exploración. Duración total de las exploraciones a agujeros realizadas durante la prueba de retención.
- Frecuencia de exploración por agujero. Número de exploraciones realizadas en cada uno de los dieciocho agujeros del laberinto durante la prueba de retención. Para éste y los demás análisis por agujero, el agujero que contenía la caja de escape durante el entrenamiento fue numerado como agujero 0 con el propósito de una representación gráfica normalizada, de tal forma que los agujeros restantes fueron numerados del 1 al 9 en el sentido de las manecillas del reloj y del -1 al -8 en el sentido contrario (Figura 3^a).
- Frecuencia porcentual de exploración por agujero. Índice calculado al dividir el número de exploraciones realizadas en cada agujero entre la frecuencia total de exploración, multiplicado por cien.
- Tiempo de exploración por agujero. Duración de las exploraciones realizadas en cada uno de los dieciocho agujeros del laberinto durante la prueba de retención.
- Tiempo porcentual de exploración por agujero. Índice calculado al dividir la duración de las exploraciones realizadas en cada agujero entre el tiempo total de exploración, multiplicado por cien.

En todos los casos, la exploración de un agujero se definió como la inflexión de la cabeza sobre el agujero haciendo un movimiento de arriba abajo o de lado a lado al interior del mismo.

7.6 Consideraciones éticas

Todos los procedimientos que se realizaron en esta investigación se basaron estrictamente en lo establecido por la Ley 84 de 1989, específicamente lo mencionado en el capítulo VI: Del uso de animales vivos en experimentos e investigación; así mismo la reglamentación estipulada en la Resolución N° 008430 de 1993 del ministerio de salud de Colombia, en la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para

la investigación en salud, cumpliendo a cabalidad especialmente lo mencionado en Título V, en donde se mencionan los requisitos para llevar a cabo investigación biomédica con animales, teniendo en cuenta un soporte bibliográfico y científico previo sobre el tema y considerando su importancia para la prevención y control de la salud humana, como modelo animal y para el avance del conocimiento biológico acerca de los efectos del estrés neonatal, así como del uso del glutamato monosódico y su seguridad en animales jóvenes. Para implementar este estudio se seleccionaron ratas de la cepa Wistar adquiridas legalmente, de las cuales se hizo uso del mínimo número requerido para obtener resultados que representen alguna validación estadística y puedan ser considerados científicamente aceptables. Este estudio fue de riesgo mínimo, y no duplicativo por su carácter científico, con una capacitación realizada por el investigador titular, quien posee experiencia suficiente para la ejecución de los procedimientos descritos en este protocolo y conoce y aplica la normatividad internacional contemplada por la CIOMS, IACUC e ICLAS. Los reactivos utilizados en este estudio fueron de categoría toxicológica moderada a baja y por lo tanto no provocan impacto ambiental. Institucionalmente existe la normatividad exigida por la dirección de investigación de la Universidad Nacional, que coincide con parte de los decretos y leyes nacionales y que da lugar al establecimiento de guías, pautas internacionales y principios éticos para la investigación a nivel mundial. Una vez se ha hecho uso al máximo del material biológico, los desechos se dispondrán en bolsa roja para su posterior incineración. El presente proyecto contó con la aprobación del Comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, respaldado con el acta N° 004 – 030 – 16 del 10 de marzo de 2016. Finalmente es importante mencionar que estos animales se mantuvieron dentro de las instalaciones del Bioterio de la Universidad Nacional de Colombia en condiciones óptimas para su mantenimiento, cumpliendo las reglamentaciones sanitarias vigentes.

7.7 Diseño experimental

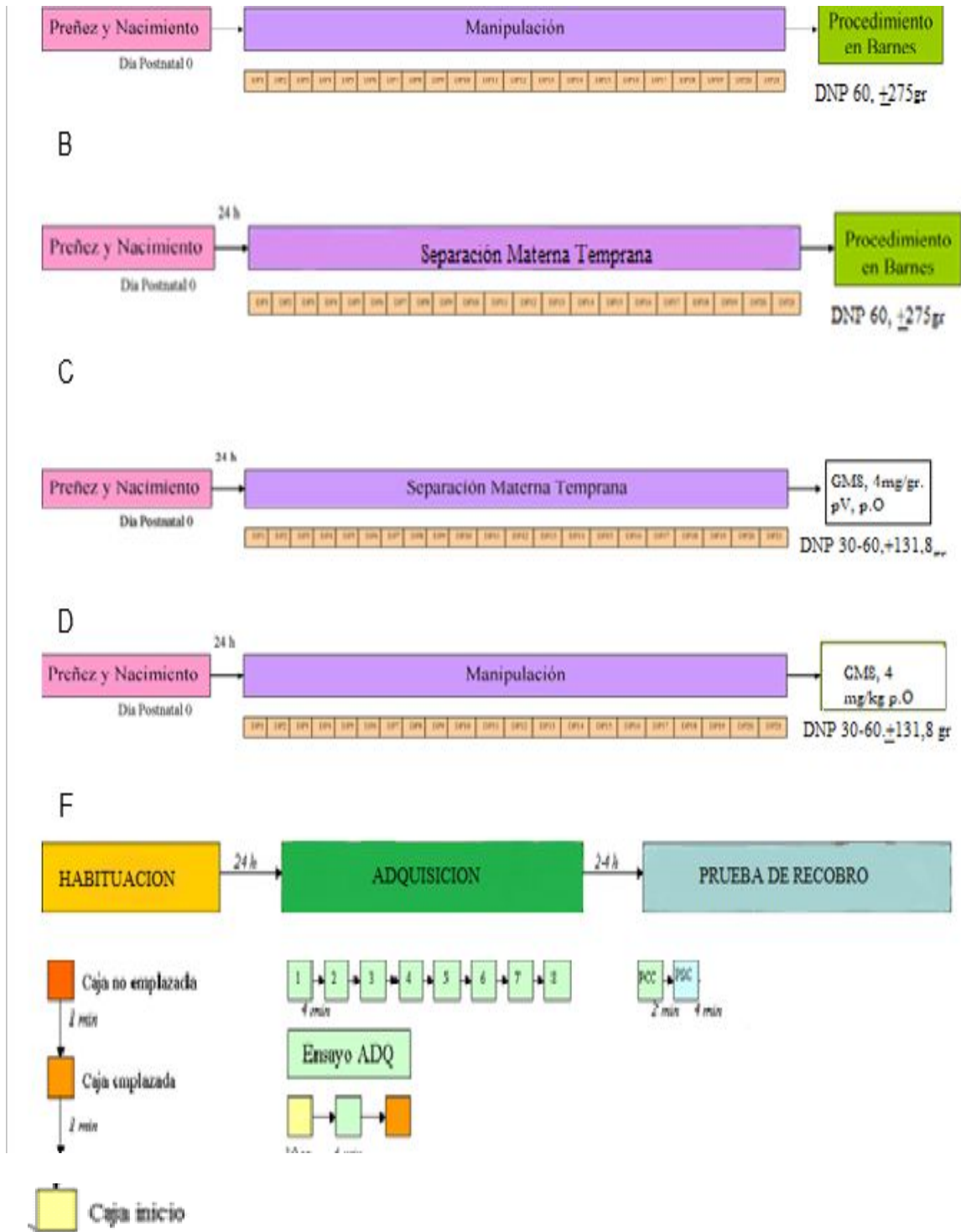


Figura 6. Diseño experimental usado

A. Animales control. B. Tratamiento animales separados. C Animales sin separación más GMS: Rosado – nacimiento, Lila – condición, Carne – DPN 1 a 21, Verde oliva – Glutamato con blanco. D. Protocolo usado en el laberinto de Barnes. CONTROL n=8, NSMGMS n=11, SMNGMS n=10, SMGMS n=13. Modificado de *Ramírez R Camilo., Dueñas, Zulma, (2009). Estudio Comparativo: Efectos De La Separación Temprana Sobre El Aprendizaje Y La Extinción De Una Tarea De Memoria Espacial En Ratas Wistar. Tesis de grado. Programa de psicología, pp. 27*

7.8 Análisis Estadísticos

Para contrastar las diferentes variables fisiológicas, se desarrollaron diversas pruebas estadísticas. En el caso de la variable “peso” se realizó una evaluación mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía de medidas repetidas, considerando por demás que el número de individuos para cada grupo era distinto. Adicionalmente se llevaron a cabo pruebas no paramétricas de Friedman, cuando hubo lugar a no cumplimientos en los criterios de homogeneidad y normalidad para las varianzas. Se determinaron además diferencias intergrupales mediante el desarrollo de análisis de varianza de una vía, para cada día de medición del peso reportado, además de pruebas no paramétricas de Tukey y Kruskal-Wallis, considerando las mismas circunstancias que se han venido describiendo para las varianzas. Para realizar el respectivo análisis de las medidas de consumo de GMS se realizó un ANOVA de una vía de medidas repetidas, con una comparación post hoc paramétrica de Dunn. De igual manera el consumo de agua se determinó mediante un test de Kruskal Wallis, al no cumplir los criterios de homogeneidad para comparaciones intergrupales. El consumo de glutamato se midió mediante una prueba T, y considerando que no hubo diferencias significativas, no se procedió con ningún análisis ulterior. El análisis del desempeño de los sujetos a través de los ensayos de entrenamiento se realizó mediante ANOVA de una vía de medidas repetidas o la prueba no paramétrica de Friedman de medidas repetidas, de acuerdo con el cumplimiento o no de los criterios de normalidad y homogeneidad de varianzas. Para comparar la ejecución entre los diferentes grupos en los indicadores primarios y las medidas globales de exploración (frecuencia total de exploración y tiempo total de exploración) durante la prueba de retención, se realizaron ANOVAs de una vía o la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, dependiendo del cumplimiento o no de los criterios

de normalidad y homogeneidad de varianzas. Para comparar la ejecución entre grupos en los indicadores primarios (latencia total, errores ponderados y distancia media a meta). Adicionalmente, la ejecución de cada grupo experimental en los indicadores primarios durante la prueba de retención fue comparada con el desempeño promedio que exhibieron los animales del estudio durante el último ensayo de entrenamiento; estas comparaciones se realizaron mediante ANOVAs de una vía o la prueba no paramétrica Tukey. Finalmente, las comparaciones intra-grupos en los indicadores de frecuencia y tiempo de exploración por agujero, así como en los análisis por sector, se realizaron mediante ANOVAs de una vía de medidas repetidas. Se utilizaron como pruebas post-hoc los métodos de comparaciones múltiples de Dunn, considerando si se trataron análisis paramétricos o no paramétricos, respectivamente. Los análisis descritos anteriormente se realizaron haciendo uso del paquete estadístico Sigma Stat 3.5 (Systat Software, Inc., San José, California, EUA).

Para las gráficas de las medidas calculadas se usó Microsoft® Office Excel 2013 y representan en todos los casos el promedio y el error estándar de la media (SEM). Para todas las pruebas, el nivel de significancia estadística correspondió a un $\alpha = 0,05$.

8. Resultados

8.1 Peso corporal

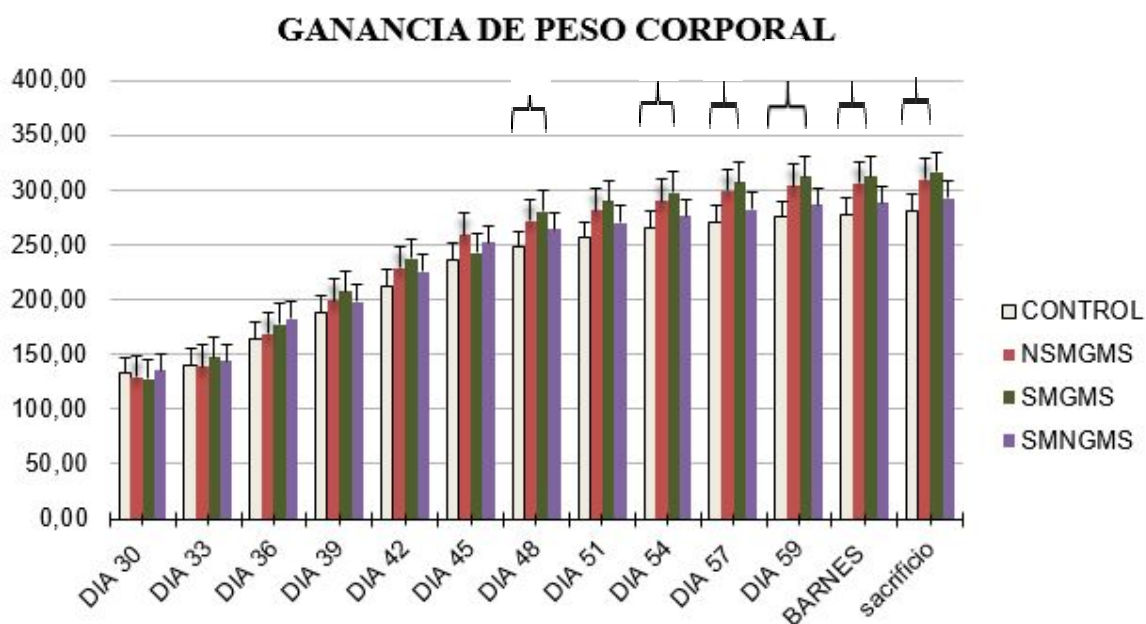


Figura 7. Ganancia de peso corporal en (gr) CONTROL n=8, NSMGMS n=11, SMNGMS n=10, SMGMS n=13. Todas las figuras muestras * diferencia estadística ($\hat{p}<0.05$) y SEM

Para cada uno de los grupos de estudio, durante el tiempo de administración del GMS. La significancia estadística se muestra respecto al grupo control ($\hat{p}<0.01$). SMGMS (n=12), NSMGMS (n=11), SMGMS (n=10) y Control (n=8). Todas las figuras muestran promedio y SEM. * Diferencias estadísticas significativas

En la fig. 7 se puede observar un aumento progresivo del peso corporal a través de los días de protocolo experimental. Dada la variación en el número de sujetos, se hizo una comparación intragrupal independiente con una diferencia estadísticamente significativa para cada uno de los grupos evaluados, comparando el inicio del protocolo, hasta el día

que se sometieron a la prueba de memoria espacial (DPN 30 hasta el DPN 60), ($P < 0.001$). (ANEXO A). En cuanto a las comparaciones intergrupales, se utilizó un ANOVA de una vía y dada la tendencia de las pruebas a no cumplir condiciones de normalidad, se realizó un test de Kruskal Wallis y su respectiva prueba post hoc, que en esta ocasión fue el test de Dunn. El grupo que mayor ganancia de peso obtuvo fue el de SM más GMS, mostrando diferencias significativas para esta variable a partir del día 48, [$H(3) = 10,753$, ($P = 0,013$)] cuando se realizó la comparación respectiva con el grupo Control. Para el día 51 igualmente se registraron significancias estadísticas [$H(3) = 12,041$, ($P = 0,007$)], cuando se hizo la comparación entre los grupos SM más GMS. Igualmente, en las pruebas de comparaciones múltiples, el grupo que mayores diferencias presentó fue el de SM más GMS, comparado contra el respectivo Control, seguido del grupo de SM sin GMS y finalmente por el grupo de NSM más GMS. Estas mismas observaciones se repitieron para los días, 51, 52, 54, 57, 59, y 60 (Barnes) demostrando una significancia estadística similar, con los registros de peso más altos para el grupo de SM más GMS. (Ver anexo A). A nivel general, los datos muestran una tendencia donde los animales sometidos a SMDL, presentaron una mayor ganancia de peso comparada con los animales que no se sometieron a dicho paradigma.

8.2 Consumo de GMS y consumo de agua

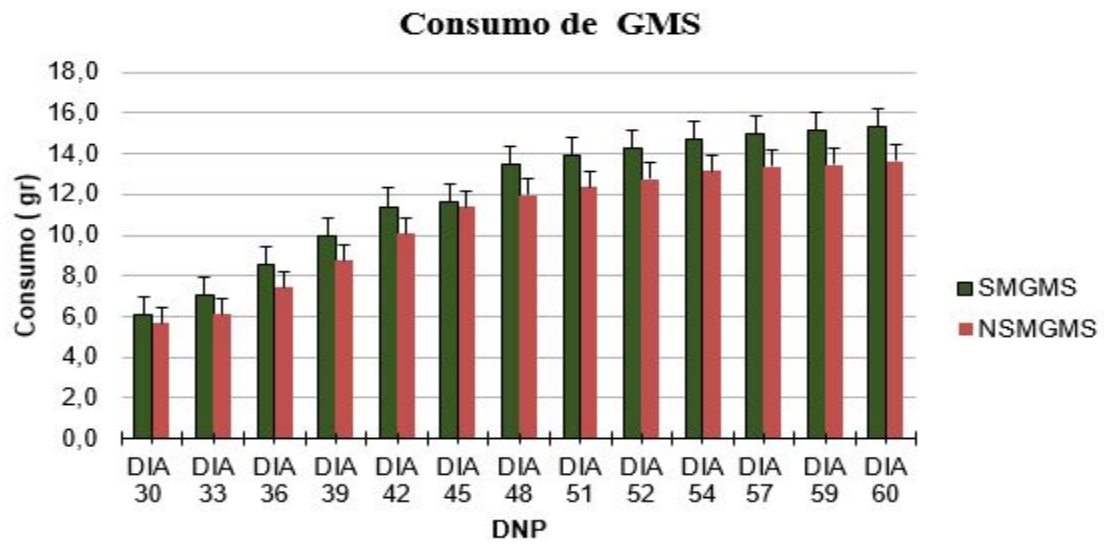


Figura 8. Consumo promedio (+SEM) de GMS, medido en gr, considerando la cantidad que se determinó a partir de una dosis de 4mg/gr. NSMGMS N=11, SMGMS N=13.No se halló significancia estadística.

La figura 8 muestra que no existe una diferencia significativa entre los grupos sometidos al consumo de la sustancia. (p=0,143).

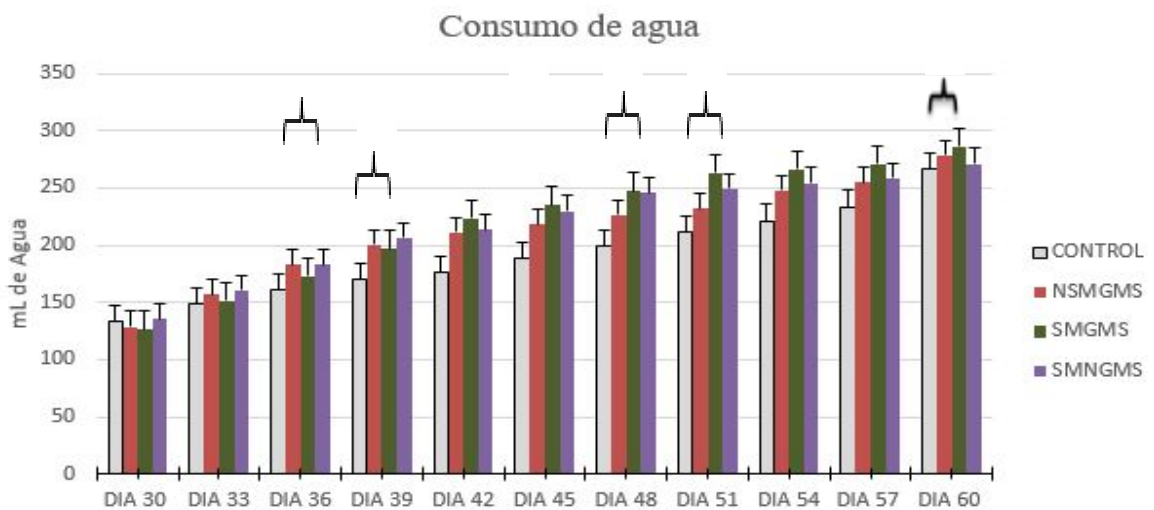


Figura 9. Consumo de agua (ml). Se tomaron en cuenta los volúmenes que se originaron durante el consumo que contenía el GMS. CONTROL n=8, NSMGMS n=11, SMNGMS n=10, SMGMS n=13. * indica la respectiva significancia estadística. Se muestra SEM.

En cuanto al consumo de agua, se observó una diferencia considerable ya que los animales que contaban con las dos condiciones experimentales (SMGMS), mostraron un consumo significativamente mayor. De igual manera los animales que habían consumido GMS, sin haber estado separados mostraron una tendencia mayor al consumo de líquidos. [$F_{(3)} = 10.52$; $p < 0.001$]

8.3 Prueba de laberinto de Barnes

8.3.1 Prueba de laberinto de Barnes

8.3.1.1 Entrenamiento y aprendizaje

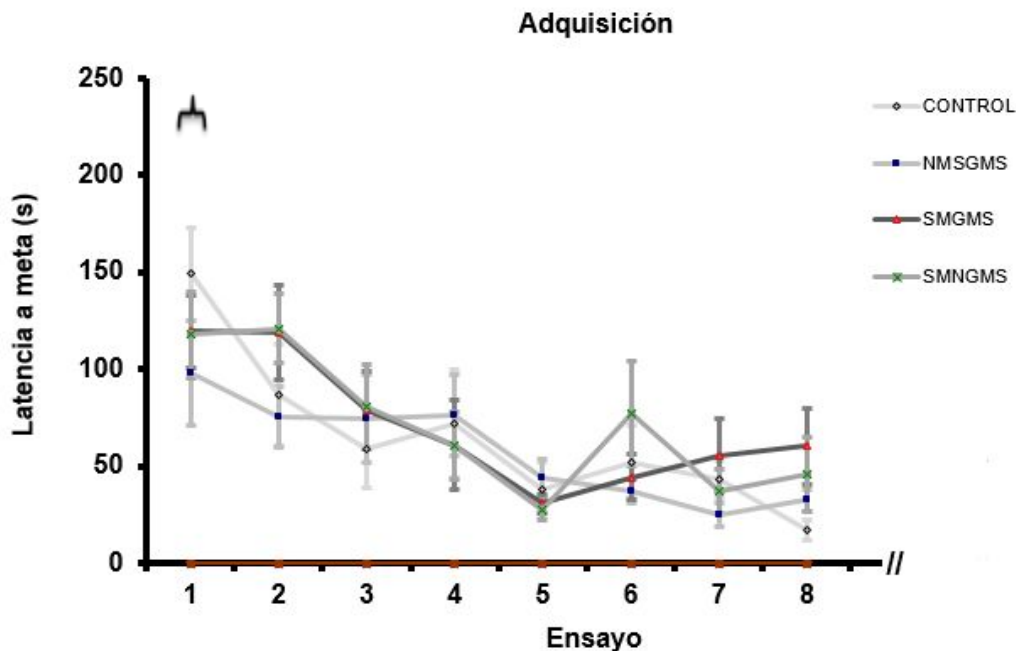


Figura 10. Promedio (\pm SEM) de latencia (segundos) del tiempo de llegada al agujero meta, durante el entrenamiento en todos los grupos. CONTROL n=7; [$F_{(6,7)} = 4.87$; $p < 0.001$]., NSMGMS n=11; [$F_{(10,7)} = 3.142$; $p < 0.006$]., SMNGMS n=9; [$F_{(8,7)} = 5.226$; $p < 0.001$]., SMGMS n=13 [$F_{(12,7)} = 3.694$; $p < 0.002$].

