



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCELA CRISTINA GARNICA SIQUEIRA

**EXPOSIÇÃO MATERNA AO GLUTAMATO MONOSSÓDICO
E SEUS EFEITOS NA PROLE DE RATOS**

Londrina
2014



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

MARCELA CRISTINA GARNICA SIQUEIRA

**EXPOSIÇÃO MATERNA AO GLUTAMATO MONOSSÓDICO
E SEUS EFEITOS NA PROLE DE RATOS**

MARCELACRISTINA GARNICA SIQUEIRA

**EXPOSIÇÃO MATERNA AO GLUTAMATO MONOSSÓDICO
E SEUS EFEITOS NA PROLE DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cássia Thaís Bussamra
Vieira Zaia

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S618e Siqueira, Marcela Cristina Garnica.
Exposição materna ao glutamato monossódico e seus efeitos na prole de ratos /
Marcela Cristina Garnica Siqueira. – Londrina, 2014.
55 f. : il.

Orientador: Cássia Thais Bussamra Vieira Zaia.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação
em Ciências Fisiológicas, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Obesidade – Teses. 2. Glutamato monossódico – Metabolismo – Teses.
3. Hipotálamo – Núcleo – Teses. 4. Rato como animal de laboratório – Teses.
I. Zaia, Cássia Thais Bussamra Vieira. II. Universidade Estadual de Londrina.
Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas. III. Sociedade Brasileira de Fisiologia. IV. Título.

CDU 612:616.4

MARCELA CRISTINA GARNICA SIQUEIRA

**EXPOSIÇÃO MATERNA AO GLUTAMATO MONOSSÓDICO E SEUS
EFEITOS NA PROLE DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Cássia Thaïs
Bussamra Vieira Zaia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Helenir Medri de Souza
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Rui Curi
Universidade de São Paulo - USP

Londrina, 21 de fevereiro de 2014.

Dedico este trabalho a minha família que sempre me apoiou e acreditou no meu sucesso.

Agradeço a Deus, por sua presença constante em minha vida, por me sustentar durante os períodos difíceis, pelas oportunidades concedidas e pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho.

AGRADECIMENTOS

A Profª Draª Thaïs Zaia, minha orientadora, pelo carinho e dedicação demonstrados todos os dias através de sua constante presença, acompanhando e orientando cada fase deste trabalho, exemplo de profissional e amiga. E a seu esposo, Prof. Dr. Dimas Zaia, pela colaboração neste trabalho sempre que necessário.

Aos meus pais, Vera e Francisco, pelo apoio, compreensão e carinho. Por proporcionar as melhores condições para meu crescimento e por acreditarem em meus objetivos. E aos meus irmãos, Leonardo e Vitor, pelos conselhos e pelo carinho demonstrado em forma de palavras e gestos.

Ao meu sogro, Sidney, e sua esposa, por me acolher como uma filha em sua casa, pelo entusiasmo e constante torcida.

Ao Jeferson, meu companheiro, amigo e esposo. Presença fundamental em minha vida. Obrigada por me acompanhar nesta trajetória, por compreender minhas ausências e por sempre me incentivar a dar o meu melhor. À você dedico todo meu amor e sucesso.

Aos meus companheiros de laboratório: Thamile, Renato, Pedro, Aryel, e especialmente, a Andressa e a Karina. Obrigada pelo comprometimento aos experimentos, pela compreensão nos momentos de estresse e pelas risadas, sempre fundamentais.

À Profª Draª Cláudia Martinez pela utilização do laboratório para a análise das amostras, ao Profº. Fábio de Andrade pela ajuda na parte histológica deste trabalho, e ao Departamento de Histologia da UEL, pelo apoio estrutural.

Aos docentes, discentes e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, no auxílio e compreensão durante todo tempo de convivência.

À CAPES, pelo apoio financeiro através da bolsa de mestrado.

A tantas outras pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, em minha formação e na concretização deste trabalho.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, e sim em ter novos olhos”.

Marcel Proust

GARNICA-SIQUEIRA, Marcela Cristina. **Exposição materna ao glutamato monossódico e seus efeitos na prole de ratos**. 2014. 55 f. Dissertação (Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina. Sociedade Brasileira de Fisiologia, Londrina, 2014.

RESUMO

O glutamato monossódico (MSG) é extensivamente utilizado como realçador de sabor na indústria de alimentos. Entretanto, em animais neonatos promove obesidade por destruição do núcleo arqueado do hipotálamo. O objetivo deste trabalho foi investigar parâmetros ponderais, metabólicos, hormonais e histológicos da prole de mães tratadas com MSG durante a prenhez e/ou lactação. Para tanto, ratas Wistar foram tratadas com injeção subcutânea de MSG (4 mg/g) ou salina (0,9%), em dias alternados, durante os períodos de prenhez, lactação ou prenhez e lactação. Após o desmame, as proles, macho e fêmea, foram avaliadas por 50 dias em relação ao peso corpóreo, ingestão alimentar e índice de Lee, e no final do período, foram avaliados metabólitos plasmáticos, hepáticos, tecido adiposo e núcleos hipotalâmicos. Em prole de fêmeas, a exposição materna ao MSG durante a lactação diminuiu a ingestão alimentar ($p < 0,0008$), e durante a prenhez e lactação aumentou o peso corpóreo ($p < 0,02$) e a ingestão alimentar ($p < 0,007$). O índice de Lee apresentou aumento ($p < 0,05$) em vários pontos avaliados na prole feminina de mães expostas ao MSG no período de prenhez e lactação. Em prole de machos, apenas a exposição materna ao MSG durante a lactação diminuiu a ingestão alimentar ($p < 0,002$), e exposição materna ao MSG no período de prenhez e lactação aumentou ($p < 0,05$) o índice de Lee em diversos pontos. Nenhum grupo apresentou diferenças significativas na glicemia, colesterol total e triacilgliceróis plasmáticos, ou no teor de glicogênio hepático quando comparados com seus respectivos controles. Contudo, exposição materna ao MSG no período da prenhez aumentou ($p < 0,05$) a quantidade de tecido adiposo branco perigonadal e retroperitoneal em prole de fêmeas. Além disso, houve diminuição da corticosterona na prole feminina de mães expostas ao MSG na lactação ($p < 0,05$) e na prole masculina de mães expostas ao MSG durante a prenhez ($p < 0,02$), e aumento ($p < 0,05$) dos ácidos graxos livres na prole feminina de mães expostas ao MSG durante a lactação. O número de neurônios de áreas específicas dos núcleos paraventricular, ventromedial e arqueado do hipotálamo não foi significativamente diferente entre os grupos experimental e controle nas proles com exposição materna ao MSG nos períodos de prenhez e lactação. Estes resultados indicam que a exposição materna ao MSG promoveu diferentes alterações em sua prole, quando adulta, sugerindo um potencial do MSG em causar algumas alterações metabólicas e ponderais e promover obesidade, com diferentes respostas ou sensibilidade entre machos e fêmeas.

Palavras-chave: Obesidade. Peso corpóreo. Ingestão alimentar. Índice de Lee. Alterações metabólicas. Núcleos hipotalâmicos.