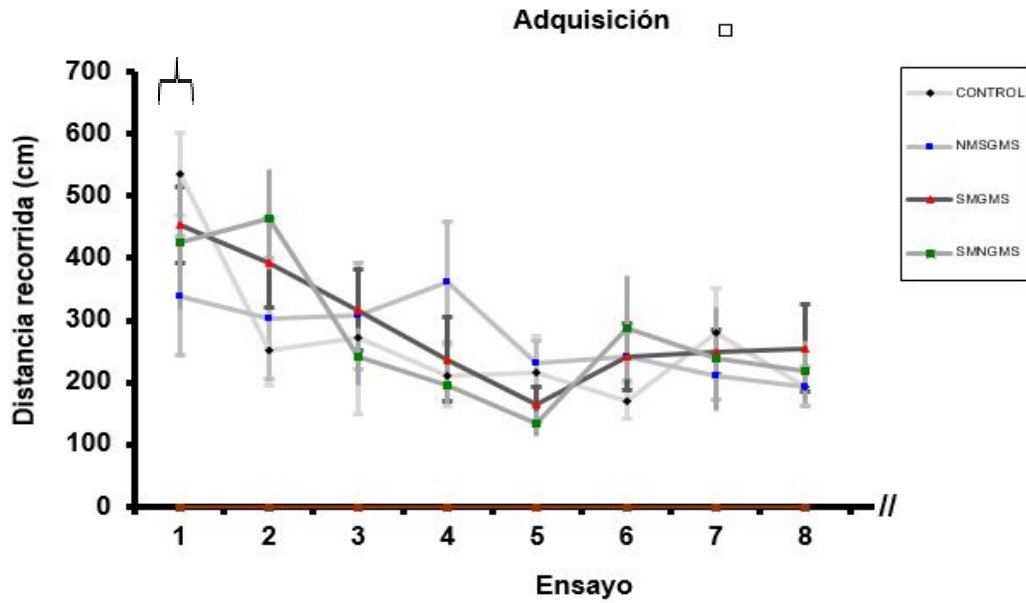


Figura 11. Promedio (\pm SEM) de distancia recorrida (cm) durante el entrenamiento para todos los grupos. CONTROL n=7 [$F_{(6,7)}=2,543$; $p<0.028$], NMSGMS n=11 [$F_{(10,7)}=0,46$; $p<0,895$], SMNGMS n=9 [$F_{(8,7)}=0,885$; $p<0.523$], SMGMS n=[$F_{(8,7)}=1,709$; $p<0.126$]

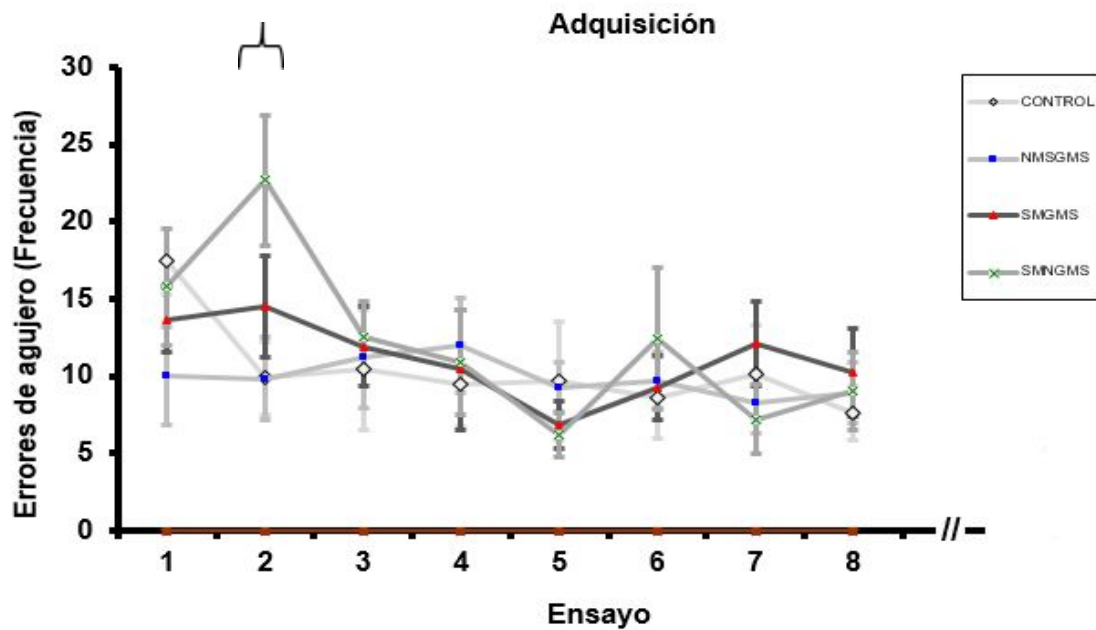


Figura 12. Promedio (\pm SEM) de distancia recorrida, durante el entrenamiento, para todos los

grupos. CONTROL n=7 [$F_{(6,7)}=1,87$; $p<0,099$], NSMGMS n=11 [$F_{(10,7)}=0,185$; $p<0,988$], SMNGMS n=9 [$F_{(8,7)}=3,245$; $p<0,006$], SMGMS n=13 [$F_{(12,7)}=0,755$; $p<0,658$].

8.3.2 Entrenamiento

La figura 12 muestra la latencia de escape para todos los grupos. Durante los ensayos, los tiempos de latencia se redujeron considerablemente para la mayoría de los sujetos (ver anexo 15). Dado que se evaluaron variables primarias asociadas al laberinto e inicialmente se determinaron de manera intragrupal los resultados iniciales se describirán para cada grupo. Se determinó realizar una comparación entre cada ensayo, (p. ej., E1 vs E8; E2vs E7) con el objetivo de determinar si hubo reducción del tiempo a medida que transcurría el entrenamiento. En el caso del grupo Control el parámetro de normalidad no superado para el ANOVA de una vía de medidas repetidas ($p=0,050$), y la prueba de equivalencia superada ($p=0,226$). Como era de esperarse hubo significancia estadística al comparar la disminución de tiempo empleado para cada ensayo, (latencia) [$F_{(6,7)}=4,87$, $p<0,001$]. Dicha significancia se observó a partir del E2, y se mantuvo hasta E8 (Comparación post hoc de Dunnett, $p<0,050$). Parámetros medidos para la variable "Errores de agujero", inicialmente superaron las pruebas de normalidad ($p=0,277$), y equivalencia ($p=0,561$). Sin embargo, no mostraron cambios significativos, aunque sí hubo una tendencia a la reducción del número de estos [$F_{(6,7)}=1,87$; $p=0,099$]. Finalmente, cuando se hicieron los respectivos análisis para la variable "Distancia", no se superaron los criterios de normalidad ($p<0,05$), y si los de equivalencia ($p=0,961$).se pudieron observar diferencias en cuanto al desarrollo de los ensayos E3, E4 y E8 [$F_{(6,7)}=2,543$; $p<0,028$, Dunnett, $p<0,050$]. Para el caso del grupo NSMGMS, en la variable "Latencia" se observaron diferencias significativas [$F_{(10,7)}=3,142$; $p<0,006$] encontrándose en los últimos 3 ensayos (E6, E7y E8, Dunnett $p<0,050$). La siguiente variable evaluada "Errores de agujero", no mostró ningún cambio significativo a pesar de observarse una tendencia hacia una reducción numérica de los mismos [$F_{(10,7)}=0,185$; $p<0,988$]. Por último, para este grupo la variable "Distancia recorrida" no mostró cambios significativos a lo largo de los 8 ensayos [$F_{(10,7)}=0,406$ $p<0,896$]. El siguiente grupo experimental, SMGMS, tuvo una significancia estadística en el caso de la variable "Latencia" [$F_{(11,7)}=3,66$; $p<0,002$], aunque esta solo se pudo observar en el caso de la comparación de E1

con E5 y E6 (Dunnett, $p < 0.050$). La variable “Errores de agujero”, no mostró significancia alguna, durante el entrenamiento [$F_{(11,7)} = 0,755$; $p = 0,658$]. Para el caso de la variable “Distancia” no se observaron diferencias significativas, durante la ejecución del aprendizaje [$F_{(11,7)} = 0,885$; $p = 0,523$]. Finalmente, el grupo **SMNGMS**, mostró a su vez una significancia estadística en el tiempo de latencia empleado durante el aprendizaje. [$F_{(8,7)} = 5,226$; $p > 0.001$]. Sin embargo, la significancia tuvo lugar en tres ensayos (E5, E7, y E8), cuando se hizo el correspondiente análisis post hoc de Dunnett ($p > 0,050$). La siguiente variable “Errores de agujero” mostró a su vez una diferencia significativa, no observada en ninguno de los grupos anteriores [$F_{(8,7)} = 3,245$; $p < 0,006$]. En cuanto a la variable final “Distancia” no hubo lugar a diferencias significativas [$F_{(8,7)} = 1,709$; $p < 0.126$]. De este modo no se observó una interacción directa de ninguna variable sobre el desarrollo de la tarea espacial en el laberinto de Barnes durante la adquisición.

8.3.3 Pruebas por ensayo intergrupales

No se observaron diferencias estadísticas significativas, cuando se compararon los diferentes ensayos, en ningún caso considerando las variables que se han venido describiendo. Para estos efectos se realizaron ANOVA's de una vía cuando se superaron los criterios de normalidad, recurriendo a la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, cuando no se cumplieron. La variable “Latencia” no mostro diferencias apreciables, en ninguno de los ensayos durante la adquisición (Ensayo 1 Kruskal Wallis, $H = 3,175$; $p = 0,365$, ensayo 2 ANOVA una vía, $F(3,35) = 1,185$, $p = 0,33$, ensayo 3 Kruskal Wallis, $H = 1,299$; $p = 0,731$, ensayo 4 ANOVA de una vía, $F(3,35) = 0,134$; $p = 0,939$, ensayo 5 Kruskal Wallis, $H = 1,728$; $p = 0,631$, ensayo 6 Kruskal Wallis, $H = 0,552$; $p = 0,907$, ensayo 7 ANOVA de una vía $F(3,35) = 0,991$; $p = 0,467$, ensayo 8 ANOVA de una vía $F(3,35) = 0,467$; $p = 0,707$. Para la variable de distancia recorrida, no existieron diferencias apreciables (Ensayo 1 ANOVA de una vía $F(3,35) = 1,708$, $p = 0,137$, ensayo 2 Kruskal Wallis, $H = 4,51$; $p = 0,211$, ensayo 3 ANOVA de una vía $F(3,35) = 2,112$; $p = 0,116$, ensayo 4 ANOVA de una vía $F(3,35) = 0,79$; $p = 0,508$, ensayo 5 ANOVA de una vía $F(3,35) = 0,75$; $p = 0,53$, ensayo 6 Kruskal Wallis, $H = 1,440$; $p = 0,696$, ensayo 7 ANOVA de una vía $F(3,35) = 0,48$; $p = 0,698$, ensayo 8 ANOVA de una vía $F(3,35) = 2,258$; $p = 0,099$. En la variable de errores, finalmente tampoco se evidenciaron diferencias apreciables

(ensayo 1 Kruskal Wallis $H=5,714$; $p=0,126$, ensayo 2 ANOVA de una vía $F(3,35)=2,826$; $p=0,053$, ensayo 3 ANOVA de una vía $F(3,35)=0,301$; $p=0,824$, ensayo 4 Kruskal Wallis $H=1,008$; $p=0,799$, ensayo 5 ANOVA de una vía $F(3,35)=0,873$; $p=0,464$, ensayo 6 ANOVA de una vía $F(3,35)=0,370$; $p=0,772$, ensayo 7 ANOVA de una vía $F(3,35)=0,783$; $p=0,512$, ensayo 8 Kruskal Wallis $H=5,352$; $p=0,148$.)

8.3.4 Memoria

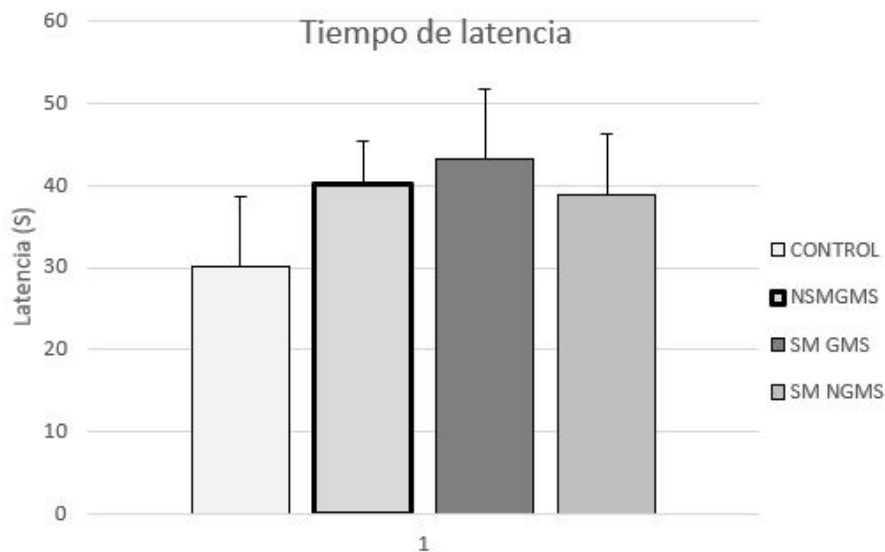


Figura 13. Prueba de memoria, prueba con caja (PCC). No se observaron diferencias significativas en ningún grupo. CONTROL $n=7$, NSMGMS $n=11$, SMNGMS $n=9$, SMGMS $n=13$, $F(3,35)=0,467$; $p=0,707$. En todos los casos se muestra promedio y SEM, para cada grupo

Durante el desarrollo de las pruebas de retención con caja no se observaron diferencias significativas para ninguna variable (latencia, errores de agujero y distancia recorrida). Se utilizó un ANOVA de una vía de medidas repetidas, para valorar las interacciones de los efectos durante la ejecución de dicha prueba. Para la variable latencia, la prueba de normalidad no fue superado ($p<0.050$), más si el de equivalencia ($p=0,664$), donde no se encontró una diferencia significativa [$F_{(11,3)}=0,292$; $p=0,831$]. En el caso de la variable Distancia, el test de normalidad se superó ($p<0.050$), así como el supuesto de

equivalencia ($p=0,712$), dando lugar a una significancia estadística en el ANOVA de una vía de medias repetidas [$F_{(11,3)}=3,01$; $p=0.050$]. Análisis post hoc, mediante la prueba de Tukey de comparaciones múltiples, determino la existencia de esta diferencia para el parámetro medido entre los grupos de SMGMS, cuando se compararon con el control ($p<0,050$; $p=0,034$). Para la variable Errores, no se superaron los supuestos de normalidad ($p<0,050$), más si los de equivalencia ($p=0.603$), se procedió con la prueba correspondiente donde no se encontraron diferencias [$F_{(11,3)}=0,168$; $p=0.194$]. Dado que no se observaron diferencias significativas durante la comparación entre los grupos, se decidió realizar un análisis adicional que involucro los valores obtenidos para la última latencia, en la prueba de aprendizaje (E8) y la PCC y PSC. Sin embargo, no fue apreciable ninguna diferencia relevante entre los diferentes ensayos, para estos tres parámetros. Considerando la latencia a meta, en el caso del grupo Control, no fue observable ninguna diferencia significativa [$F_{(6,2)}=1,661$; $p<0,231$]. De igual manera la siguiente variable Distancia no ofreció ninguna significancia estadística para el caso de este grupo [$F_{(6,2)}=0,703$; $p<0.514$]. En cuanto a la variable Errores tampoco fue evidente una diferencia para la prueba sin caja desarrollada por el grupo de Control [$F_{(6,2)}=0,1534$; $p=0.255$]. El grupo de NSMGMS, tampoco mostro diferencias relevantes en cuanto a la comparación de las medidas mencionadas, siendo así latencia [$F_{(10,2)}=2,442$; $p=0.113$], Distancia [$F_{(10,2)}=2,386$; $p<0.831$] y Errores [$F_{(10,2)}=2,386$; $p=0.118$]. El siguiente grupo SMNGMS tampoco mostro divergencias entre las medidas que se evaluaron, dándose que la latencia [$F_{(8,2)}=0,648$; $p=0.536$], así como la Distancia, [$F_{(8,2)}=0,895$; $p=0.428$] y la variable Errores [$F_{(8,2)}=1,105$; $p<0.365$]. Finalmente, el grupo SMGMS tampoco mostro valores que indicaran aceptación de hipótesis alternativa para las distintas variables, siendo latencia [$F_{(8,2)}=1,105$; $p<0.365$], Distancia [$F_{(8,2)}=1,105$; $p<0.365$] y errores [$F_{(8,2)}=1,105$; $p<0.365$].

Durante la prueba de evaluación de preferencia para agujero meta no se evidencio cambios que sugirieran algún grado de variación entre los grupos sometidos a la prueba sin caja donde se valoro la tendencia que manifestaban los diferentes grupos sometidos a experimentación a tener preferencia por el agujero meta asignado, con su

correspondiente valor en porcentaje, considerando que el efecto atribuible a los errores y la variación de los mismos afecta de manera importante las posibles diferencias.

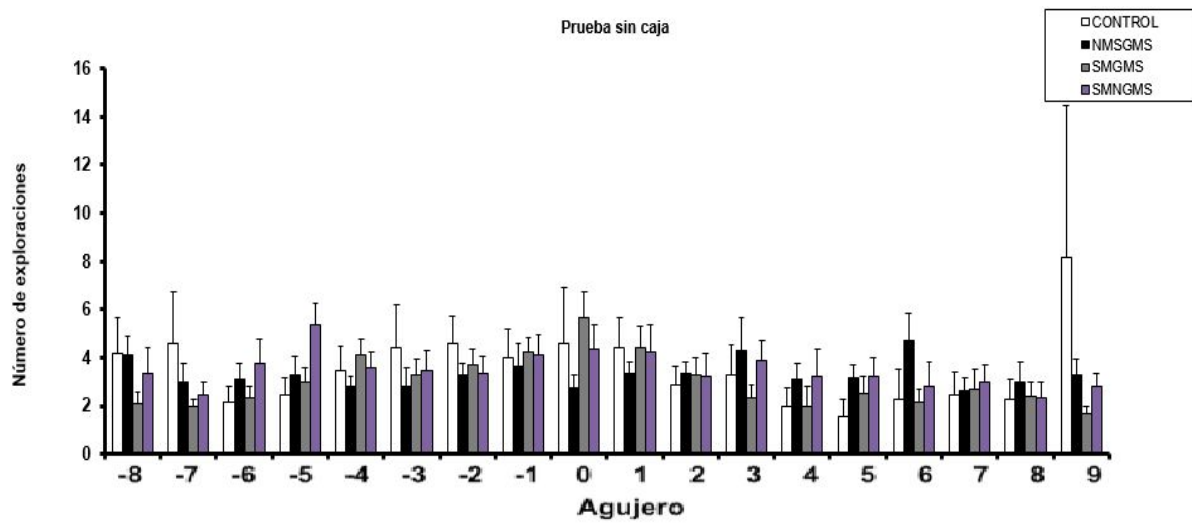


Figura 14. Prueba de memoria, prueba sin caja (PCC). No se observaron diferencias significativas en ningún grupo. CONTROL n=7, NSMGMS n=11, SMNGMS n=9, SMNGMS n=13. En todos los casos se muestra promedio y SEM, para cada grupo.

9. Discusión

El presente estudio evaluó los efectos de la separación materna sobre el consumo de glutamato monosódico y el desarrollo de la tarea espacial del laberinto de Barnes. Adicionalmente también se comparó si dicho consumo tenía repercusiones en el peso de los animales experimentales y el consumo de agua. Los resultados obtenidos muestran, por lo tanto, los diferentes aspectos evaluados en diferentes fases sobre las variables estudiadas. En relación con lo anterior el presente estudio demostró que la separación materna genera cambios respecto al consumo del aditivo usado en este estudio, pero que estos cambios no representan una significancia estadística y se interpretan como una tendencia. Así mismo el consumo de GMS estuvo asociado a cambios importantes en cuanto al comportamiento relacionado con la ingestión de líquidos, y el incremento de peso, aunque para esta variable es importante tener en cuenta que aquellos animales que llegaron al sacrificio con mayor peso corporal, también se sometieron al protocolo de estrés temprano. De este modo se evaluaron los efectos del estrés crónico y el consumo de GMS sobre el aprendizaje y la memoria. Es interesante resaltar que parece no haber ningún efecto atribuible a la separación materna de manera representativa, en cuanto al desarrollo de tareas espaciales, o algún efecto atribuido al consumo de GMS, para dicha variable.

9.1 Separación materna, GMS y ganancia de peso corporal

En general las evidencias encontradas por esta investigación demostraron que la SMDL incide de cierta manera la variable del peso. Evidencias recabadas en la literatura consultada indican que la SMDL podría generar alteraciones fenotípicas en los patrones de ingesta de alimentos altamente palatables, conllevando a modificaciones metabólicas importantes. (Plotsky & Cols., 1998, Macrí & Cols. 2006, De Kloet 2006, Juruena 2013, Spencer & Deak, 2016). Si bien los resultados sugieren un efecto de peso mucho mayor

de la separación materna en las consecuencias metabólicas, el hecho de que el grupo experimental cuyo peso fue mayor corresponde al de consumo de glutamato sin separación, indica una asociación de efectos aditivos que podrían tener probables efectos deletéreos en la regulación de la ingesta. La literatura consultada sugiere que la interacción de diversos mecanismos moleculares conllevaría a una respuesta que derivaría en la generación de alteraciones de la ingesta y a su vez, la ganancia de peso podría tener su génesis en la modulación e interacción entre ciertas hormonas y algunos receptores vinculados a los centros de recompensa cerebral, localizados en el área tegmental ventral y núcleo accumbens (Aya L, Dueñas Z, 2015, Aya y Cols 2017). Hasta la fecha no hay reportes que describan la interacción entre la SMDL y el consumo oral de GMS. Sin embargo, es posible hacer extrapolaciones concernientes a las investigaciones que involucran el uso del paradigma de SMDL, y otros aditivos alimentarios, incluidos edulcorantes, conservando las respectivas distancias. Como se ha venido mencionando el patrón de impacto que genera el estrés neonatal sobre el consumo de sustancias altamente palatables es significativo, usualmente generando una alteración en los patrones de ingesta. Yoo & Cols 2011 demostraron que la separación materna tiene efectos directos sobre la expresión de proteínas reguladoras de la ingesta de alimentos en las zonas correspondientes, siendo de esta manera estudiadas la expresión de Neuropeptido Y, Trascripto regulado por cocaína y anfetaminas CART y proopiomelanocortina POMC. Los sujetos que se incluyeron en dicha investigación fueron ratas hembras de las cepas Sprawgley Dawley, las cuales fueron sometidas al paradigma de separación materna. Si bien es cierto que existe un dimorfismo marcado en la respuesta al estrés, dicho estudio deja por sentado los marcados efectos que tiene la separación materna en la vida posterior al destete, sobre la regulación de la ingesta y estados relacionados a comportamientos similares a depresión. (Yoo & cols 2008, Yoo & cols 2011). Investigadores como Porter y cols 2014, demostraron que comportamientos similares a la ansiedad en roedores provocan cambios neuroquímicos importantes donde las preferencias alimenticias esta orientadas hacia alimentos particularmente dulces (Porter & cols 2014). Teniendo como antecedente el hecho de que los animales habían sido sometidos a SMDL, es posible que la modulación a la respuesta de ingestión de alimento esté alterada, como se pudo corroborar en los estudios llevados a cabo por Aya

R. y Dueñas Z en 2015. Estudios con modelos animales han dejado indicios de que la sensación dejada por el alimento a nivel oral tiene un papel significativo en la motivación por la ingestión, y que dicho factor otorga un nivel de protección contra el consumo de comida de calidad dudosa. Dichas propiedades y el ajuste del consumo de energía a las necesidades estrictas de los animales pueden ser alterados si se hace uso de dietas altamente palatables (Kazmi & cols 2017). En el caso de la preferencia por el GMS participa el receptor gustativo del sabor dulce (Tr1, Tr3), receptores metabotrópicos para el glutamato (mGluR's), el transportador de aminoácidos excitatorios, el transportador de glutamato-aspartato 1. GLAST-1 así como el receptor de dopamina tipo 2 (DRD2, la leptina y su receptor correspondiente (LEP y LEPR) (Guidiño C. & cols 2009, Abu Tawell & cols, 2014, Kazmi & cols 2017, Al-Azawi & cols 2018) En otras investigaciones se ha demostrado que los receptores de diversos neurotransmisores, ubicados en la cavidad oral, tracto gastrointestinal y estructuras cerebrales, se modifican después de la exposición a estrés neonatal. Eventualmente los cambios descritos por de Souza & cols 2017, describen este fenómeno desde la perspectiva de la alteración de los receptores de dopamina, asociados con esta respuesta, donde en ratas de la cepa Wistar, de ambos sexos fue evaluada la cantidad de ingesta de alimentos altamente palatables y la expresión de proteínas asociadas a receptores Dr1 y Dr2 en el tallo cerebral. Los resultados se asociaron a un efecto notorio en el incremento de la ingesta, independiente del sexo, y un incremento en el número de los receptores solo en los machos. De esta forma se puede observar cómo en dicho estudio la separación materna modificó de una manera importante el comportamiento ingestivo de los animales, haciéndose prevalente la tendencia al consumo de comida altamente palatable, no solo por la compensación energética. Por otro lado, la administración de GMS junto con dietas altamente palatables parece estar relacionada con un incremento de la producción de leptina y una resistencia insulínica mediada en algunos casos por la interacción endocrina del tejido adiposo reactivo (Abu Tawell & cols 2014, Kazmi & cols 2017)

Estudios relacionados con la respuesta hedónica han previsto que sujetos humanos con antecedentes nutricionales deficientes, tienen mayor preferencia por el consumo de caldos que contienen el aditivo, comparados con sujetos cuya nutrición tiene mejor

calidad (Rogers & cols 1990). Se ha postulado que la administración parenteral de GMS, es compatible con una variedad bien reconocida de efectos de sustancias como drogas y alcohol se vincula con el DRD2 al igual que la ingesta de edulcorantes, ya que el consumo de dichas sustancias puede tener efectos negativos en los centros de regulación de la ingesta y energía a nivel central conllevando a modificaciones permanentes e irreparables en los individuos afectados. De esta manera los individuos sometidos al paradigma de estrés temprano en este estudio, mostraron efectos más notorios en la variable de peso corporal, comparados con sus controles, siendo con frecuencia los que mostraban significancias más notorias en la variación de peso. Esto advierte que para este experimento muy probablemente los efectos negativos de la SMDL, que se mantienen tardíos y constantes en los individuos que se sometieron al paradigma, se sumaron a efectos atribuibles al consumo de GMS, en relación a un incremento de peso, alteraciones metabólicas, respuestas hedónicas de consumo del GMS y aumento en el consumo de alimento.

En síntesis, el experimento deja por sentado con las evidencias recabadas hasta aquí, que existen efectos aditivos de los factores como la separación materna y el consumo de GMS, que incidieron en el peso al final del experimento, y que la SMDL no parece hacer efectos importantes en los cambios de consumo de GMS. Para sostener estos resultados o corroborarlos de una forma más contundente harían falta estudios postmortem sobre los animales estudiados no solo de carácter macroscópico sino estudios tisulares que determinen la variabilidad en la expresión de proteínas, y sean cotejadas con pruebas moleculares más específicas.

9.2 Efecto del GMS sobre el consumo de agua

Se puede apreciar la diferencia entre los grupos evaluados en cuanto a la cantidad de líquidos que se ingieren por grupo fue mayor en los animales que fueron sometidos al paradigma de SMDL y consumieron glutamato. Es importante mencionar para el autor el hecho de que no se encontraron diferencias significativas en el consumo de GMS entre animales sometidos a SMDL, y aquellos que no se sometieron a dicho paradigma, razón por la cual no se discutirá este aspecto en este apartado. De acuerdo con la literatura

consultada, existe la posibilidad de que la diferencia grupal que se observa en la ingestión de agua sea directamente proporcional con un incremento en la cantidad de GMS que los animales consumían, considerando que el incremento de la osmolaridad de la solución administrada sería mayor a la ofrecida a sus controles. Por otro lado, algunos estudios han demostrado una sólida asociación entre el consumo de GMS y cambios metabólicos y fisiológicos relevantes, tanto en su ingestión crónica como en su administración parenteral en roedores. Una cantidad considerable de evidencias ponen de manifiesto el posible papel que tiene el consumo crónico de GMS con la generación de alteraciones renales a diversa escala. De esta manera autores como Sharma & cols 2013, encontraron un vínculo entre la formación de concreciones a nivel de los túbulos renales y pérdida tisular en los túbulos colectores con el consumo crónico de GMS. Se ha propuesto por parte de estos investigadores que existe una relación entre la ingesta crónica de GMS la alcalinización de la orina y la depleción de los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo, con la aparición de cálculos e injuria renal. Esto podría explicar parcialmente el cambio de la ingesta de líquidos ya de por sí incrementada por el aumento de la carga osmolar, y por la tendencia al consumo de sustancias altamente palatables, asociada a modificaciones tempranas derivadas de la separación materna. En este caso una forma de medir esta funcionalidad de manera indirecta fue realizar una estimación de los consumos de agua originados en los animales sometidos al experimento comparado con sus controles. De esta manera Contini & cols 2017, han dejado claro como existe una correlación entre la expresión de receptores NMDA en la arteria renal y cambios en la dinámica del flujo sanguíneo, dando lugar a la retención de solutos y un aumento en la tasa de filtración glomerular y producción de orina. Adicionalmente y como se ha mencionado el GMS puede generar un impacto en la homeostasis de los radicales libres, dando lugar a mayor daño tisular (Mahieu & cols 2016, Contini & cols, 2017) Otra consecuencia de la exposición crónica a la sustancia corresponde a la retención de agua y solutos como el sodio, lo que se traduce en el génesis de compromisos fisiológicos más importantes como la generación de hipertensión sistémica. Autores han descrito el papel que además tiene el estrés al inducir desequilibrios en el contenido de líquidos corporales representado en la activación anómala de mecanismos neuronales de compensación (Krause & cols 2011). En un

experimento realizado en animales de la cepa Sprawgle Dawley, Krause & cols, 2011, valoraron el efecto del estrés agudo sobre el consumo de líquidos y el comportamiento social. Si bien es cierto que dichos investigadores parten de la premisa de generar estrés agudo en los sujetos experimentales, el mismo se originó de tal forma que altera la concentración de solutos del organismo, tal y como sucede cuando se administran soluciones de tonicidad variable como en el caso del presente experimento. De esta forma alteraciones como la hipernatremia, convergen en la generación de estímulos endocrinos y autonómicos que promueven cambios vasculares y del flujo sanguíneo renal, contribuyendo al mismo tiempo a generar una búsqueda de agua por parte del animal, con el fin de retornar al balance hídrico y mineral (Krause & cols 2011). En el caso del experimento de Krause & cols 2011, los resultados demostraron que una respuesta compensatoria ante el estrés hídrico también generaría respuestas del mismo tipo frente al estrés psicogénico derivado de tener una fuente común de agua. Estos hallazgos contribuirían a explicar porque además de tener un desafío hídrico constante, relacionado con la ingestión de GMS en suspensión, los animales del experimento mostraron una fuerte tendencia a incrementar su consumo de líquidos (polidipsia), donde muy posiblemente también se generen mecanismos compensatorios derivados del hecho de que aquellos que fueron sometidos a estrés temprano bajo el paradigma de SMDL, presenten un estado elevado de producción de corticoides, con una posible alteración de los mecanismos de homeostasis de líquidos corporales. Como observación cabe acotar que durante el desarrollo del experimento se tuvo que optar por realizar cambios de cama con mayor frecuencia, debido a un incremento notable de la producción de orina, que no fue posible medir, pero que se estimó durante las jornadas de limpieza de las jaulas, donde los animales que consumieron la sustancia, requerían de recambios en menor intervalo de tiempo, circunstancia derivada de un aumento en el consumo de líquidos (poliuria/polidipsia). Considerando que no se hicieron estudios histológicos, sería importante diseñar un estudio que permita hacer exploraciones sobre este aspecto, contemplando los antecedentes del GMS como un aditivo que podría estar asociado a injuria renal.

9.3 Efecto de la Separación materna sobre las tareas de memoria y el laberinto de Barnes

El presente trabajo sugiere que la SMDL no tuvo ningún efecto en el desempeño de tareas de memoria espacial, desarrolladas en el laberinto de Barnes. En líneas generales los animales sometidos a SMDL demostraron tiempos de latencia más largos, sin embargo, estas diferencias no son apreciables a nivel estadístico. Experiencias llevadas a cabo en el grupo de investigación de fisiología comportamental de la Universidad Nacional, mencionan en sus resultados un efecto notorio de la SMDL en cuanto al desarrollo de tareas de memoria, en la prueba del laberinto de Barnes, mostrando incrementos en variables como la latencia, los errores y la distancia recorrida. (Corredor & Dueñas 2015, Ramírez y Dueñas 2014) Además de esto los cambios histológicos descritos para el experimento de Corredor & Dueñas 2014, dan cuenta de cambios en la expresión de proteínas relacionadas con neurogénesis e integridad glial. Adicionalmente el presente experimento incluyó la administración de GMS, que en múltiples investigaciones se ha descrito como una neurotoxina (Beaz & cols 2003, Hermanusen y Tresguerres, 2005, Collison y cols 2011, Kazmi y cols 2018). Se sabe bien que es un promotor de daños apreciables en órganos relacionados con la homeostasis energética y el consumo de alimentos cuando se administra por vía parenteral. Sin embargo, durante el desarrollo de esta investigación se optó por administrar el GMS por vía oral, contemplando las similitudes y diferencias guardadas en el consumo que existe en poblaciones humanas.

Existe un volumen apreciable de literatura que indica la cantidad de impactos negativos bien documentados de la SMDL, a nivel cognitivo. Para este caso en especial, los resultados obtenidos muestran un desempeño más pobre para los animales separados, pero la carencia de significancia estadística, solo hace que se mencionen como tendencia. Si bien los efectos de la separación materna no suelen ser constantes debido a una gran variedad de factores, en este caso se cuentan con antecedentes directos del grupo de investigación en neurofisiología comportamental, donde los resultados fueron soportados por las alteraciones derivadas de una valoración de la tarea espacial en el

laberinto de Barnes (Ramírez y Dueñas 2009, Corredor y Dueñas 2015). Debido a la ausencia en la concordancia de los resultados con los citados aquí, se indago en la literatura actual, las causas de la divergencia en los mismos, para este estudio. En 2012 L. Naudont y cols, usando ratas de la cepa Long Evans, encontraron evidencias de que la privación materna produce alteraciones en actividades cognitivas relacionadas con la corteza prefrontal e hipocampo usando para esto tres pruebas cognitivas y otras a nivel histológico, en áreas relacionadas con las tareas cognitivas evaluadas. De este modo se encontró una respuesta deficiente en las pruebas cognitivas de memoria temporal y tarea de cambio atencional, relacionadas con el uso de la corteza prefrontal, pero en las tareas del laberinto de Morris no se encontró ninguna diferencia significativa (L. Naudont y cols 2012). Otros autores registraron cambios notorios para funciones cognitivas responsables de evocación de memorias, sin haber notado un deterioro específico de las funciones espaciales. Conrad y cols 2010 en su revisión revelaron detalles interesantes sobre los efectos del estrés crónico y el desarrollo de tareas dependientes del hipocampo. Dicha recopilación abarca aspectos relativos al desarrollo de tareas espaciales y presenta cuadros comparativos entre distintas circunstancias que pueden generar cambios en los resultados de las tareas de memoria espacial. (Conrad & cols 2006). De esta manera se realiza una descripción de las variables más significativas, cuando se obtienen resultados negativos en tareas de memoria espacial, bajo un paradigma de estrés crónico. En primer lugar, la autora pone de manifiesto una gran cantidad de variables fisiológicas cuya relevancia permanece consistente a lo largo de los estudios descritos. El estrés crónico puede provocar retracción neuronal importante o deterioro de los árboles dendríticos, situación que se puede acelerar durante el estrés intenso (Conrad & cols 2010). Consecuentemente los efectos pueden llegar a ser variables considerando que los cambios atribuidos al estrés crónico en relación al desarrollo de tarea de memoria espacial requieren de una ventana temporal. Inclusive cuando las condiciones son óptimas y la medición comportamental coincide con la retracción dendrítica, el estrés induce resultados más similares a la reorganización estructural que a la pérdida celular. Otra consideración especial sobre la revisión mencionada alude a la motivación del individuo sometido al estudio de la tarea espacial, considerando más motivantes aquellas que finalizan con una recompensa, como

alimento, que aquellas cuya motivación era netamente aversiva. Si bien se hace una mención muy breve del laberinto de Barnes, es importante notar que realiza un análisis interesante del fenómeno de resultados nulos en pruebas de memoria espacial en el laberinto acuático de Morris, similar en diseño y aplicación al laberinto de Barnes, aunque con diferencias que incluyen la tendencia hacia la navegación dependiente de sectores donde se encuentra la plataforma sumergida y el hecho de que es un laberinto que genera mayores niveles de estrés al ser acuático (Troncoso & cols 2010). Numerosa literatura deja en evidencia que el estrés crónico genera cambios en la búsqueda que se ejecuta por parte del roedor usando la estrategia espacial, pero no parece tener mayores efectos sobre otros tipos de estrategia de búsqueda. También es importante mencionar que durante la ejecución de tareas espaciales cuya estimulación es de tipo aversivo, como lo es el caso del laberinto de Barnes, se da origen a una serie de respuestas fisiológicas de activación de los sentidos, conocidos como “arousal”, donde el roedor parece motivarse más por terminar la tarea espacial en algunos casos. En síntesis, para la autora las evidencias experimentales de efectos nulos del estrés crónico en el desarrollo de tareas espaciales dependen en gran medida de la ventana temporal aplicada, ya que muchos efectos que sirven para explicar este fenómeno, estarían enmarcados dentro de la flexibilidad y dinámica celular del hipocampo, el uso de estrategias de navegación y búsqueda basadas en pistas visuales por sobre la navegación cuyo origen es la memoria espacial (Conrad y Cols 2010).

Haciendo referencia a las investigaciones que usaban un paradigma de estrés crónico, y adicionaron sustancias que podrían generar cambios en la conducta alimentaria en modelos animales, se recopilan las siguientes evidencias:

Recientes investigaciones han relacionado el hecho de que la malnutrición temprana que acompaña la separación, podría tener efectos directos en la regulación energética cerebral mediante la inhibición de la expresión de receptores de insulina, pero que esta alteración puede no generar consecuencias evidentes en la ejecución de pruebas de tarea espacial (Maghami & cols 2018). Durante el desarrollo de un experimento relacionado con mediciones comportamentales y fisiológicas, los autores determinaron en ratas Wistar sometidas bajo un paradigma de SMDL, los niveles de corticosterona e

insulina e hicieron una comparación entre los valores de estas hormonas a nivel plasmático y en órganos como los islotes pancreáticos, y secciones del hipocampo, posterior a la ejecución de tareas espaciales en el laberinto de Barnes (Maghami & cols 2017). Durante la ejecución de la prueba de memoria espacial se observaron diferencias entre las estrategias de búsqueda de los animales del grupo de separación siendo menos eficientes en encontrar la caja de escape, comparados con sus respectivos controles. Sin embargo las latencias relacionadas con los tiempos de ejecución de la prueba no tuvieron una diferencia notable a nivel estadístico, Finalmente, no se pudo encontrar una asociación entre la concentración de insulina en páncreas, sangre e hipocampo, lo cual llevó a la conclusión de que por lo menos en este estudio, la separación materna afecta otras zonas del cerebro relacionadas con funciones cognitivas diferentes al hipocampo, o al sistema de evocación de memoria espacial (Maghami & cols 2017).

Zeeni y cols 2012, también dejaron evidencia en otro estudio similar, haciendo una comparación en los efectos que tenía el consumo de dietas ricas en carbohidratos, dietas de alto tenor lipídico y finalmente dietas con alimentos altamente palatables. En sujetos de la misma cepa, sometidos a estrés crónico, se pudo notar un efecto ansiolítico representado en la medición de neurotrófinas en estudios histológicos, posterior a la realización de pruebas cognitivas y conductuales relacionadas con evaluar comportamientos similares a depresión y ansiedad. Se pudo por lo tanto evidenciar que la dieta de cafetería genera efectos ansiolíticos y antidepresivos en animales sometidos a estrés crónico, con consecuencias directas sobre el tejido adiposo y el incremento del peso corporal. Leffa & cols 2015 corroboran lo encontrado en los estudios anteriormente citados al postular evidencias que sugieren que dietas altamente palatables o “dietas de cafetería” tendrían efectos antidepresivos y ansiolíticos, con la diferencia de que los sujetos usados para este estudio eran ratones machos suizos, además de lo mencionado con el tipo de sujetos y la dieta que se empleó. Es absolutamente diferencial el hecho de que el producto usado para el fin de este estudio es GMS, sin embargo, este compuesto se ha asociado a respuestas hedónicas en algunos estudios previamente citados, además de estar como un componente habitual de alimentos ultraprocesados que conforman lo que denomina colectivamente “dieta de cafetería”

Nguyen y cols 2017, demostraron en un experimento donde se utilizaron dietas calificadas por el autor como “occidentales” es decir con un alto tenor graso y alta palatabilidad, la influencia negativa en el peso y la concentración de neurotransmisores, pero que no afectan labores de tarea espacial en ratas de la cepa Wistar. De este estudio se concluyó que existió una alteración en la expresión de los receptores para dopamina, un aumento de peso corporal, pero no se modificaron conductas de memoria espacial, evaluadas en el laberinto de brazos radiales, modificado con recompensa tardía (Nguyen & cols 2017). Dicha situación de acuerdo con los investigadores pudo ser producto de algunas modificaciones metodológicas atribuibles a la oferta dietaria. Adicionalmente, los mismos autores concluyen que la inclusión de dietas obesogénicas en modelos animales, deja fuera aspectos importantes como las alteraciones del estado de ánimo, condiciones genéticas, sedentarismo y factores de mayor amplitud que son de difícil reproducción en un solo modelo (Nguyen y cols 2017). De este modo, se puede concluir que para el presente experimento, la presencia del GMS no tuvo efectos evidentes asociados a la memoria de trabajo, y la SMDL, de algún modo no afecta de manera significativa dichos aspectos, cuyos determinantes aún quedan por dilucidar.

El presente estudio deja como evidencia el impacto que tienen los eventos de alteraciones tempranas en el sistema de la respuesta fisiológica frente al estrés. Nuevamente la SMDL, genera los mayores cambios y es el factor que tiene más peso en las alteraciones que se observaron al final del estudio. La ausencia de resultados cognitivos está probablemente asociada a factores fisiológicos mencionados anteriormente, donde de acuerdo a la literatura recabada, el estrés crónico tiene efectos muy variables, y el desarrollo de tareas espaciales, requiere no sólo de factores derivados del hipocampo, sino que distintas estrategias de búsqueda por parte de sujetos experimentales, pudiendo ser ejecutadas sólo con el uso de pistas visuales (Conrad & cols 2010). El cuerpo de evidencia, permite correlacionar los eventos negativos a largo plazo y refuerzan aún más los resultados considerando que los efectos metabólicos fueron más determinantes que los cognitivos.