GARNICA-SIQUEIRA, Marcela Cristina. **Maternal exposure to monosodium glutamate and its effects on offspring of rats.** 2014. 55 p. Dissertation (Multicenter Program of Post-Graduation in Physiological Sciences) – State University of Londrina. Brazilian Society of Physiology, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Monosodium glutamate (MSG) is extensively used as a flavor enhancer in the food industry. However, in newborn animals promotes obesity by destruction of the arcuate nucleus of the hypothalamus. The aim of this study was to investigate weight, metabolic, hormonal and histological parameters of the offspring of dams treated with MSG during pregnancy and/or lactation. For this purpose, Wistar rats were treated with subcutaneous injection of MSG (4 mg/g) or saline (0.9 %), on alternating days during periods of pregnancy, lactation or pregnancy and lactation. After weaning, the offspring, male and female, were evaluated for 50 days in relation to body weight, food intake and Lee index. At the end of the period, plasma, liver parameters, adipose tissue and hypothalamic nuclei were evaluated. In female offspring, maternal exposure to MSG during lactation decreased food intake ($p < 0.0008$), and during pregnancy and lactation increased body weight ($p < 0.02$) and food intake ($p < 0.007$). The Lee index showed an increase ($p < 0.05$) at various points evaluated in female offspring of dams exposed to MSG during pregnancy and lactation. In male offspring, only maternal exposure to MSG during lactation decreased food intake ($p < 0.002$), and maternal exposure to MSG in the period of pregnancy and lactation increased ($p < 0.05$) Lee index at different points. Neither groups showed significant differences in blood glucose, serum cholesterol and triglycerides, or liver glycogen content when compared to their respective controls. However, maternal exposure to MSG in the period of pregnancy increased ($p < 0.05$) perigonadal and retroperitoneal white adipose tissue of female offspring. Furthermore, there was a decrease of corticosterone in female offspring of dams exposed to MSG in lactation ($p < 0.05$) and male offspring of dams exposed to MSG during pregnancy ($p < 0.02$), and increased ($p < 0.05$) free fatty acids in female offspring of dams exposed to MSG during lactation. The number of neurons in specific areas of the paraventricular, ventromedial and arcuate nuclei of the hypothalamus showed no significant differences between the experimental and control groups in offspring with maternal exposure to MSG in the periods of pregnancy and lactation. These results indicate that maternal exposure to MSG has promoted different alterations in their offspring when adult, suggesting a potential for MSG to cause some metabolic changes and promote obesity, with different responses or sensitivity between males and females.

Key words: Obesity. Body weight. Food intake. Lee index. Metabolic changes. Hypothalamic nuclei.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Imagens ilustrativas esquemáticas (atlas de Paxinos & Watson, 1998) dos núcleos paraventricular (A), ventromedial (C) e arqueado do hipotálamo (E), com demarcações vermelhas das regiões estudadas bilateralmente, e respectivas fotos (B, D, F) dos cortes histológicos (microscopia óptica com aumento de 10x), demarcadas com grades (em vermelho), contendo 3 ou 4 campos de 10 mm², definindo as áreas avaliadas28
- Figura 2** - Variação temporal do peso corpóreo (A) e a respectiva área sob a curva (AUC; B) e ingestão alimentar (C) da prole de machos de ratas tratadas durante o período da prenhez com salina (Pm-S) ou glutamato monossódico (Pm-MSG)31
- Figura 3** - Variação temporal do peso corpóreo (A) e a respectiva área sob a curva (AUC; B) e ingestão alimentar (C) de prole de fêmeas de ratas tratadas durante o período da lactação com salina (Lf-S) ou glutamato monossódico (Lf-MSG).....32
- Figura 4** - Variação temporal do peso corpóreo (A) e a respectiva área sob a curva (AUC; B) e ingestão alimentar (C) de prole de fêmeas de ratas tratadas durante o período da prenhez e lactação com salina (PLf-S) ou glutamato monossódico (PLf-MSG)33
- Figura 5** - Variação semanal do índice de Lee de prole de fêmeas de ratas tratadas durante o período da prenhez (Pf; A), lactação (Lf; B) e prenhez e lactação (PLf; C) com salina (S) ou glutamato monossódico (MSG)34
- Figura 6** - Contagem dos neurônios de 2 cortes contendo o núcleo paraventricular (A), 3 cortes contendo o núcleo ventromedial (B) e 4 cortes contendo o núcleo arqueado (C) do hipotálamo da prole de fêmeas de ratas tratadas durante o período da prenhez e lactação (PLf) com salina (S) ou glutamato monossódico (MSG), com respectivas imagens (D, E, F) obtidas por microscopia óptica (aumento 10x), coloração de Nissl e pontos rosas correspondendo às células contadas36
- Figura 7** - Variação temporal do peso corpóreo (A) e ingestão alimentar (C) e respectiva área sob a curva (AUC; B) de prole de machos de ratas tratadas durante o período da prenhez com salina (Pm-S) ou glutamato monossódico (Pm-MSG)38
- Figura 8** - Variação temporal do peso corpóreo (A) e a respectiva área sob a curva (AUC; B) e ingestão alimentar (C) de prole de machos de ratas tratadas durante o período da prenhez com salina (Pm-S) ou glutamato monossódico (Pm-MSG)39