10. Conclusiones

1. El paradigma de estrés crónico generado por la separación materna durante la lactancia (SMDL) no generó cambios evidentes en los patrones de consumo de GMS, cuando se compararon animales separados con los animales que lo consumieron y no se sometieron a dicho paradigma.
2. El estrés crónico generado durante la etapa neonatal parece estar relacionado con un aumento de peso en los animales que además consumieron GMS. Esto en atención a que este aumento de peso pudiera estar ligado a consecuencias metabólicas tardías y permanentes, que, según los hallazgos del presente trabajo, se atribuyen como efectos adjudicados de manera específica al estrés ya que el efecto de la separación materna se evidenció de una forma más notable en esta variable antropométrica.
3. La separación materna durante la lactancia y el consumo de GMS podrían estar asociados a un incremento en el consumo de agua. Esto posiblemente como consecuencia del aumento del consumo del aditivo y un subsecuente estado hiperosmolar de los animales, relacionado directamente con las alteraciones homeostáticas derivadas del estrés crónico. Para este caso, el diseño estadístico sugiere un efecto aditivo de ambas condiciones, y supone una evidencia empírica que debe ser corroborada mediante estudios que permitan evaluar la concentración osmolar de los animales y su regulación de líquidos y electrolitos.
4. La separación materna y el consumo de GMS no generaron alteraciones en el desarrollo de tareas espaciales en el laberinto de Barnes. Este hallazgo es controversial cuando se compara con otros trabajos del grupo de investigación, donde existen evidencias que sugieren que la SMDL sí afecta de manera diferencial la memoria espacial en ratas Wistar macho. Sin embargo, es necesario generar más

propuestas de estudio que permitan profundizar en cambios fisiológicos y tisulares, con el fin de dilucidar más el vínculo que puede tener la SMDL, el consumo de GMS y la memoria espacial.

Propuestas

La propuesta principal sería realizar un estudio histológico en los animales que se sometían a un paradigma experimental muy similar, con el fin de poder fortalecer o rebatir las evidencias empíricas que se observaron en vivo, no solo a nivel comportamental, sino metabólico. De este modo se usarían perfiles tisulares de estructuras encefálicas relacionados con la memoria espacial, órganos de alta actividad metabólica, incluido hígado, tejido adiposo, riñones, glándulas suprarrenales e incluso tejidos gonadales como se ha reportado en la literatura consultada.

Se propone realizar un estudio para indagar los posibles efectos reportados en la literatura sobre el impacto del GMS en la homeostasis del agua y electrolitos, así como el sistema renal y valorar si además, es posible encontrar alguna interacción con eventos de estrés temprano como la separación materna. Dicho estudio incluiría medición por biometría hemática de marcadores como creatinina, BUN (Bóuld ureic nitrogen, nitrógeno ureico sanguíneo), después de una exposición crónica al consumo oral de la sustancia, donde el paradigma incluya o no separación materna y un tiempo más prolongado de consumo de la citada sustancia. Para la validación de los resultados se conducirán estudios de carácter molecular e histológico que permitan valorar daños tisulares que expliquen los cambios de los cuales podrían ser objeto los sujetos de este estudio.

Se sugiere realizar un estudio donde se midan los niveles de radicales libres y antioxidantes en varios tejidos como el hígado, riñón y sistema nervioso, mediante diversas técnicas como la concentración de α Ketoglutarato deshidrogenasa y otros marcadores metabólicos relacionados con el consumo de GMS, mediante técnicas histológicas básicas como inmunohistoquímica y validados con técnicas moleculares como PCR o Western Blot.

Se sugiere realizar una investigación donde se evalué de una forma más profunda o se utilicen otros laberintos para evaluar memoria espacial como el laberinto acuático de Morris, con el fin de determinar el impacto de la SMDL y el consumo de GMS en la memoria espacial.

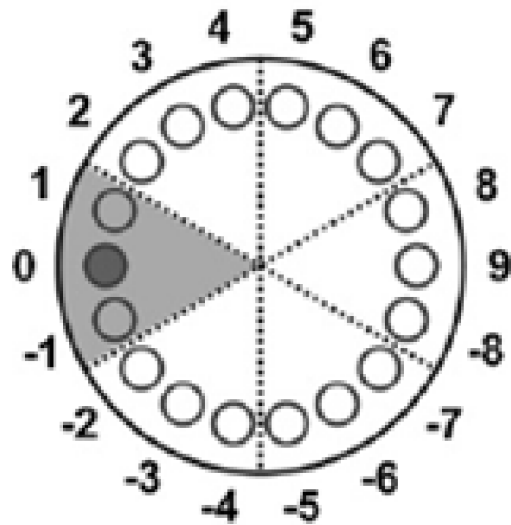
Anexos

Anexo A.



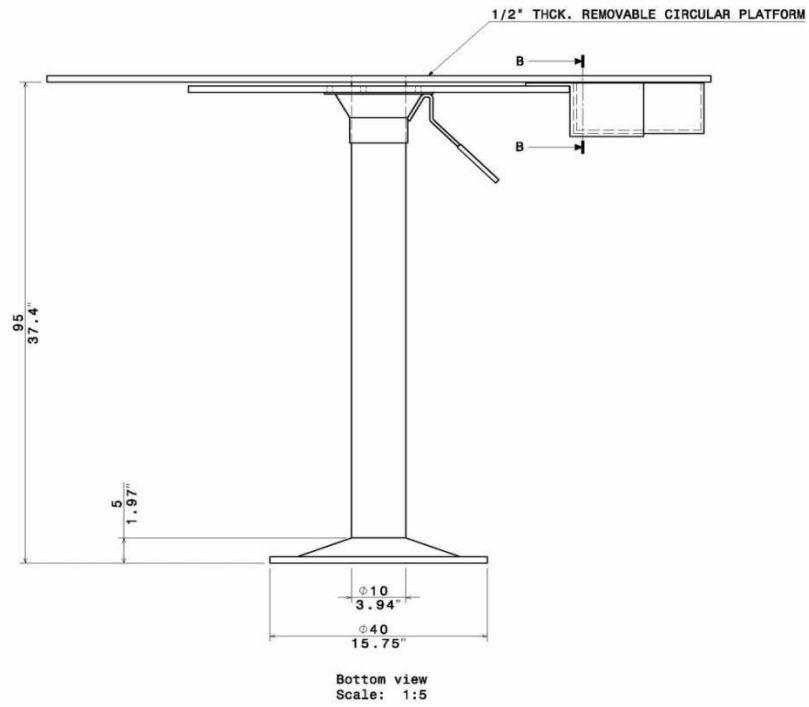
Instrumento empleado durante la prueba de memoria espacial. A. Laberinto circular de Barnes. Vista lateral del laberinto circular de Barnes; se identifican los agujeros del laberinto, la caja de salida sobre el centro de la plataforma y las claves extra laberínticas en las paredes de la sala experimental.

Anexo B.



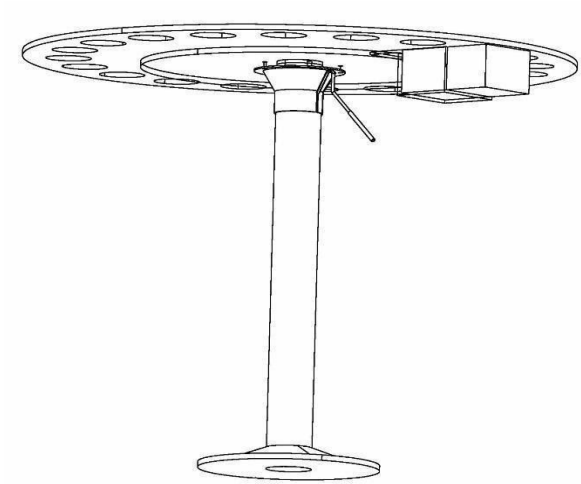
División virtual del laberinto de Barnes por sectores. El área gris representa el sector 1; el área blanca representa el sector 2. La numeración de los agujeros está normalizada con respecto a la distancia del agujero meta (gris oscuro; agujero 0). Figura reproducida de Vargas-López et al (2011).

Anexo C.



Vista lateral del laberinto de Barnes: Medidas sujetas a diferentes protocolos experimentales, recuperado de <https://mazeengineers.com/portfolio/barnes-maze/>, el 29 de septiembre de 2018

Anexo D.



Isometric view
Scale: 1:5

Vista isométrica del laberinto de Barnes. Recuperado de <https://mazeengineers.com/portfolio/barnes-maze/> el 29 de septiembre de 2018

Anexo E.

PROTOCOLO TAREA ESPACIAL DE BARNES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGÍA COMPORTAMENTAL

Nota: Antes de comenzar la aplicación de cada una de las fases del presente protocolo, asegúrese de encender únicamente las lámparas reflectoras de la cabina de experimentación, encender el dispositivo de grabación y el televisor, programar el cronómetro, marcar cada uno de los animales y limpiar el laberinto de Barnes y los elementos propios del laberinto como la caja de salida y caja meta con alcohol diluido al 10%.

DÍA 1

HABITUACIÓN

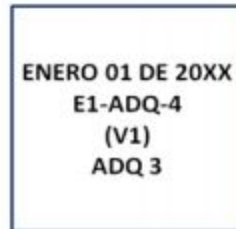
1. Verifique que el animal que vaya a transportar corresponda al programado según la bitácora.
2. Introduzca el animal en la caja de transporte y diríjase a la cabina experimental.
3. Verifique que únicamente la luz roja se encuentre encendida y que la caja de consolidación se encuentre debajo del interruptor cuando usted ingrese a la cabina experimental.
4. Con la puerta cerrada, deje la caja de transporte junto a la caja de consolidación. Saque al animal de la caja de transporte y ubíquelo en la caja de consolidación. Coloque la caja de consolidación sobre la caja de transporte, ubicadas contra la pared abajo del interruptor.
5. Deje al animal en la caja de consolidación por 1 minuto.
6. Retire al animal de la caja de consolidación y déjelo por 2 minutos en la caja meta no emplazada en el laberinto, estando ésta sobre la plataforma del laberinto. Cubra la caja meta no emplazada con el tablero de identificación de los sujetos para evitar que el animal escape.
7. Devuelva al animal a la caja de consolidación y déjelo allí por 1 minuto.

8. Limpie la caja meta con el alcohol diluido al 10% y emplácela en el agujero 1 del laberinto.
9. Nuevamente retire al animal de la caja de consolidación y ubíquelo en la caja meta emplazada a través del agujero del laberinto y déjelo ahí por 2 minutos. Cubra el agujero con el tablero de identificación para evitar que el animal escape.
10. Devuelva al animal a la caja de consolidación y déjelo ahí por 1 minuto. Cuando retire al animal de la caja meta, primero saque la caja meta, póngala sobre el laberinto y luego retire al animal.
11. De nuevo retire al animal de la caja de consolidación y déjelo en la caja de salida por 2 minutos. La caja de salida debe encontrarse en el centro del laberinto.
12. Devuelva al animal a la caja de transporte y regréselo a la caja hogar.
13. Limpie y seque todos los elementos del laberinto con alcohol diluido al 10%.
14. Cuando termine todas las habituaciones programadas para el día y después de limpiar los elementos encienda el extractor de olores durante 10 minutos (durante el tiempo que el animal se encuentre en la cabina, el extractor debe permanecer apagado).

DÍA 2

A partir de este día todas las sesiones inician dejando al sujeto por 2 minutos en la caja de consolidación.

Antes de proceder, revise la parte preliminar de este protocolo. Marque el tablero de identificación de sujetos con la fecha, número del sujeto, color del sujeto y nombre y número del ensayo que vaya a iniciar. Existen 5 clases de ensayos: Adq (adquisición), PCC(prueba con caja), PSC (Prueba sin caja) X (extinción), y PX(Prueba de extinción). Por ejemplo:



En este caso el segundo renglón se refiere al grupo al que pertenece el animal (Estrés 1 hora aplicado antes de la prueba de adquisición) y al número del animal dentro del grupo (sujeto 4). El tercer renglón se refiere a la marca en la cola del animal (una raya verde). El cuarto renglón se refiere a que este es el ensayo 3 de la fase de adquisición

ENTRENAMIENTO

ADQUISICION

1. Deje al animal en la caja de consolidación por dos minutos.
2. Salga de la sala experimental durante este intervalo, asegúrese de dejar la puerta completamente cerrada.
3. Verifique que el dispositivo de grabación se encuentre encendido e inicie la grabación.
4. Retire al animal de la caja de consolidación y ubíquelo en la caja de salida durante 30 segundos.
5. Al finalizar los 30 segundos, encienda los reflectores y la fuente de sonido. Levante la caja de salida y deje al animal sobre el laberinto por 240 segundos o hasta que introduzca las tres cuartas partes anteriores de su cuerpo dentro del agujero que contiene la caja meta.
6. Si luego de los 240 segundos el animal no ha ingresado a la caja meta, introdúzcalo dentro del agujero que contiene la caja meta y apague las luces y la fuente de sonido.
7. Después de cada ingreso, el animal debe permanecer en la caja meta por un minuto. En caso de que el animal se salga de la caja antes de completar 1 minuto, retírelo directamente del laberinto y póngalo en la caja de consolidación para dar por terminado el ensayo.
8. Una vez completado 1 minuto, retire al animal de la caja meta, sacando primero la caja y luego retirando al animal y déjelo en la caja de consolidación por 4 minutos, este será el periodo inter-ensayo.

9. Durante el periodo inter-ensayo limpie y seque bien el laberinto y cada uno de sus agujeros, al igual que la caja meta y la caja de salida, con alcohol diluido al 10%. Durante este periodo inter-ensayo el examinador debe salir de la cabina por lo menos 1 vez.
10. Repita los pasos 4-9, siete veces más.
11. En el último ensayo, retire al animal de la caja meta y ubíquelo en la caja transporte.
12. Regrese al sujeto a la caja hogar.
13. Limpie y seque bien el laberinto y cada uno de sus agujeros, al igual que la caja meta y la caja de salida, con alcohol diluido al 10%.
14. Cuando termine el entrenamiento y después de limpiar los elementos del laberinto, encienda el extractor de olores durante 10 minutos (durante el tiempo que el animal se encuentre en la cabina, el extractor debe permanecer apagado).

NOTA

1. Si el animal se cae del laberinto, pause el cronómetro, levántelo del piso, ubíquelo en la mitad del laberinto y reanude el cronómetro, todo esto manteniendo las luces y la fuente de sonido encendidas.
2. Un animal es excluido del análisis cuando:
 1. Se cae de la plataforma tres veces consecutivas.
3. Después de que, en el ensayo sexto, incluido, siempre haya cumplido el tiempo máximo de exploración (240seg.).

DIA 3

PRUEBAS DE APRENDIZAJE:

Prueba con caja

Antes de iniciar revise que la caja esté emplazada en el agujero meta del entrenamiento.

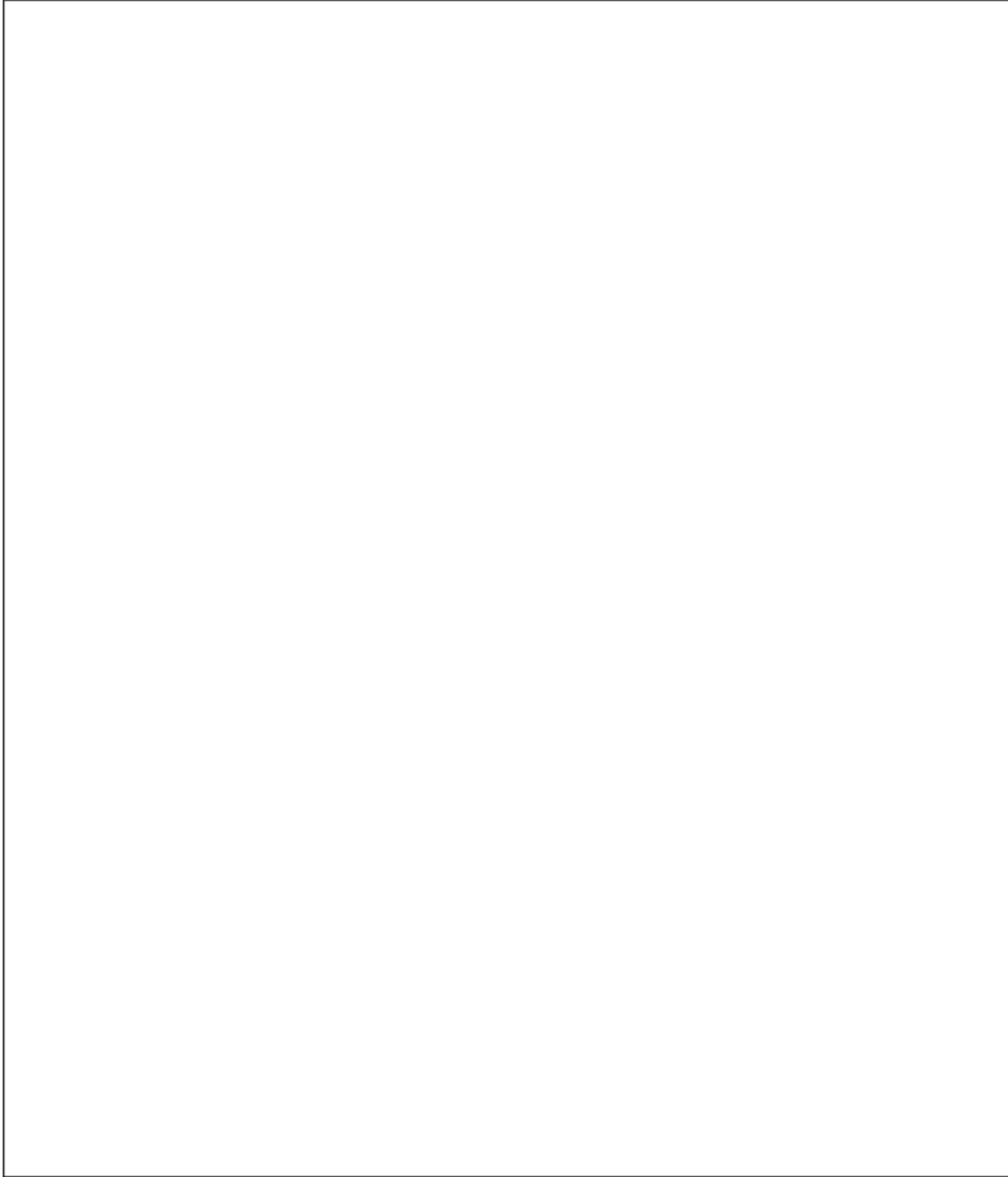
1. La prueba con caja se realiza de la misma manera en que se realiza un ensayo de entrenamiento.
2. Una vez finalizada la prueba con caja, el animal es devuelto a la caja de transporte y a la caja hogar.

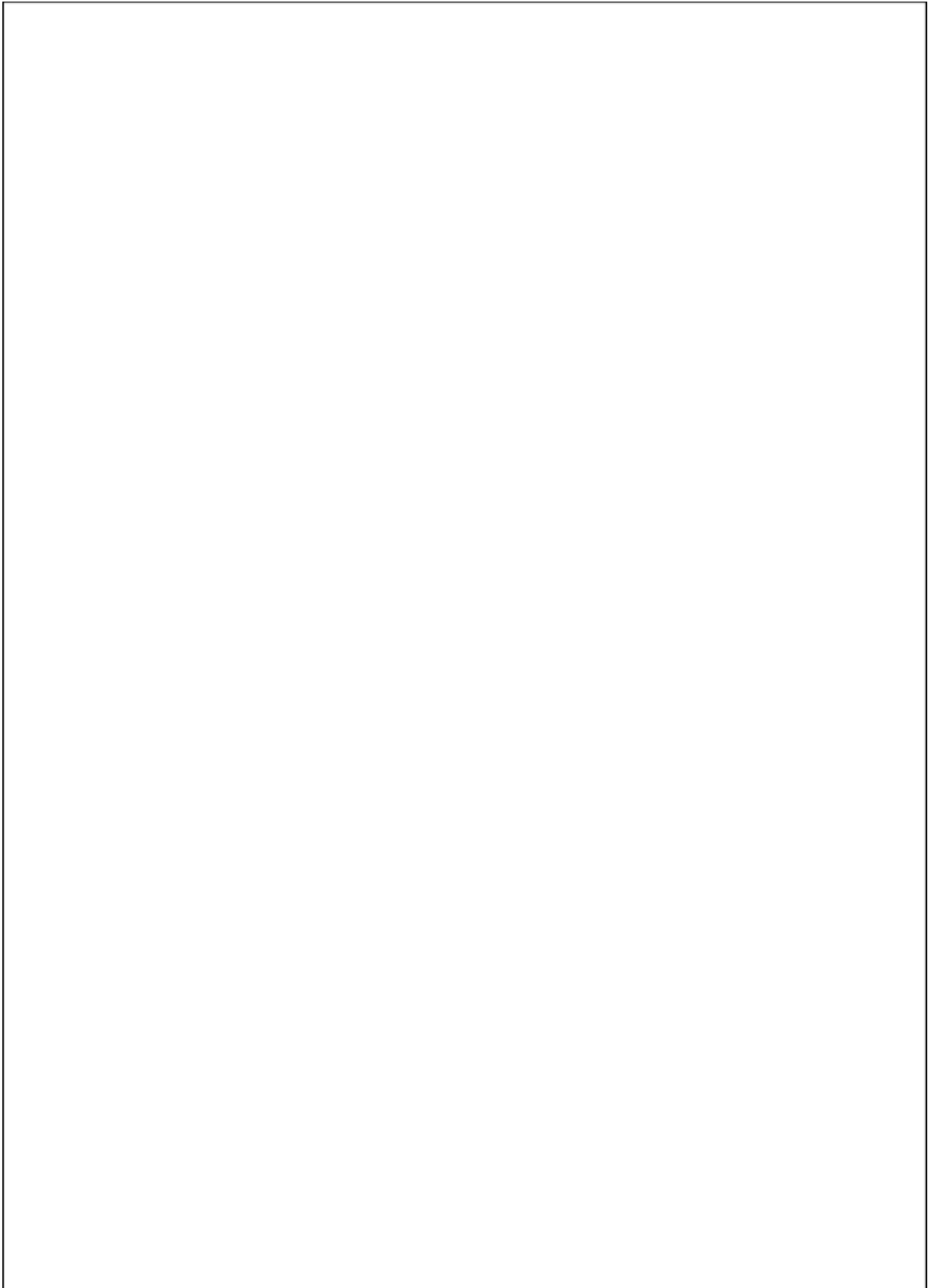
Prueba sin caja

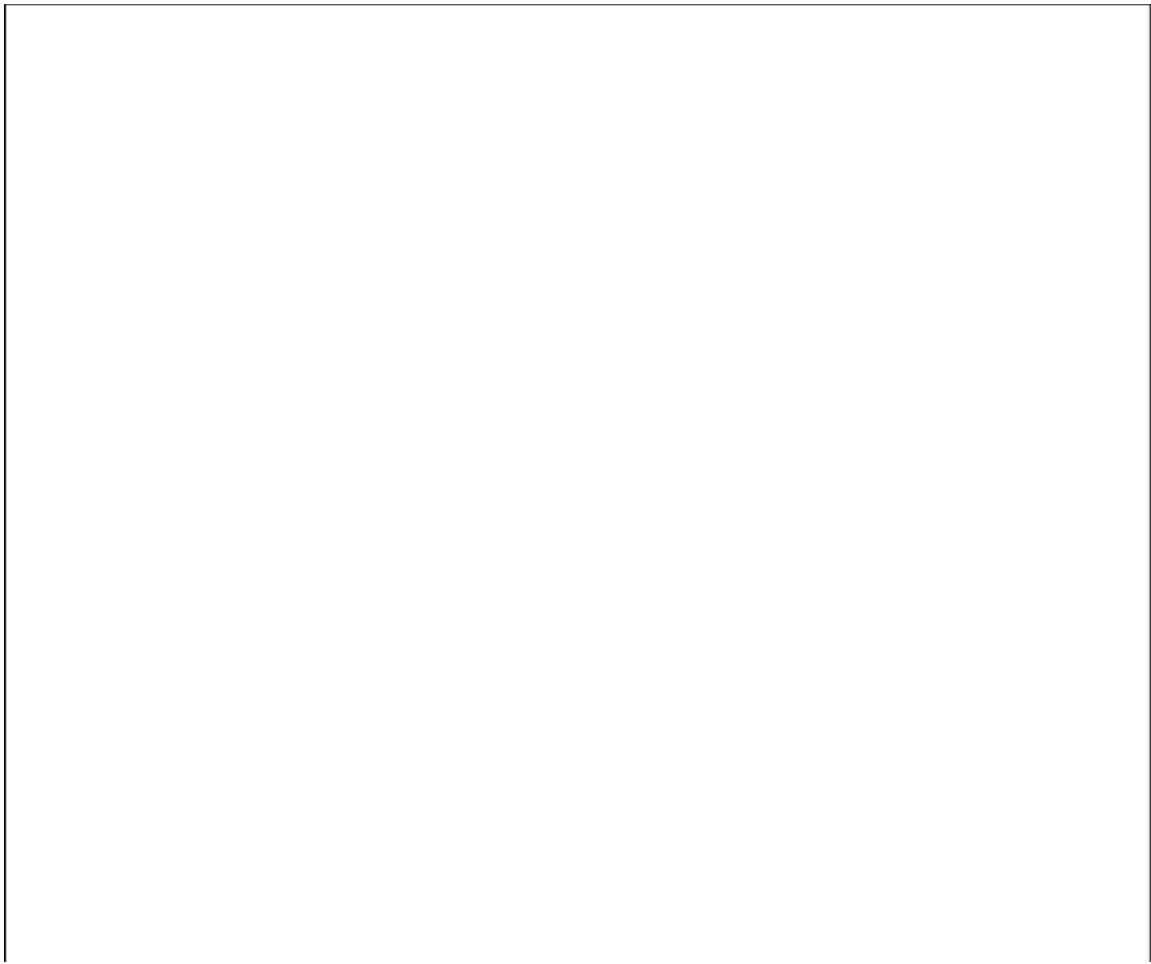
Antes de iniciar asegúrese de que la caja meta NO esté emplazada en ningún agujero.

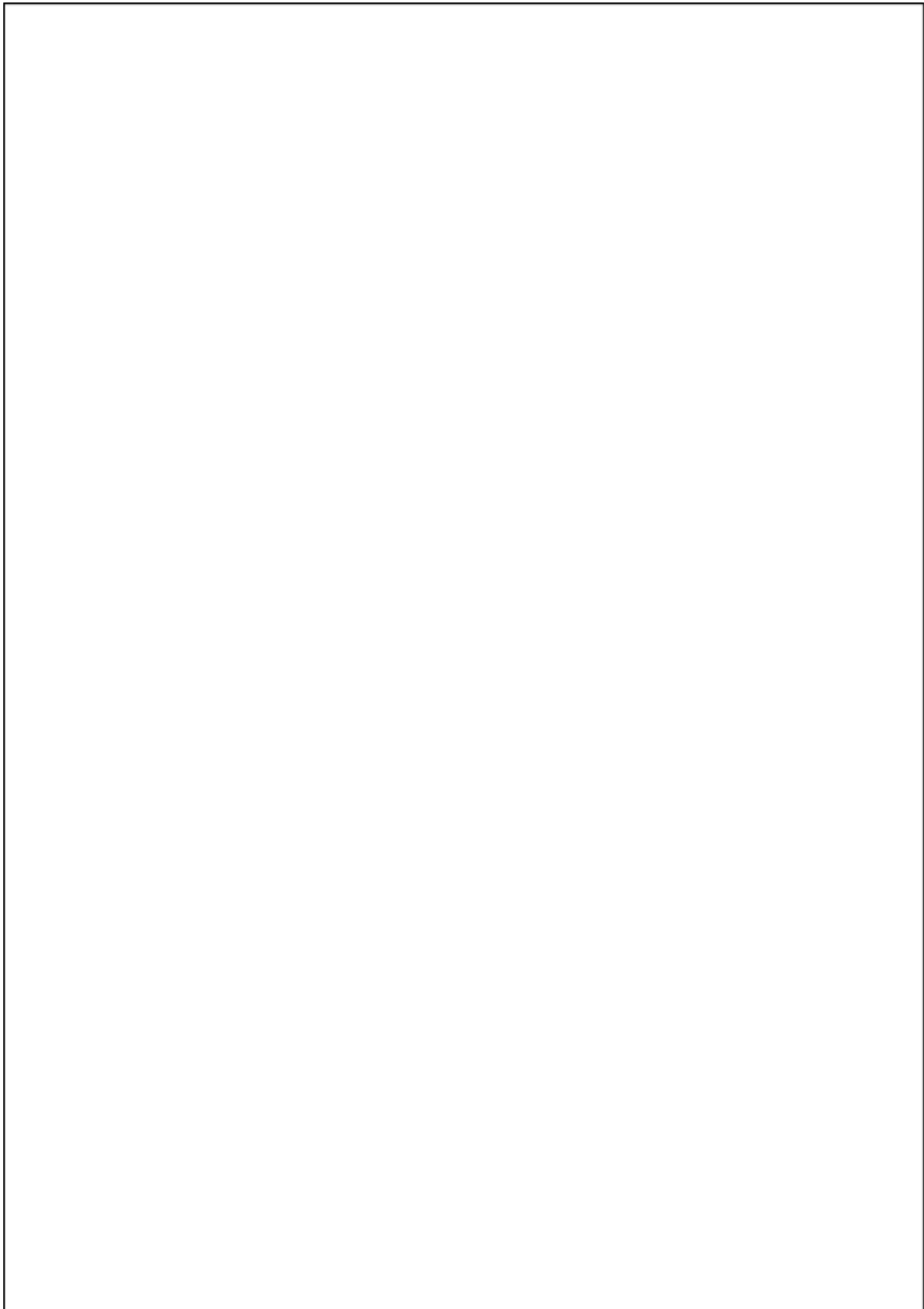
1. Deje al animal en la caja de consolidación por dos minutos.
2. Salga de la sala experimental durante este intervalo, asegúrese de dejar la puerta completamente cerrada.
3. Verifique que el dispositivo de grabación se encuentre encendido e inicie la grabación.
4. Retire al animal de la caja de consolidación y ubíquelo en la caja de salida durante 30 segundos.
5. Al finalizar los 30 segundos, encienda los reflectores, la fuente de sonido, levante la caja de salida y deje al animal en el laberinto por 240 segundos.
6. Si el animal se cae, recójalo del piso, pause el cronómetro, devuélvalo al centro del laberinto y reanude el cronómetro.
7. Al finalizar los 240 segundos, apague la luz, retire al animal del laberinto, ubíquelo en la caja de transporte y regrese a caja hogar.

Anexo F. Variable Peso











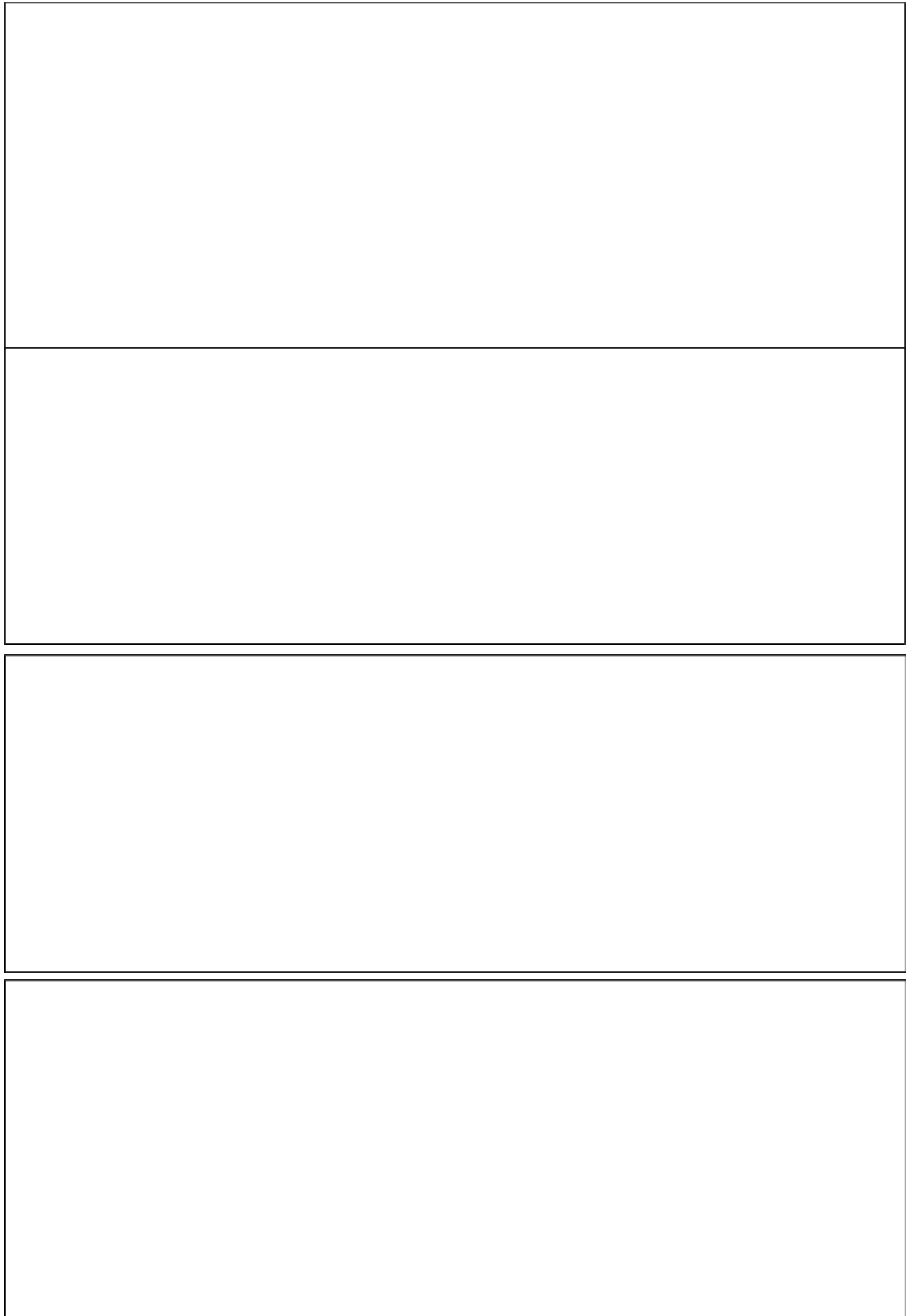


Anexo G. Peso intergruppal

--

--

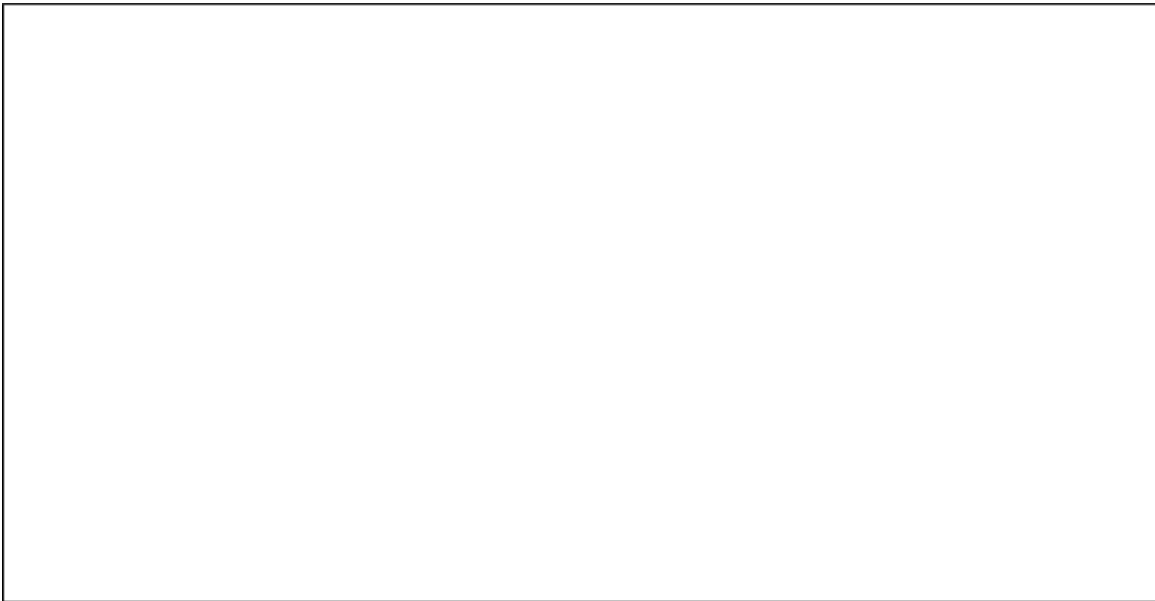
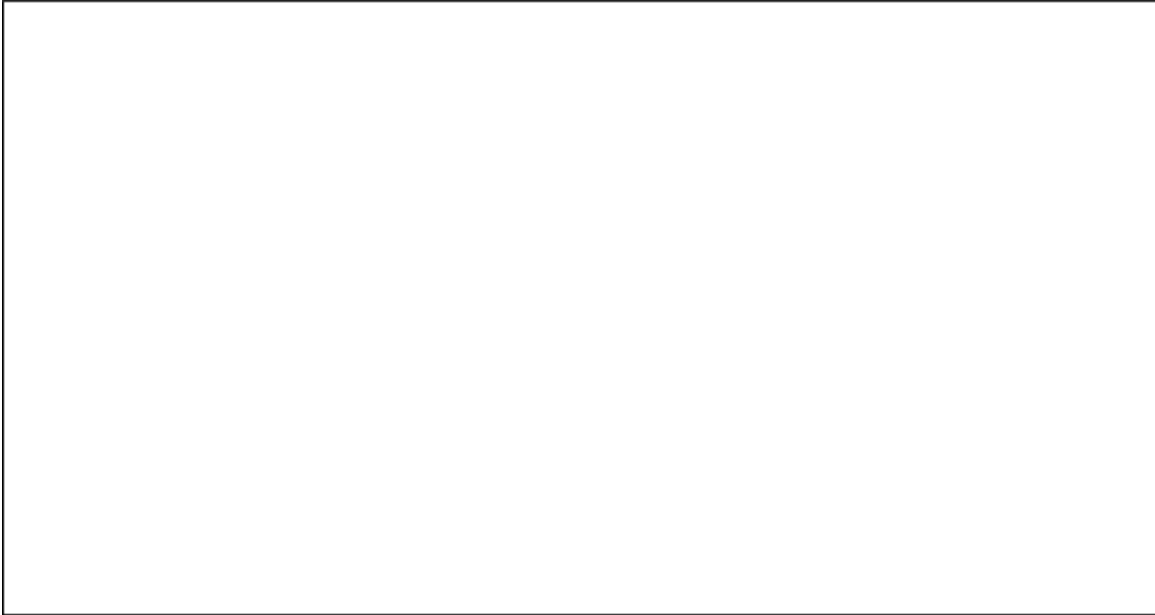
--



--

--

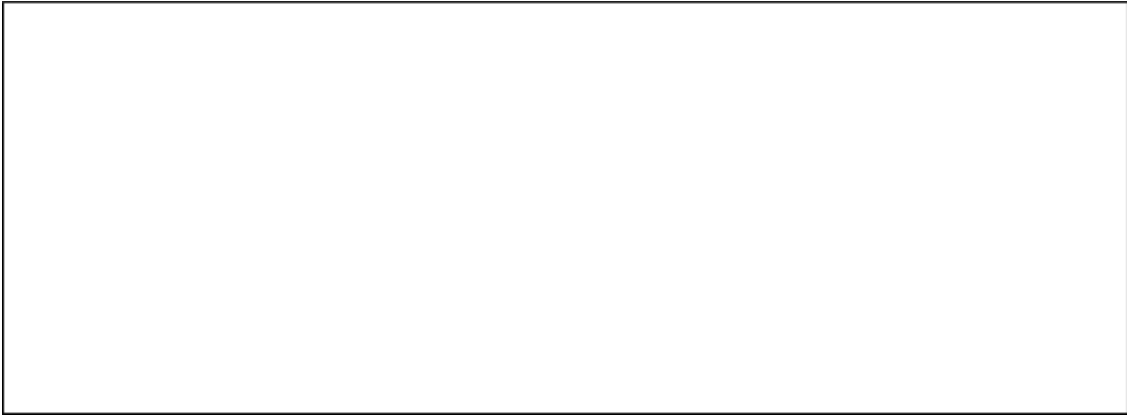
--



Anexo H. Consumo de agua, comparación entre grupos durante el experimento

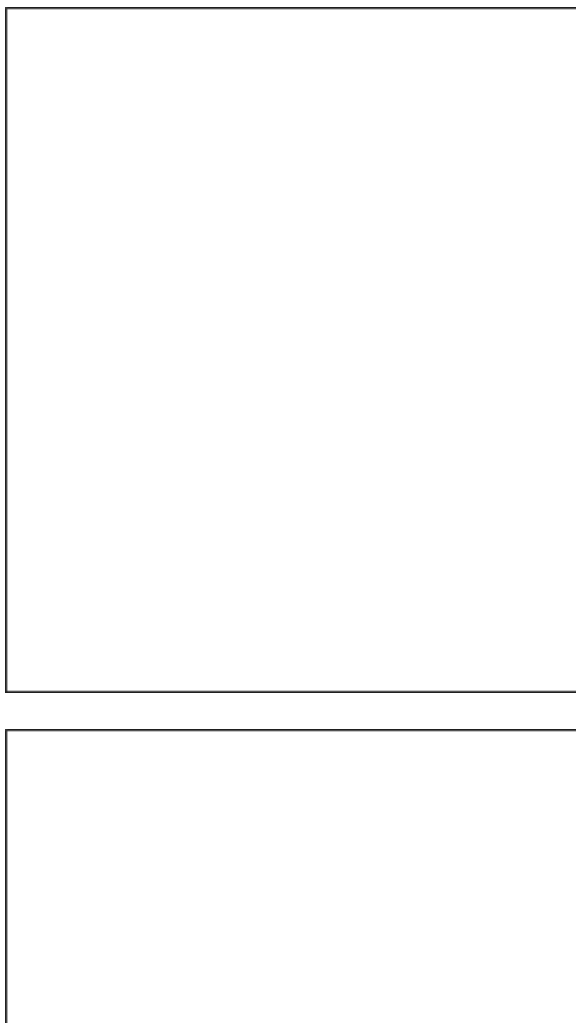


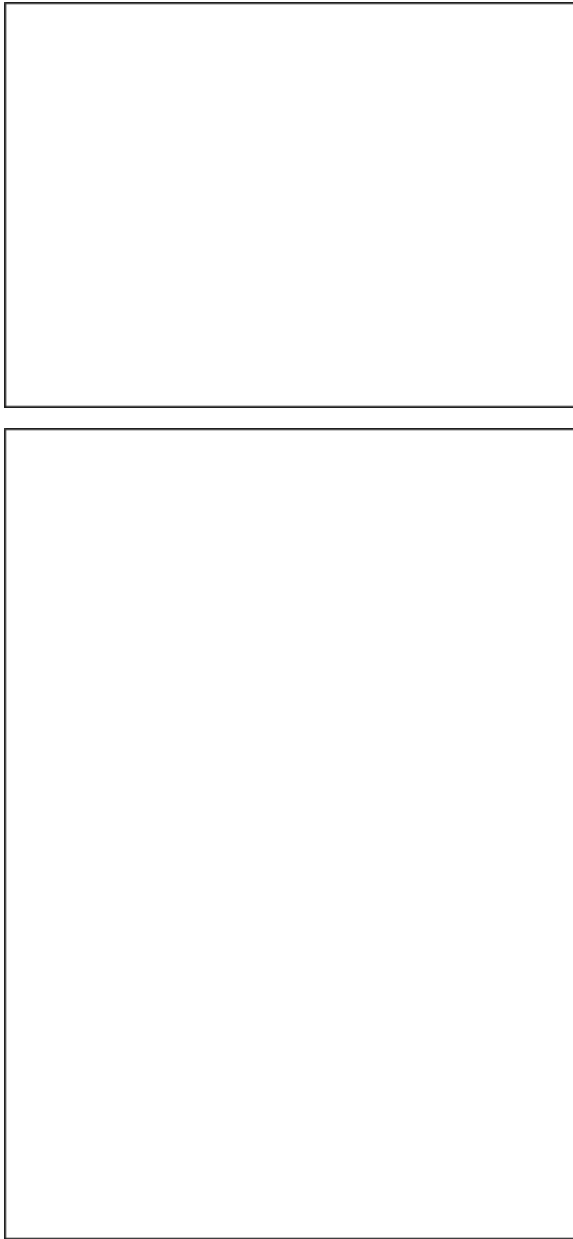
Anexo I. Consumo de glutamato, comparación entre grupos durante el experimento