Figura 9 -	Varição temporal do peso corpóreo (A) e a respectiva área sob a curva (AUC; B) e ingestão alimentar (C) de prole de machos de ratas tratadas durante o período da prenhez e lactação com salina (PLm-S) ou glutamato monossódico (PLm-MSG)	40
Figura 10-	Varição semanal do índice de Lee de prole de machos de ratas tratadas durante o período da prenhez (Pf; A), lactação (Lf; B) e prenhez e lactação (PLf; C) com salina (S) ou glutamato monossódico (MSG).....	41
Figura 11-	Contagem dos neurônios de 2 cortes contendo o núcleo paraventricular (A), 3 cortes contendo o núcleo ventromedial (B) e 4 cortes contendo o núcleo arqueado (C) do hipotálamo da prole de machos de ratas tratadas durante o período da prenhez e lactação (PLm) com salina (S) ou glutamato monossódico (MSG), com respectivas imagens (D, E, F) obtidas por microscopia óptica (aumento 10x), coloração de Nissl e pontos rosas correspondendo às células contadas	43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL), colesterol (mg/dL), triacilglicerol (mg/dL) e corticosterona ($\mu\text{g/dL}$) de ratas (R) tratadas com salina (S) ou glutamato monossódico (MSG) durante os períodos de prenhez (P), lactação (L) ou prenhez e lactação (PL) 27
- Tabela 2** - Glicose (mg/dL), colesterol (mg/dL), triacilglicerol (mg/dL), corticosterona ($\mu\text{g/dL}$) e ácidos graxos livres ($\mu\text{moles/dL}$) plasmáticos, glicogênio hepático (g/100 g), peso do tecido adiposo (TA) branco perigonadal e retroperitoneal (g/100 g) de proles fêmeas de ratas tratadas durante o período da prenhez (Pf), lactação (Lf), e prenhez e lactação (PLf) com salina (S) ou glutamato monossódico (MSG) 35
- Tabela 3** - Glicose (mg/dL), colesterol (mg/dL), triacilglicerol (mg/dL), corticosterona ($\mu\text{g/dL}$) e ácidos graxos livres ($\mu\text{moles/dL}$) plasmáticos, glicogênio hepático (g/100 g), peso do tecido adiposo (TA) branco perigonadal e retroperitoneal (g/100 g) de proles machos de ratas tratadas durante o período da prenhez (Pm), lactação (Lm), e prenhez e lactação (PLm) com salina (S) ou glutamato monossódico (MSG) 42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARC	Núcleo arqueado do hipotálamo
AUC	Área sob a curva
DG	Dia gestacional
DPN	Dia pós-natal
GH	Hormônio do crescimento
IL	Índice de Lee
IMC	Índice de massa corpórea
MSG	Glutamato monossódico
NPY	Neuropeptídeo Y
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
SNC	Sistema nervoso central
SRC	Síndrome do restaurante chinês
VMH	Núcleo ventromedial do hipotálamo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Droga	20
3.2	Animais	20
3.3	Acasalamento e prenhez	20
3.4	Protocolo de tratamento materno	21
3.4	Protocolos experimentais	21
3.5	Avaliação de parâmetros plasmáticos maternos	22
3.7	Avaliação do índice de Lee das proles	22
3.8	Eutanásia das proles	23
3.9	Procedimentos analíticos	23
3.9.1	<i>Dosagem de glicose plasmática</i>	23
3.9.2	<i>Dosagem de colesterol plasmático</i>	24
3.9.3	<i>Dosagem de triacilglicerol plasmático</i>	24
3.9.4	<i>Dosagem de ácidos graxos livres plasmático</i>	24
3.9.5	<i>Dosagem de corticosterona plasmática</i>	25
3.9.6	<i>Dosagem de glicogênio hepático</i>	26
3.10	Análise histológica de núcleos hipotalâmicos	26
3.11	Análise estatística	27
4	RESULTADOS	29
4.1	Efeito do MSG nos parâmetros plasmáticos maternos	29
4.2	Efeito do MSG em proles fêmeas	29
4.2.1	<i>Peso corpóreo, consumo alimentar e índice de Lee</i>	29
4.2.3	<i>Núcleos hipotalâmicos</i>	30
4.3	Efeito do MSG em proles machos	37
4.3.1	<i>Peso corpóreo, consumo alimentar e índice de Lee</i>	37
4.3.3	<i>Núcleos hipotalâmicos</i>	37
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença que aumenta a cada dia. No mundo 35% dos indivíduos acima de 20 anos estão com sobrepeso, e no Brasil mais de 50% dos homens e 46% das mulheres (GHO, 2011), e sua incidência tem aumentado entre crianças e adultos. Trata-se de uma doença caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal e seu diagnóstico é feito pelo índice de massa corporal (IMC) que correlaciona o peso e a altura do indivíduo. Envolvidos na causa da obesidade estão o desbalanço entre a ingestão e o gasto energético, e a fome e saciedade.