Anexo J. Consumo de concentrado, comparación entre grupos durante el experimento

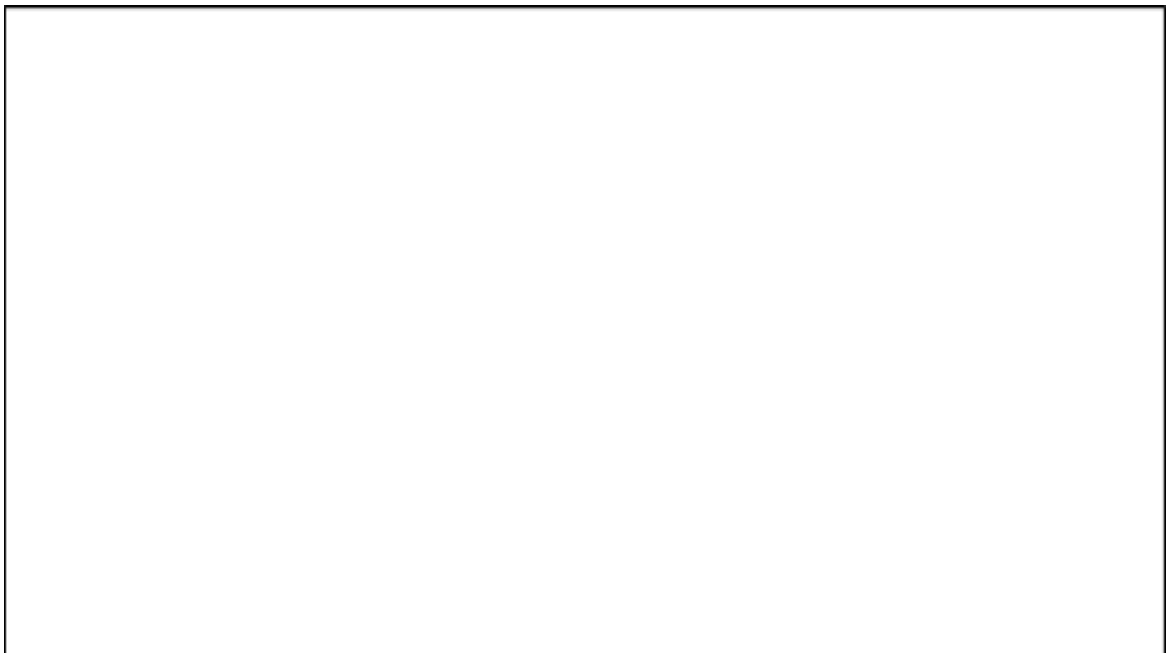


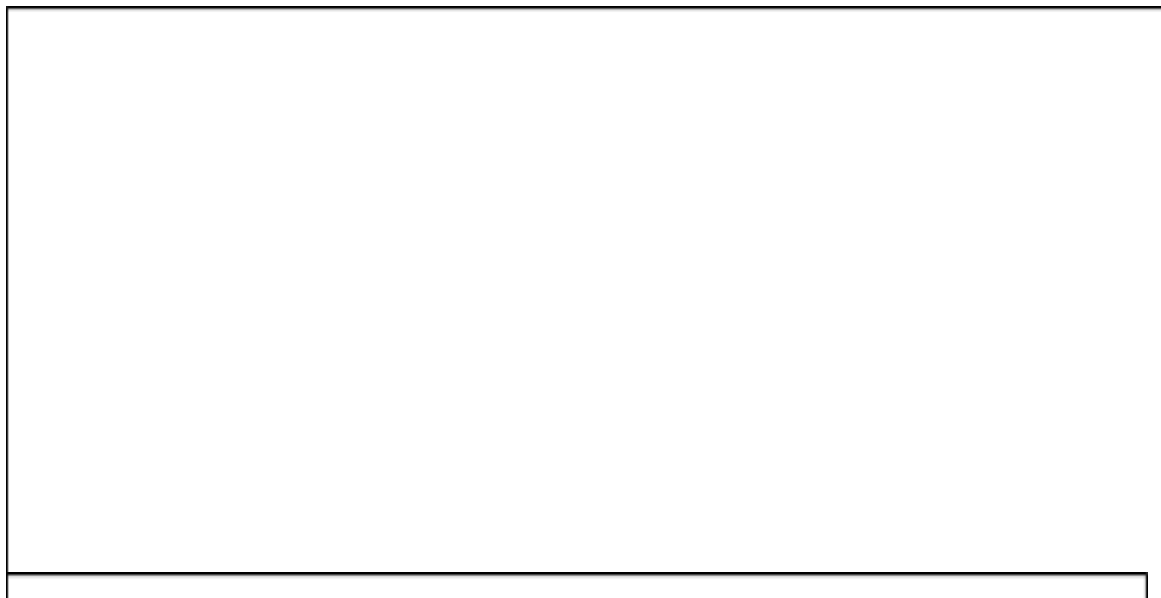


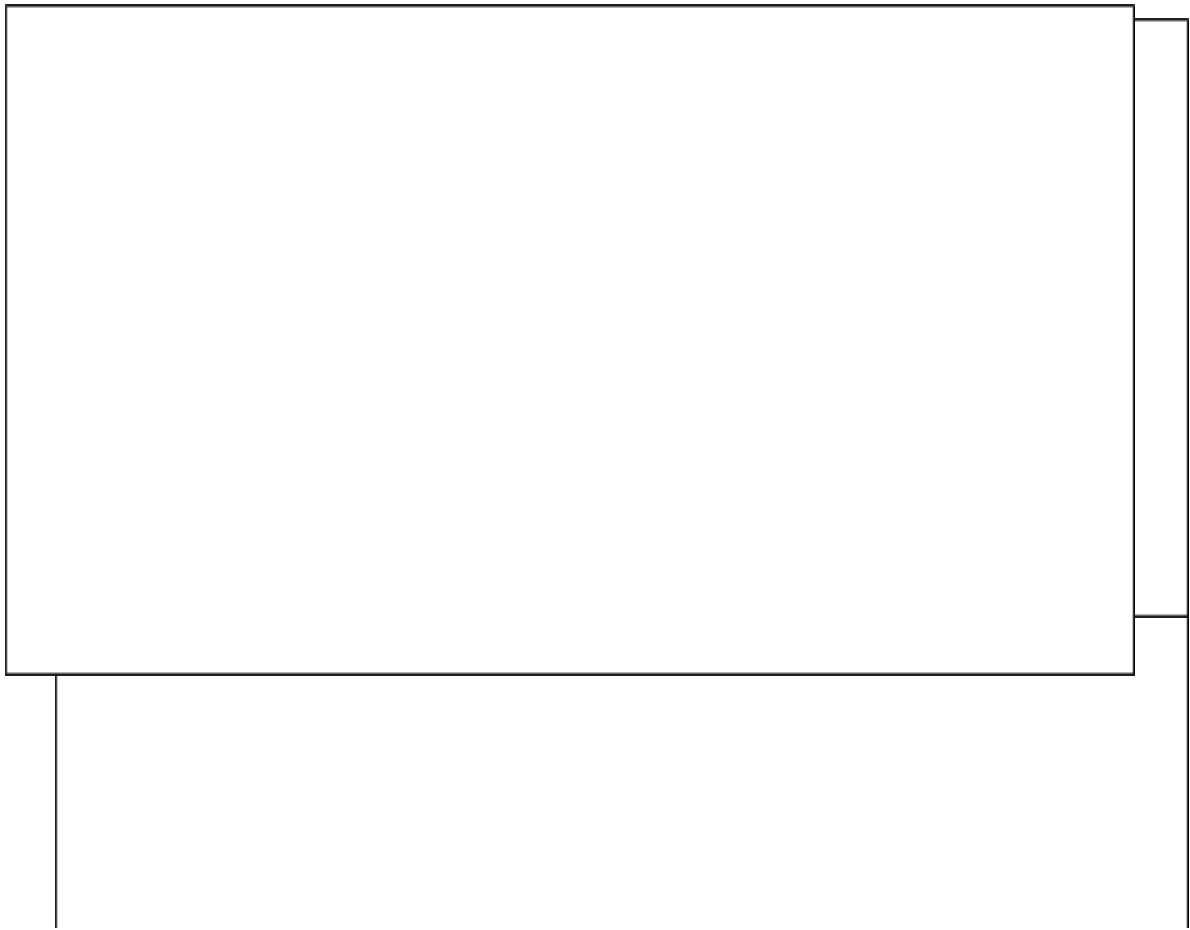




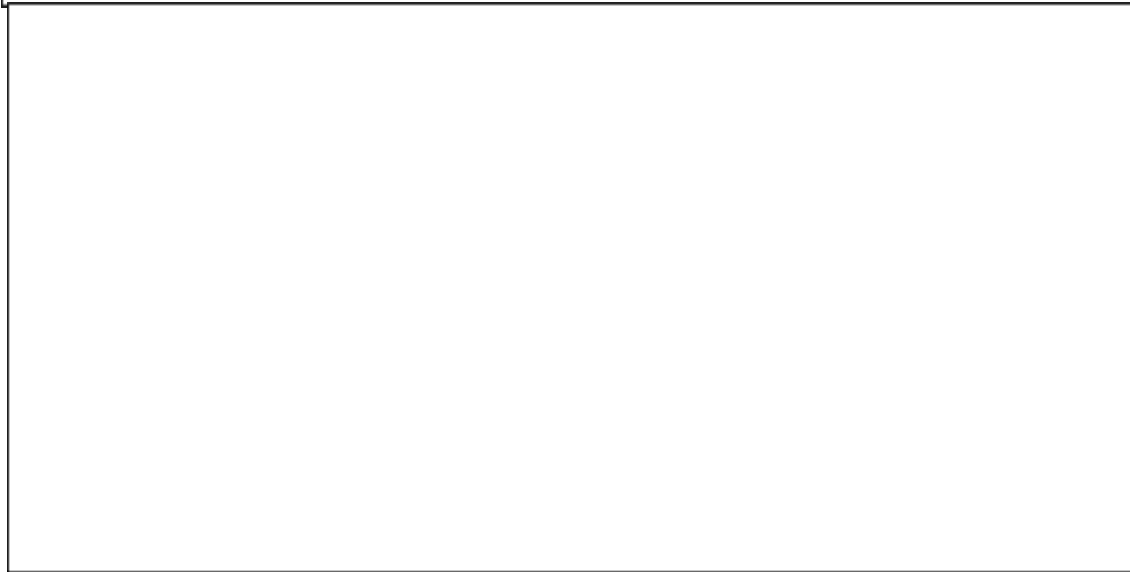
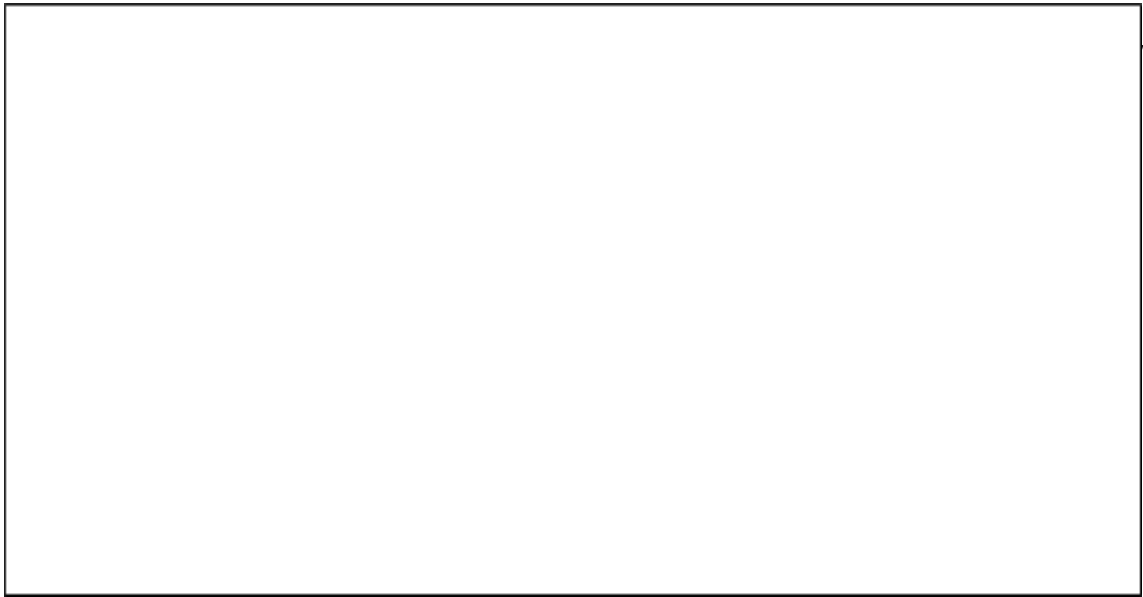


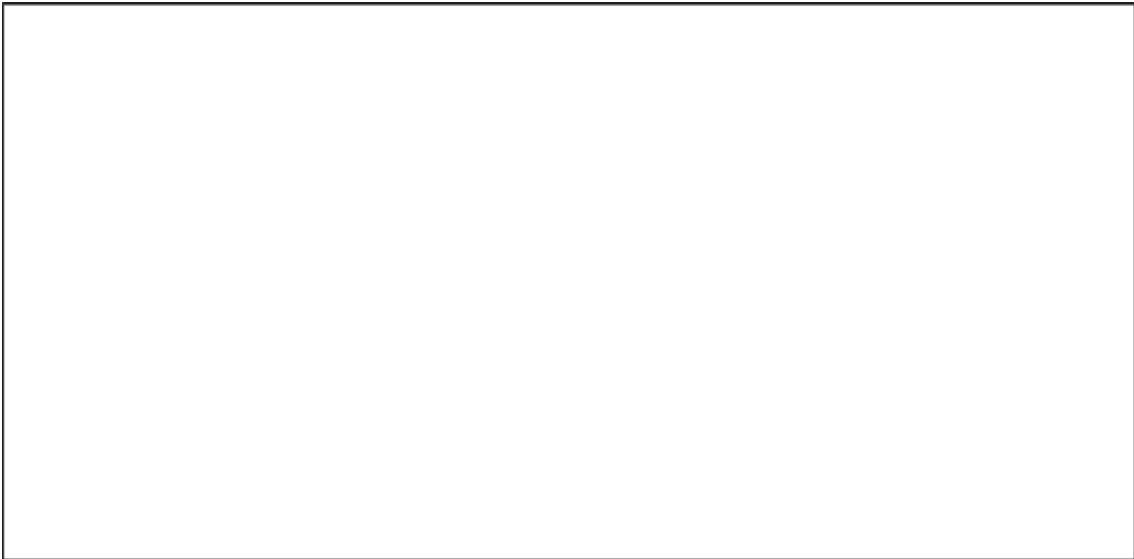


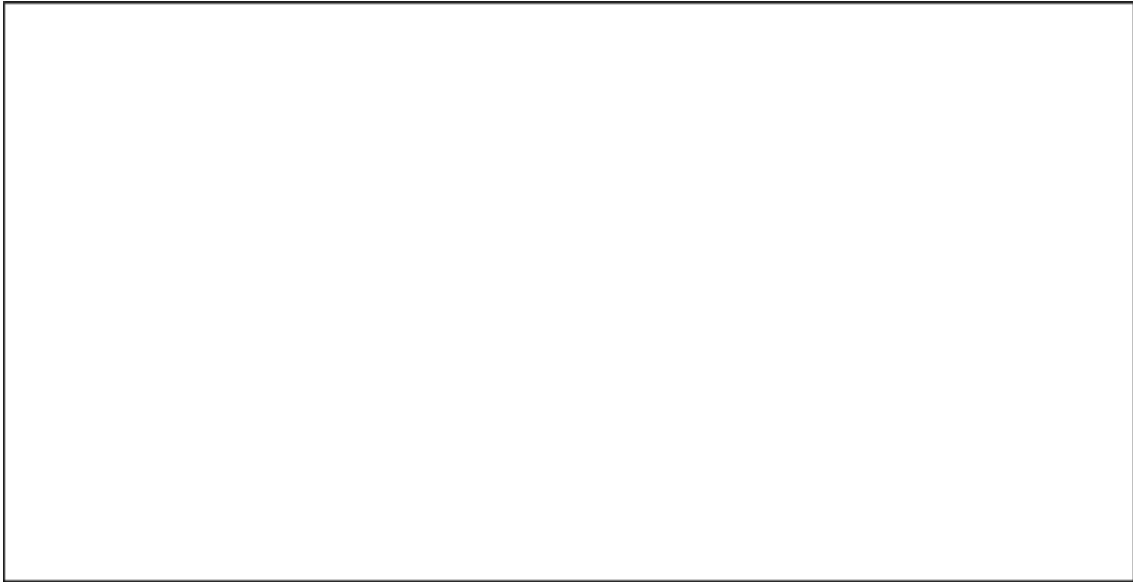




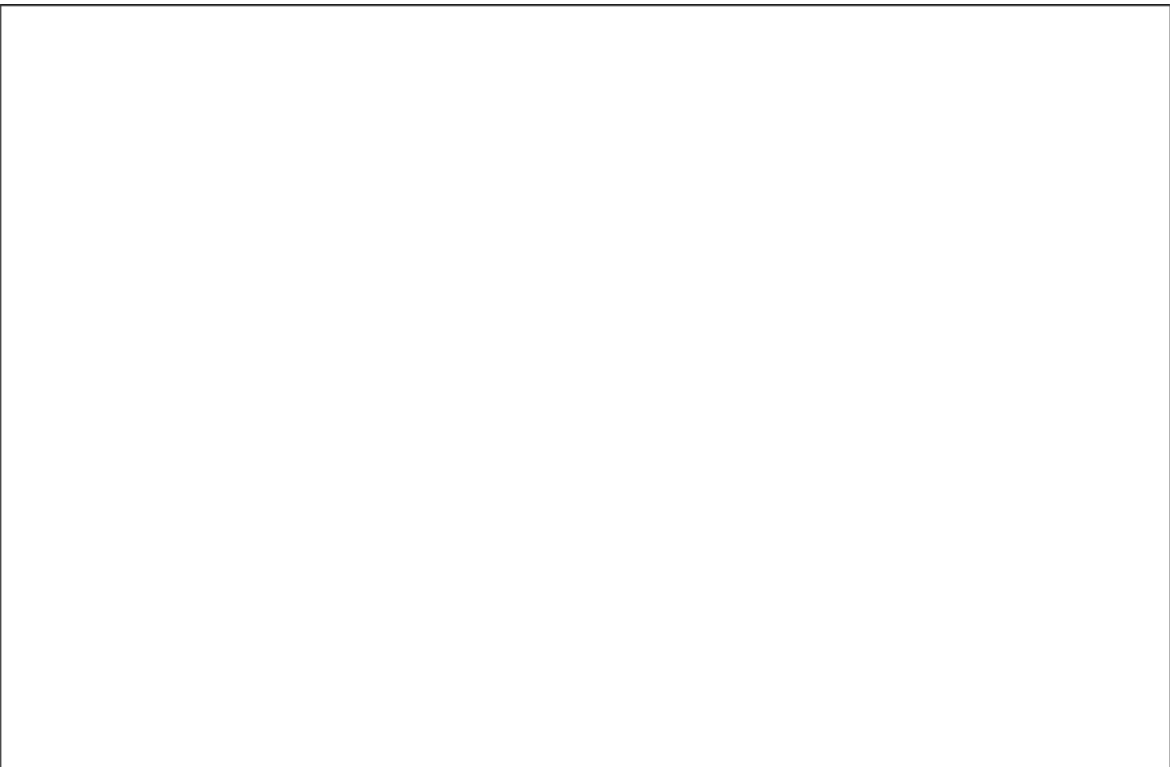
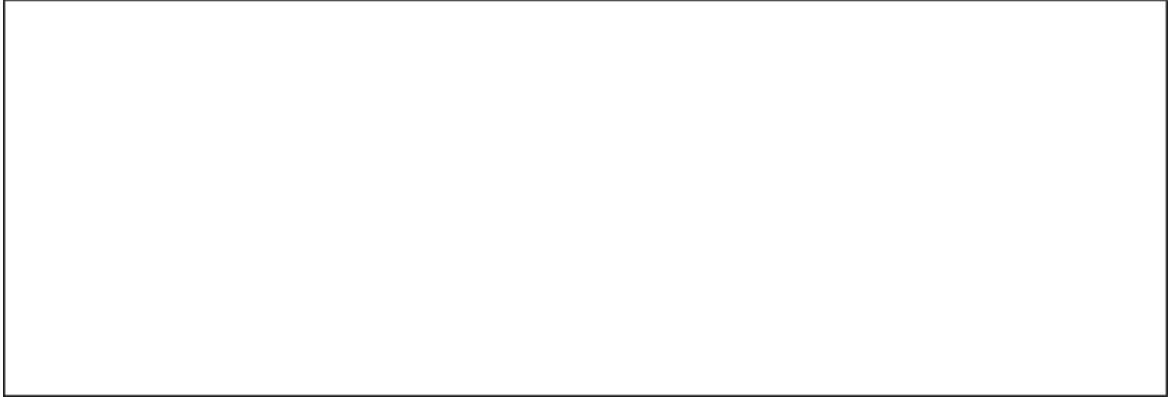


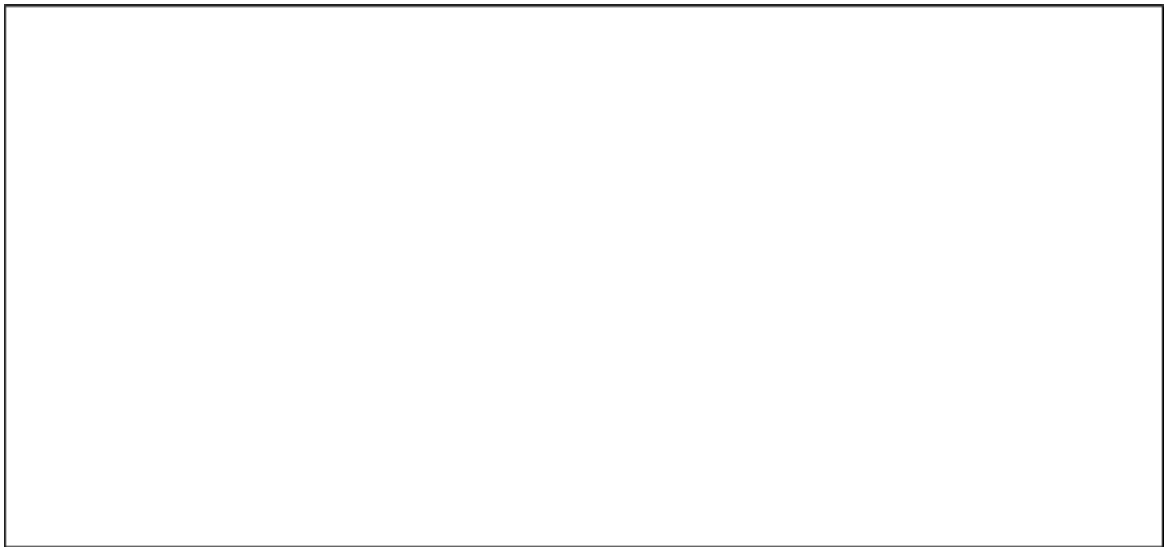
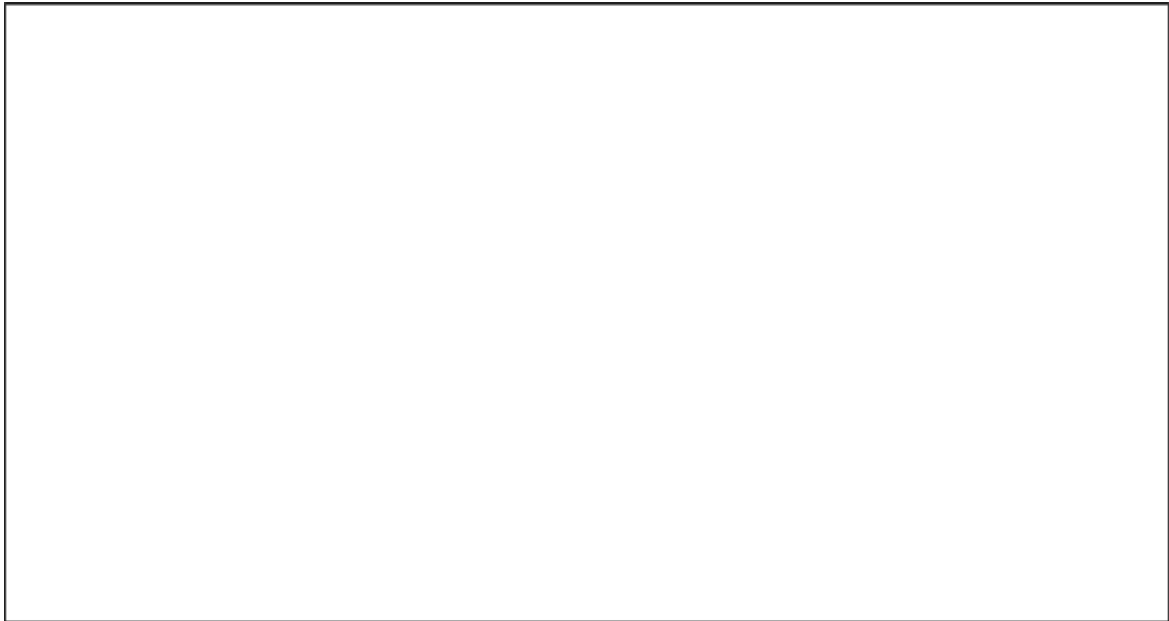


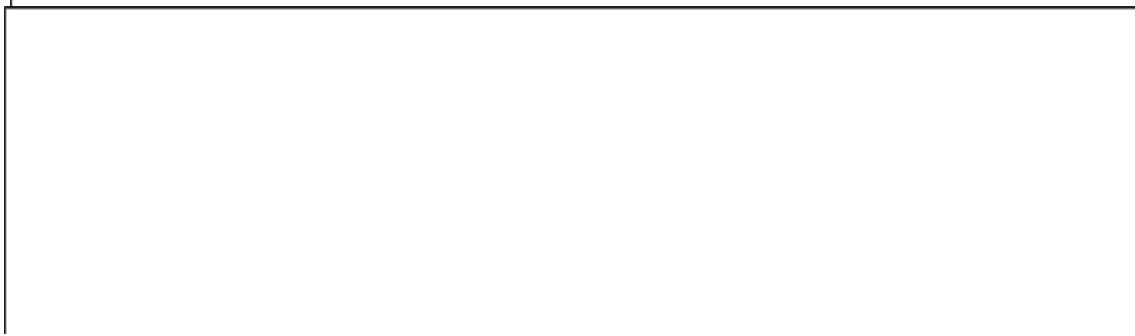
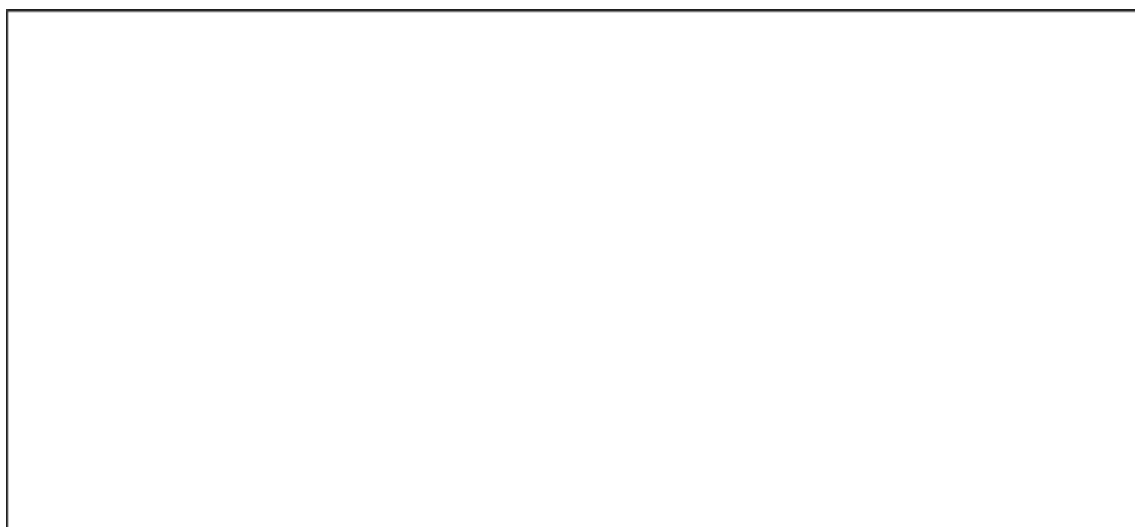


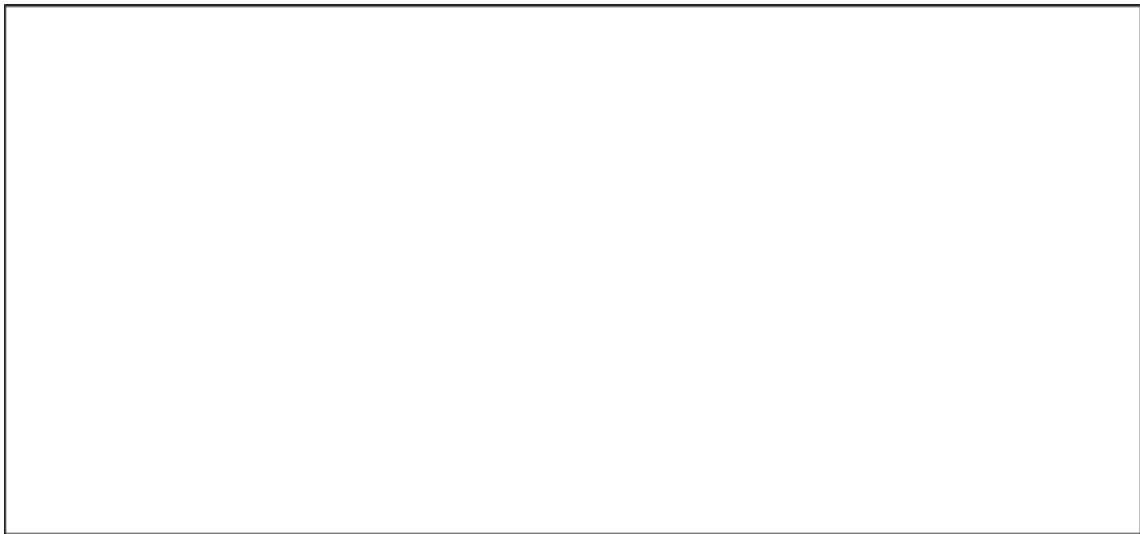


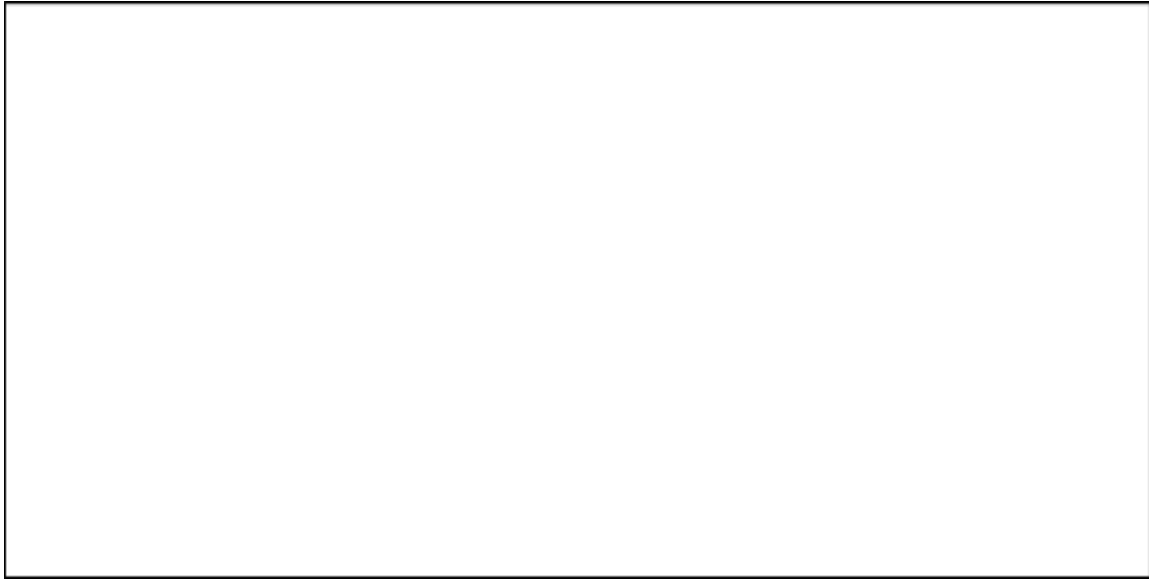
Anexo L. Resultados comportamentales prueba de retención con caja











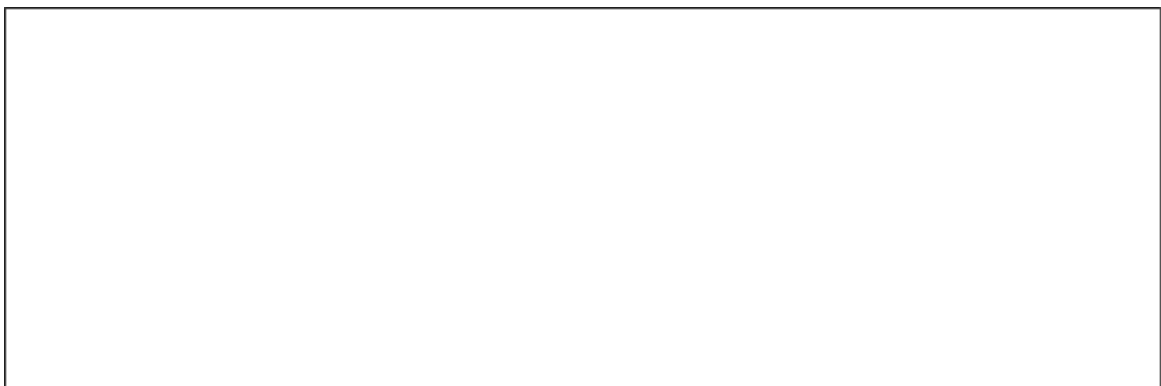
Anexo M. Resultados comportamentales, prueba de retención sin caja

--

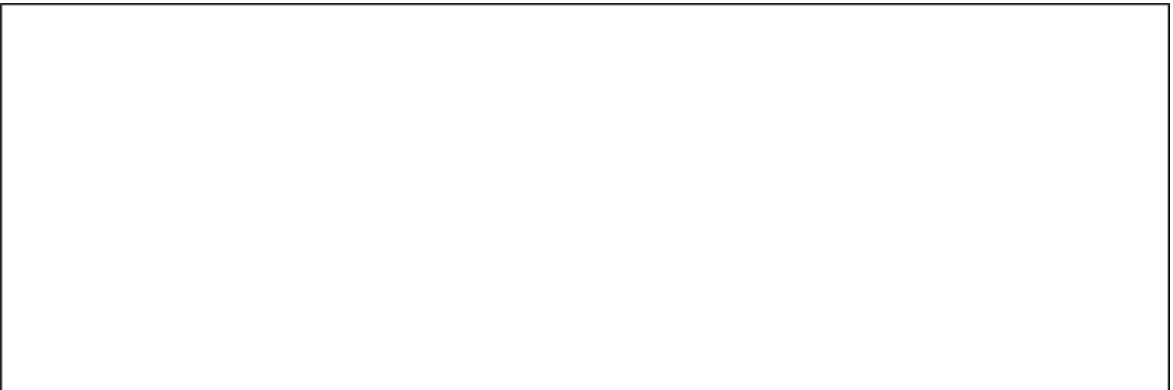
--

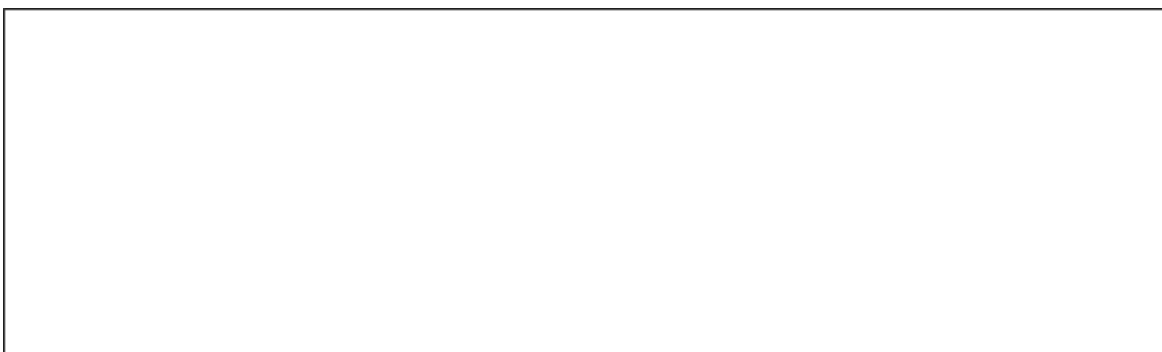
--

--









Bibliografía

1. Abu-Taweel, G., A., Z., Ajarem, J. and Ahmad, M. (2014). Cognitive and biochemical effects of monosodium glutamate and aspartame, administered individually and in combination in male albino mice. *Neurotoxicology and Teratology*, 42, pp.60-67.
2. Al-Azawi, M., Altattan, D., Khamis, S., & AbuKhader, M. (2018). Examining the use of taste enhancers in instant noodles and public perception of monosodium glutamate in Muscat, Oman. *Current Nutrition & Food Science*, 14. doi: 10.2174/1573401314666180820153837
3. Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Río, J. and Ramírez, M. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32(3), pp.256-266.
4. Aisa, B., Elizalde, N., Tordera, R., Lasheras, B., Del Río, J. and Ramírez, M. (2009). Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: Implications for spatial memory. *Hippocampus*, 19(12), pp.1222-1231.
5. Arborelius, L. and Eklund, M. (2007). Both long and brief maternal separation produces persistent changes in tissue levels of brain monoamines in middle-aged female rats. *Neuroscience*, 145(2), pp.738-750.
6. Aya-Ramos, L., Contreras-Vargas, C., Rico, J. and Dueñas, Z. (2017). Early maternal separation induces preference for sucrose and aspartame associated with increased blood glucose and hyperactivity. *Food & Function*, 8(7), pp.2592-2600.
7. Aya, L., Dueñas Z (2015) Efecto de la separación maternal durante la lactancia en ratas, sobre el consumo de edulcorantes, el peso corporal y la locomoción. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

- 8 .Bach, M., Hawkins, R., Osman, M., Kandel, E. and Mayford, M. (1995). Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal ltp in the range of the frequency. *Cell*, 81(6), pp.905-915.
9. Banqueri, M., Méndez, M., & Arias, J. (2017). Spatial memory-related brain activity in normally reared and different maternal separation models in rats. *Physiology & Behavior*, 181, 80-85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.09.007>
10. Barnes, C. (1979). Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93(1), pp.74-104.
10. Barnes, C., Nadel, L. and Honig, W. (1980). Spatial memory deficit in senescent rats. *Canadian Journal of Psychology/Revue canadienne de psychologie*, 34(1), pp.29-39.
11. Bautista, E. and Dueñas, Z. (2012). Maternal separation during breastfeeding induces changes in the number of cells immunolabeled to GFAP. *Psychology & Neuroscience*, 5(2), pp.207-213.
12. Bischof, H. (2007). Behavioral and neuronal aspects of developmental sensitive periods. *NeuroReport*, 18(5), pp.461-465.
13. Boccia, M. and Pedersen, C. (2001). Brief vs. long maternal separations in infancy: contrasting relationships with adult maternal behavior and lactation levels of aggression and anxiety. *Psychoneuroendocrinology*, 26(7), pp.657-672.
- 14 .Boonnate, P., Waraasawapati, S., Hipkaeo, W., Pethlert, S., Sharma, A., Selmi, C., Prasongwattana, V. and Cha'on, U. (2015). Monosodium Glutamate Dietary Consumption Decreases Pancreatic β -Cell Mass in Adult Wistar Rats. *PLOS ONE*, 10(6), p.e0131595.
15. Bowlby J. *Maternal care and mental health* 2 Ed, Northvale NJ, London, Jarson Aronson, 1995.
- 16 .Buwalda, B., Blom, W., Koolhaas, J. and van Dijk, G. (2001). Behavioral and physiological responses to stress are affected by high-fat feeding in male rats. *Physiology & Behavior*, 73(3), pp.371-377.
17. Caicedo M, Dueñas Z. (2015) Efectos del estrés inducido por separación materna durante la lactancia. Evaluación de probables mecanismos involucrados en la

- expresión diferencial asociada al género. Doctorado thesis, Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá.
18. Caicedo.M., Dueñas Z., & Torner L. (2017). Global Effects of Early Life Stress on Neurons and Glial Cells. *Current Pharmaceutical Design*, 23(39), 6042-6049. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612823666170224111641>
 19. Cárdenas, F. P., Lamprea, M. R., & Morato, S. (2005). XPIoRat v.3.5. Beta Para Windows. Universidade de São Paulo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Ribeirão Preto, Brasil. Available via DIALOG. <<http://www.oocities.org/xplorat/>>. Accessed 27 Feb 2018.
 20. Champagne, F., Francis, D., Mar, A., & Meaney, M. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiology & Behavior*, 79(3), 359-371.
 21. Collison, K., Makhoul, N., Inglis, A., Al-Johi, M., Zaidi, M., Maqbool, Z., Saleh, S., Bakheet, R., Mondreal, R., Al-Rabiah, R., Shoukri, M., Milgram, N. and Al-Mohanna, F. (2010). Dietary trans-fat combined with monosodium glutamate induces dyslipidemia and impairs spatial memory. *Physiology & Behavior*, 99(3), pp.334-342.
 22. Conrad, C. (2010). A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(5), pp.742-755.
 23. Conrad, C., McLaughlin, K., Huynh, T., El-Ashmawy, M. and Sparks, M. (2012). Chronic stress and a cyclic regimen of estradiol administration separately facilitate spatial memory: Relationship with hippocampal CA1 spine density and dendritic complexity. *Behavioral Neuroscience*, 126(1), pp.142-156.
 24. Contini, M., Fabro, A., Millen, N., Benmelej, A. and Mahieu, S. (2017). Adverse effects in kidney function, antioxidant systems and histopathology in rats receiving monosodium glutamate diet. *Experimental and Toxicologic Pathology*.
 25. Corsini, N., Kettler, L., Danthiir, V., & Wilson, C. (2018). Parental feeding practices to manage snack food intake: Associations with energy intake regulation in young children. *Appetite*, 123, 233-240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2017.12.024>
 26. Cotrell C y Selk R J, Prenatal Stress, Glucocorticoids and the proگرامing of adult disease. 2009, Behavioral Frontiers in neuroscience, Frontiers.