O hipotálamo, por meio dos núcleos paraventricular (PVN), ventromedial (VMH) e arqueado (ARC) do hipotálamo (Leibowitz & Wortley, 2004; Gao *et al.*, 2013), exerce papel principal no controle da ingestão alimentar e homeostase energética (Lawrence *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 2000). A destruição desses núcleos hipotalâmicos pode resultar em diferentes formas de obesidade, como a obesidade induzida pelo glutamato monossódico (MSG), principalmente quando administrado em neonatos.

O MSG é o sal sódico do ácido glutâmico, um aminoácido não essencial encontrado naturalmente em alimentos com grandes proporções proteicas, como carnes e queijos. Seu uso iniciou-se entre os chineses que por 1000 anos utilizavam o extrato de uma alga comum, a *Laminariae japonicum*, como realçador de sabor – substância que aumenta a textura e o sabor já existente do alimento – e apenas em 1910 descobriu-se que o responsável por esse efeito era o ácido glutâmico contido em pequenas proporções nesta alga (Kizer *et al.*, 1948).

O MSG é utilizado como aditivo em uma grande variedade de alimentos industrializados, como sopas concentradas e temperos em geral. Sua produção cresceu rapidamente de 200.000 ton/ano em 1969 para 800.000 ton/ano em 2001 (Hermanussen *et al.*, 2006). Seu sabor único é também chamado de “umami”, considerado o quinto sabor básico juntamente com doce, salgado, azedo e amargo, sendo também reconhecido por aumentar o fluxo salivar, a palatabilidade e a aceitação ao alimento (Yamaguchi & Ninomyia, 2000; Kurihara & Kashiwayanagi, 2000).

Na década de 50, acreditava-se que o ácido glutâmico era o único aminoácido utilizado metabolicamente pelo sistema nervoso central (SNC) (Wheil-Malherbe, 1936). Seu uso era sugerido para o tratamento de doenças mentais e até

mesmo aumento do aprendizado em crianças normais (Milliken & Standen, 1951). Neste cenário científico, Lucas e Newhouse, em 1957, iniciaram a investigação dos efeitos protetores do ácido L-glutâmico na degeneração hereditária de ratos, e contrariamente ao que esperavam, foi descoberto que grandes quantidades de MSG resultavam em destruição irreversível de células da retina em poucas horas. Alguns anos depois, Olney (1969) observou que a neurotoxicidade aguda de grandes doses parenterais de MSG, em roedores neonatos, não se restringia apenas a retina, mas envolvia também o hipotálamo, destruindo principalmente o ARC, acarretando em importantes alterações na vida adulta e sugerindo um complexo distúrbio endócrino e metabólico.