27. C.W Nogueira, Suzan G. Rosa a , Juliana T. Da Rocha a , Bibiana M. Gai a , Cristiani F. Bortolatto a , Marta Maria M.F. Duarte b (2014). Monosodium glutamate, a food additive, induces depressive-like and anxiogenic-like behaviors in young rats , Elsevier, Life sciences journal..
28. De Kloet, C., Vermetten, E., Geuze, E., Kavelaars, A., Heijnen, C. and Westenberg, H. (2006). Assessment of HPA-axis function in posttraumatic stress disorder: Pharmacological and non-pharmacological challenge tests, a review. *Journal of Psychiatric Research*, 40(6), pp.550-567.
29. De Kloet, E., Oitzl, M. and Joëls, M. (1999). Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys?. *Trends in Neurosciences*, 22(10), pp.422-426.
30. De Souza, J., da Silva, M., de Matos, R., do Amaral Almeida, L., Beltrão, L., & de Souza, F. et al. (2018). Pre-weaning maternal separation increases eating later in life in male and female offspring, but increases brainstem dopamine receptor 1a and 2a only in males. *Appetite*, 123, 114-119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2017.12.004>
31. Dief, A., Kamha, E., Baraka, A. and Elshorbagy, A. (2014). Monosodium glutamate neurotoxicity increases beta amyloid in the rat hippocampus: A potential role for cyclic AMP protein kinase. *NeuroToxicology*, 42, pp.76-82.
32. Dixit, S., Rani, P., Anand, A., Khatri, K., Chauhan, R., & Bharihoke, V. (2013). To study the effect of monosodium glutamate on histomorphometry of cortex of kidney in adult albino rats. *Renal Failure*, 36(2), 266-270. <http://dx.doi.org/10.3109/0886022x.2013.846865>
33. Dueñas, Z., Caicedo-Mera, J. and Torner, L. (2018). Global Effects of Early Life Stress on Neurons and Glial Cells. *Current Pharmaceutical Design*, 23(39), pp.6042-6049.
34. EL TIEMPO. Al año nacen cerca de 159.000 bebés de madres adolescentes. 22 de septiembre de 2014
35. EL TIEMPO. Dos niños por día son abandonados en Bogotá. 18 de noviembre de 2013
36. <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/170712>
36. <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/es/>

37. Farombi, E.O.; Onyema, O.O. (2006) *Monosodium Glutamate Induced Oxidative Damage and Genotoxicity in the Rat: Modulatory Role of Vitamin C, Vitamin E and Quercetin*; *Human and Experimental Toxicology* 25(5), 251–259
38. Foran, L., Blackburn, K. and Kulesza, R. (2017). Auditory hindbrain atrophy and anomalous calcium binding protein expression after neonatal exposure to monosodium glutamate. *Neuroscience*, 344, pp.406-417.
39. Fowler, S. (2016). Low-calorie sweetener uses and energy balance: Results from experimental studies in animals, and large-scale prospective studies in humans. *Physiology & Behavior*, 164, pp.517-523.
40. Fuentes, I., Walker, N., Pierce, A., Holt, B., Di Silvestro, E., & Christianson, J. (2016). Neonatal maternal separation increases susceptibility to experimental colitis and acute stress exposure in male mice. *IBRO Reports*, 1, 10-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibror.2016.07.001>
41. González-Burgos, I., Velázquez-Zamora, D. and Beas-Zárate, C. (2009). Damage and plasticity in adult rat hippocampal trisynaptic circuit neurons after neonatal exposure to glutamate excitotoxicity. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 27(8), pp.741-745.
42. Grønli, J., Fiske, E., Murison, R., Bjorvatn, B., Sørensen, E., Ursin, R. and Portas, C. (2007). Extracellular levels of serotonin and GABA in the hippocampus after chronic mild stress in rats. A microdialysis study in an animal model of depression. *Behavioural Brain Research*, 181(1), pp.42-51.
43. Harlow, H. F., Harlow, M. K., Dodsworth, R. O., & Arling, G. L. Maternal Behavior of Rhesus Monkeys Deprived of Mothering and Peer Associations in Infancy. *Proceedings of the American Philosophical Society*. 1966; 110(1), 58-66.
44. Harrison, F., Reiserer, R., Tomarken, A. & McDonald, M. (2006). Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learning & Memory*, 13(6), 809-819
45. Henao M, Martín L, Caicedo JC, Dueñas Z. Efecto de la Separación Materna Durante la Lactancia sobre el comportamiento Motor Espontáneo y la memoria de reconocimiento de objetos en ratas Wistar. Poster. *Neuroscience*; 2014

46. Hata, K., Kubota, M., Shimizu, M., Moriwaki, H., Kuno, T., & Tanaka, T. et al. (2012). Monosodium glutamate-induced diabetic mice are susceptible to azoxymethane-induced colon tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 33(3), 702-707.
47. Hermanussen, M. & Tresguerres, J. (2003). Does High Glutamate Intake Cause Obesity? *Journal Of Pediatric Endocrinology And Metabolism*, 16(7).
48. Hermanussen, M. & Tresguerres, J. (2003). Does the thrifty phenotype result from chronic glutamate intoxication? A hypothesis. *Journal of Perinatal Medicine*, 31(6).
49. Hermanussen, M., García, A., Sunder, M., Voigt, M., Salazar, V., & Tresguerres, J. (2005). Obesity, voracity, and short stature: the impact of glutamate on the regulation of appetite. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60(1), 25-31.
50. Hui, J., Feng, G., Zheng, C., Jin, H., & Jia, N. (2017). Maternal separation exacerbates Alzheimer's disease-like behavioral and pathological changes in adult APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *Behavioural Brain Research*, 318, 18-23.
51. ICBF. Guías alimentarias para la población colombiana mayor de dos años. Bases técnicas. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. 1998
52. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. Alarmantes cifras de maltrato infantil. 2013
53. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia 2005 – ENSIN. Bogotá; 2005.
54. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia 2010 – ENSIN, Bogotá; 2010
55. Insawang, T.; Selmi, C.; Cha'on, U.; Pethlert, S.; Yongvanit, P.; Areejitranusorn, P.; Prasongwattana, V. Monosodium Glutamate (MSG) (2012) Intake Is Associated with the Prevalence of Metabolic Syndrome in a Rural Thai Population. *Nutrition & Metabolism*.
55. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia 2010 – ENSIN, Bogotá; 2015
56. Izquierdo, I. and Medina, J. (1997). Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, 68(3), pp.285-316.
57. Jahng, J. (2011). An animal model of eating disorders associated with stressful experience in early life. *Hormones and Behavior*, 59(2), pp.213-220.

57. Jubaidi, F., Mathialagan, R., Noor, M., Taib, I. and Budin, S. (2019). Monosodium glutamate daily oral supplementation: study of its effects on male reproductive system on rat model. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 65(3), pp.194-204.
58. Juruena, M. (2014). Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. *Epilepsy & Behavior*, 38, pp.148-159.
59. Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2013). Principles of neural science. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division.
60. Kazmi, Z., Fatima, I., Perveen, S., & Malik, S. (2017). Monosodium glutamate: Review on clinical reports. *International Journal Of Food Properties*, 1-9. <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2017.1295260>
61. Keeley, R., Bye, C., Trow, J. and McDonald, R. (2015). Strain and sex differences in brain and behaviour of adult rats: Learning and memory, anxiety and volumetric estimates. *Behavioural Brain Research*, 288, pp.118-131.
62. Krause, E., De Kloet, A., Flak, J., Smeltzer, M., Solomon, M., & Evanson, N. et al. (2011). Hydration state controls stress responsiveness and social behavior. *Appetite*, 57, S24. doi: 10.1016/j.appet.2011.05.202
62. Kritzer, M., Brewer, A., Montalman, F., Davenport, M. and Robinson, J. (2007). Effects of gonadectomy on performance in operant tasks measuring prefrontal cortical function in adult male rats. *Hormones and Behavior*, 51(2), pp.183-194.
63. Kondoh, T. and Torii, K. (2008). MSG intake suppresses weight gain, fat deposition, and plasma leptin levels in male Sprague–Dawley rats. *Physiology & Behavior*, 95(1-2), pp.135-144.
64. Lajud, N., Roque, A., Cajero, M., Gutiérrez-Ospina, G. and Torner, L. (2012). Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hypo-responsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology*, 37(3), pp.410-420.
65. Lehmann, J., Pryce, C., Bettschen, D. and Feldon, J. (1999). The Maternal Separation Paradigm and Adult Emotionality and Cognition in Male and Female Wistar Rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 64(4), pp.705-715.
66. León Rodríguez DA, Dueñas Z (2013) Maternal Separation during Breastfeeding Induces Gender-Dependent Changes in Anxiety and the GABA-A Receptor

- Alpha-Subunit in Adult Wistar Rats. *PLoS ONE* 8(6): e68010. doi:10.1371/journal.pone.0068010
67. Levine, S. (1967). Maternal and Environmental Influences on the Adrenocortical Response to Stress in Weanling Rats. *Science*, 156(3772), pp.258-260.
68. Levine, S. and Thoman, E. (1969). Physiological and behavioral consequences of postnatal maternal stress in rats. *Physiology & Behavior*, 4(2), pp.139-142.
69. Levine, S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology*. 2005; 30, 939–946.
70. León G. D, Dueñas Z 2012, efectos de la separación materna temprana sobre el desempeño en el laberinto en cruz elevado en ratas adultas. *Acta Biológica colombiana*, N 17, pp.129 -142, 2012
71. Liu, C., Hao, S., Zhu, M., Wang, Y., Zhang, T., & Yang, Z. (2018). Maternal Separation Induces Different Autophagic Responses in the Hippocampus and Prefrontal Cortex of Adult Rats. *Neuroscience*, 374, 287-249 <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.01.043>
72. López-Pérez, S., Vergara, P., Ventura-Valenzuela, J., Ureña-Guerrero, M., Segovia, J. and Beas-Zárate, C. (2005). Modification of dopaminergic markers expression in the striatum by neonatal exposure to glutamate during development. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 23(4), pp.335-342.
73. Ludmer, J., Jamieson, B., Gonzalez, A., Levitan, R., Kennedy, J., & Villani, V. et al. (2017). Maternal DRD2, SLC6A3, and OXTR genotypes as potential moderators of the relation between maternal history of care and maternal cortisol secretion in the context of mother-infant separation. *Biological Psychology*, 129, 154-164. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsycho.2017.09.004>
74. Maghami, S., Zardooz, H., Khodaghohi, F., Binayi, F., Ranjbar Saber, R., Hedayati, M., Sahraei, H. and Ansari, M. (2018). Maternal separation blunted spatial memory formation independent of peripheral and hippocampal insulin content in young adult male rats. *PLOS ONE*, 13(10), p.e0204731.
74. Maras PM, Baram TZ, (2015), Early life stress: Rodent models, Lessons and Challenges. Chapter 12 in *Neuroendocrinology of stress*, first edition. Edited by John A Russell and Michael J Shiptom. Wiley books. Pp. 265-286.

75. Madl, T., Chen, K., Montaldi, D. and Trapp, R. (2015). Computational cognitive models of spatial memory in navigation space: A review. *Neural Networks*, 65, pp.18-43.
76. Mahieu, S., Klug, M., Millen, N., Fabro, A., Benmelej, A., & Contini, M. (2016). Monosodium glutamate intake affect the function of the kidney through NMDA receptor. *Life Sciences*, 149, 114-119. doi: 10.1016/j.lfs.2016.02.023
76. Maniam, J., & Morris, M. (2008). Palatable, high fat diet ameliorates anxiety-like behavior induced by maternal separation in male rats. *Appetite*, 51(2), 383. <http://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2008.04.156>
77. Maniam, J., & Morris, M. (2010). Long-term postpartum anxiety and depression-like behavior in mother rats subjected to maternal separation are ameliorated by palatable high fat diet. *Behavioural Brain Research*, 208(1), 72-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2009.11.005>
78. Matthews, K. and Robbins, T. (2003). Early experience as a determinant of adult behavioural responses to reward: the effects of repeated maternal separation in the rat. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(1-2), pp.45-55.
79. McEwen, B. (2000). Allostasis and Allostatic Load Implications for Neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology*, 22(2), pp.108-124.
80. Meaney, M., Diorio, J., Francis, D., Widdowson, J., LaPlante, P., Caldji, C., Sharma, S., Seckl, J. and Plotsky, P. (1996). Early Environmental Regulation of Forebrain Glucocorticoid Receptor Gene Expression: Implications for Adrenocortical Responses to Stress; pp. 61–72. *Developmental Neuroscience*, 18(1-2), pp.61-72.
81. Miyatake, Y., Shiuchi, T., Mawatari, K., Toda, S., Taniguchi, Y., Futami, A., Sato, F., Kuroda, M., Sebe, M., Tsutsumi, R., Harada, N., Minokoshi, Y., Kitamura, T., Gotoh, K., Ueno, M., Nakaya, Y. and Sakaue, H. (2017). Intracerebroventricular injection of ghrelin decreases wheel running activity in rats. *Peptides*, 87, pp.12-19.
82. Mueller, B. and Bale, T. (2007). Early prenatal stress impact on coping strategies and learning performance is sex dependent. *Physiology & Behavior*, 91(1), pp.55-65.
83. Noll J. G, Shalev I (2018) The Biology of Early Life Stress. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature. Online ISBN 978-3-319-72589-5.

-
84. Oliva, L., Aranda, T., Caviola, G., Fernández-Bernal, A., Alemany, M., Fernández-López, J., & Remesar, X. (2017). In rats fed high-energy diets, taste, rather than fat content, is the key factor increasing food intake: a comparison of a cafeteria and a lipid-supplemented standard diet. *Peerj*, 5, e3697. doi: 10.7717/peerj.3697
85. Olney, J. W. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164:719–721; 1969.
86. Olney, J. and HO, O. (1970). Brain Damage in Infant Mice following Oral Intake of Glutamate, Aspartate or Cysteine. *Nature*, 227(5258), pp.609-611.
87. Olney, J. W. Brain damage and oral intake of certain amino acids. *Adv. Exp. Med. Biol.* 69:497–506; 1976
88. Olton, D. (1977). Spatial Memory. *Sci Am*, 236(6), pp.82-98.
89. Olton, D. (1988). Aging and spatial cognition. *Neurobiology of Aging*, 9, pp.569-570.
88. Ortiz- Montero P, Vernot J. P, Múnera G A .2011. Estrés agudo en ratas y su efecto en la adquisición, consolidación y extinción de la memoria espacial: papel de la proteína quinasa erk1/2 y de las proteínas fosfatasa pp1 y pp2b en el hipocampo. (Trabajo de grado) Universidad Nacional de Colombia, Facultad de medicina, sede Bogotá, 2011.
89. Park, E., Kim, J., Lee, J. and Jahng, J. (2014). Increased depression-like behaviors with dysfunctions in the stress axis and the reward center by free access to highly palatable food. *Neuroscience*, 262, pp.31-39.
90. Pepino, M., Finkbeiner, S., Beauchamp, G. and Mennella, J. (2010). Obese Women Have Lower Monosodium Glutamate Taste Sensitivity and Prefer Higher Concentrations Than Do Normal-weight Women. *Obesity*, 18(5), pp.959-965. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.493>
91. Plotsky, P. and Meaney, M. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotrophin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Molecular Brain Research*, 18(3), pp.195-200.
92. Plotsky, P., Owens, M. and Nemeroff, C. (1998). Psychoneuroendocrinology of Depression. *Psychiatric Clinics of North America*, 21(2), pp.293-307.
93. Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., Williams, S. M. & White L.E (Eds.). (2018). *Neuroscience* (6th ed.). Sunderland, MA, US: Sinauer Associates.

94. Ramírez R .Dueñas, Z, (2009). Estudio Comparativo: Efectos De La Separación Temprana Sobre El Aprendizaje Y La Extinción De Una Tarea De Memoria Espacial En Ratas Wistar. Tesis de grado. Programa de psicología, p.p 27,30-49
95. Raone, A., Cassanelli, A., Scheggi, S., Rauggi, R., Danielli, B. and De Montis, M. (2007). Hypothalamus–pituitary–adrenal modifications consequent to chronic stress exposure in an experimental model of depression in rats. *Neuroscience*, 146(4), pp.1734-1742.
96. Reynoso-Robles, R., Ponce-Macotela, M., Rosas-López, L. E., & Ramos-Morales, A. (2015). The invasive- potential of *Giardia intestinalis* in an in vivo model. *Scientific Reports*, 1 - 8.
97. Rivera-Cervantes, M., Flores-Soto, M., Chaparro-Huerta, V., Reyes-Gómez, J., Feria-Velasco, A., Schliebs, R. and Beas-Zárate, C. (2009). Changes in hippocampal NMDA-R subunit composition induced by exposure of neonatal rats to l-glutamate. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 27(2), pp.197-204.
98. Riveros-Barrera, I., & Dueñas, Z. (2015). La separación materna durante la lactancia altera los niveles basales neuroendocrinos en ratas adolescentes y adultas. *Biomédica*, 36(1). <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i1.2830>
99. Romeo, R., Mueller, A., Sisti, H., Ogawa, S., McEwen, B. and Brake, W. (2003). Anxiety and fear behaviors in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation. *Hormones and Behavior*, 43(5), pp.561-567.
100. Roozendaal, B. (2002). Stress and Memory: Opposing Effects of Glucocorticoids on Memory Consolidation and Memory Retrieval, *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(3), pp.578-595.
101. Roozendaal, B. & McGaugh, J. (1997). Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration into the basolateral but not central amygdala modulates memory storage. *Neurobiology of Learning and Memory*, 67(2), 176-179.
102. Rosenfeld, P., Gutierrez, Y., Martin, A., Mallett, H., Alleva, E. and Levine, S. (1991). Maternal regulation of the adrenocortical response in preweanling rats. *Physiology & Behavior*, 50(4), pp.661-671.
103. Ryu, V., Lee, J., Yoo, S., Gu, X., Moon, Y., & Jahng, J. (2008). Sustained hyperphagia in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation.

- International Journal Of Obesity, 32(9), 1355-1362.
<http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2008.108>
104. Sasagawa, T., Horii-Hayashi, N., Okuda, A., Hashimoto, T., Azuma, C., & Nishi, M. (2017). Long-term effects of maternal separation coupled with social isolation on reward seeking and changes in dopamine D1 receptor expression in the nucleus accumbens via DNA methylation in mice. *Neuroscience Letters*.
105. Shah, S., Yoon, G., Kim, H. and Kim, M. (2015). Vitamin C Neuroprotection Against Dose-Dependent Glutamate-Induced Neurodegeneration in the Postnatal Brain. *Neurochemical Research*, 40(5), pp.875-884.
106. Sharma A, Wongkham C, Prasongwattana V, Boonnate P, Thanan R, Reungjui S, et al. (2014) Proteomic Analysis of Kidney in Rats Chronically Exposed to Monosodium Glutamate. *PLoS ONE* 9(12): e116233.
107. Shin, S., Han, S., Woo, R., Jang, S., & Min, S. (2016). Adolescent mice show anxiety- and aggressive-like behavior and the reduction of long-term potentiation in mossy fiber-CA3 synapses after neonatal maternal separation. *Neuroscience*, 316, 221-231.
- 108-Shi, Z., Luscombe-Marsh, N., Wittert, G., & Taylor, A. (2010). Monosodium glutamate is not associated with obesity or a greater prevalence of weight gain over 5 years: findings from the Jiangsu Nutrition Study of Chinese adults – response by Shi et al. *British Journal Of Nutrition*, 104(11), 1730-1730. doi: 10.1017/s000711451000276x
109. Spencer, R., Kim, P., Kalman, B. and Cole, M. (1998). Evidence for Mineralocorticoid Receptor Facilitation of Glucocorticoid Receptor-Dependent Regulation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity 1. *Endocrinology*, 139(6), pp.2718-2726.
110. Spencer, R. & Deak, T. (2016). A users guide to HPA axis research. *Physiology & Behavior*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.11.014>
111. Suchecki, D., Rosenfeld, P. and Levine, S. (1993). Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. *Developmental Brain Research*, 75(2), pp.185-192.
112. Tawfik, M.S.; Al-Badr, N. (2012) Adverse Effects of Monosodium Glutamate on Liver and Kidney Functions in Adult Rats and Potential Protective Effect of Vitamins C and E. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 651–659.

112. Thomas, A., Caporale, N., Wu, C., & Wilbrecht, L. (2016). Early maternal separation impacts cognitive flexibility at the age of first independence in mice. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 18, 49-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dcn.2015.09.005>
113. Tretter, L. (2004). Generation of Reactive Oxygen Species in the Reaction Catalyzed by α -Ketoglutarate Dehydrogenase. *Journal of Neuroscience*, 24(36), pp.7771-7778.
114. truthinlabeling. History of Invention and Use of MSG. n.d. <http://www.truthinlabeling.org/IVhistoryOfUse.ht>
115. Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., & Nestler, E. (2007). Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(5), 355-367.
116. Tsuda, M. and Ogawa, S. (2010). Adverse early life experiences alter the development of social interactive behaviors in adult C57BL/6J female mice. *Neuroscience Research*, 68, p.e413.
117. Uneyama, H., Nijjima, A., San Gabriel, A. and Torii, K. (2006). Luminal amino acid sensing in the rat gastric mucosa. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 291(6), pp.G1163-G1170.
118. Vargas-López, V., Lamprea, M. and Múnera, A. (2011). Characterizing spatial extinction in an abbreviated version of the Barnes maze. *Behavioural Processes*, 86(1), pp.30-38.
119. WAM, d., & BO, M. (2016). The Cognitive Function Of Wistar Rats Subjected To Cafeteria Diet And To Chronic Stress. *Journal Of Obesity & Eating Disorders*, 2(1). doi: 10.21767/2471-8203.100012
119. Wassum, K., & Izquierdo, A. (2015). The basolateral amygdala in reward learning and addiction. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 57, 271-283. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.08.017>
120. Windmueller, H., & Spaeth, A. (2009). UPTAKE AND METABOLISM OF PLASMA GLUTAMINE BY THE SMALL INTESTINE. *Nutrition Reviews*, 48(8), 310-312. doi: 10.1111/j.1753-4887.1990.tb02968.x
120. Williams, M., Blankenmeyer, T., Schaefer, T., Brown, C., Gudelsky, G. and Vorhees, C. (2003). Long-term effects of neonatal methamphetamine exposure in rats on spatial learning in the Barnes maze and on cliff avoidance, corticosterone release, and neurotoxicity in adulthood. *Developmental Brain Research*, 147(1-2), pp.163-175.

121. Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S. and Muscat, R. (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, 93(3).
122. World Health Organization. Infant and young child feeding: model chapter for textbooks for medical students and allied health professionals. Ginebra: WHO Press; 2009
123. Windmueller, H.G.; Spaeth, A.E. (1980) Respiratory Fuels and Nitrogen Metabolism in Vivo in Small Intestine of Fed Rats. Quantitative Importance of Glutamine, Glutamate, and Aspartate. *Journal of Biological Chemistry*, 255, 107–112.v
124. Yehuda, S., Carasso, R. and Mostofsky, D. (1991). The facilitative effects of α -MSH and melanin on learning, thermoregulation, and pain in neonatal MSG-treated rats. *Peptides*, 12(3), pp.465-469.
125. Yoo, S., Ryu, V., Park, E., Kim, B., Kang, D., Lee, J., & Jahng, J. (2011). The arcuate NPY, POMC, and CART expressions responding to food deprivation are exaggerated in young female rats that experienced neonatal maternal separation. *Neuropeptides*, 45(5), 343-349. doi: 10.1016/j.npep.2011.07.005
125. Zar, J.H., 1974. Multiple comparisons. In: McElroy, W.O., Swanson, C.D. (Eds.), *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New York, pp. 120–131
126. Zeeni, N., Bassil, M., Fromentin, G., Chaumontet, C., Darcel, N., Tome, D., & Daher, C. (2015). Environmental enrichment and cafeteria diet attenuate the response to chronic variable stress in rats. *Physiology & Behavior*, 139, 41-49. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.11.003
127. Zeeni, N., Daher, C., Fromentin, G., Tome, D., Darcel, N., & Chaumontet, C. (2012). A cafeteria diet modifies the response to chronic variable stress in rats. *Stress*, 16(2), 211-219. doi: 10.3109/10253890.2012.708952