O ácido glutâmico é um importante neurotransmissor excitatório e sua ação neurotóxica ocorre quando há acúmulo intracelular de íons e água após a despolarização das membranas pós-sinápticas, resultando em edema tóxico e ruptura dos neurônios e dendritos afetados (Rothman & Olney, 1986).

O estudo de Olney (1969) foi pioneiro na caracterização da síndrome do MSG e estimulou outros pesquisadores a esclarecerem as possíveis implicações desta substância em diversas espécies. O modelo experimental de obesidade por MSG consiste em injeções subcutâneas de glutamato monossódico (4 mg/g) durante o início do período pós-natal.

Baseado neste modelo sabe-se que o MSG provoca aumento do peso corpóreo com normofagia ou hipofagia e obesidade após a puberdade (Olney, 1969; Tanaka *et al.*, 1978; Dolnikoff *et al.*, 2001), confirmada pelo aumento do índice de Lee (Papa *et al.*, 2002) e da carga lipídica (Ribeiro *et al.*, 1997), com aumento da gordura epididimal (Macho *et al.*, 2000), e diminuição da lipólise (Bunyan *et al.*, 1976) com aumento da lipogênese, mesmo com altos níveis de leptina, (Macho *et al.*, 2000; Roman-Ramos *et al.*, 2011). Confirmou-se que a obesidade é secundária aos altos níveis de corticosterona (Tokuyama & Himmis-Hagen, 1989; Dolnikoff *et al.*, 1988; Magariños *et al.*, 1988) ao promover efeito supressivo na atividade do tecido adiposo marrom tornando-o queiscente, e com reduzida quantidade do transportador de glicose GLUT4 (Morris *et al.*, 1998). Observou-se também diminuição de GLUT4 em outros tecidos, com conseqüente resistência insulínica (Papa *et al.*, 1997) confirmada pela hiperinsulinemia e aumento moderado da glicemia (Hirata *et al.*, 1997; Papa *et al.*, 2002). Entre os distúrbios endócrinos ainda

estão a depleção do hormônio do crescimento (GH) (Maiter *et al.*, 1991) e da prolactina (Zelena *et al.*, 1998).

O tratamento com MSG promove diminuição do conteúdo de neuropeptídeo Y (NPY) no hipotálamo (Dawson *et al.*, 1989), o que provavelmente está relacionado a destruição do ARC, principal local de síntese do NPY (Meister *et al.*, 1989). Dessa forma, a perda dos neurônios que se projetam para o PVN para exercer regulação tônica e fásica da ingestão alimentar (Leibowitz, 1988) pode estar relacionada à hipofagia moderada apresentada na síndrome do MSG.

O MSG promove lesão do ARC em ratos neonatos, pois sua administração subcutaneamente atinge o tecido cerebral quase imediatamente (López-Pérez, *et al.*, 2010), já que a barreira hematoencefálica é imatura (Ek *et al.*, 2006) e seu completo desenvolvimento ocorre apenas 13 dias após o nascimento (Xu & Ling, 1994) tornando mais seletiva a passagem de substâncias para o SNC.

Concomitante a confirmação dos efeitos deletérios do MSG em animais, conduziram-se estudos sobre seu uso na população. Em 1968, Schaumburg e Byck descreveram sintomas como queimação, pressão facial e dor no peito após a ingestão de uma refeição chinesa e o MSG foi sugerido como o possível agente da “Síndrome do Restaurante Chinês” (SRC), sendo que sua administração intravenosa foi feita para confirmar os sintomas (Schaumburg *et al.*, 1969). A partir desse estudo, outros foram feitos e, devido ao uso de diferentes critérios e metodologias, os resultados se mostraram controversos, principalmente por se tratarem de sintomas subjetivos, concluindo que os sintomas só apareceram com a ingestão de MSG em estômago vazio e por indivíduos que se consideravam susceptíveis (Yang *et al.*, 1997; Geha *et al.*, 2000). Entretanto, outros trabalhos não confirmaram os mesmos efeitos (Morselli & Garatinni, 1970; Tarasoff & Kelly, 1993; Fernstrom *et al.*, 1996).

Também foram realizadas pesquisas em populações chinesas, por um grande período de tempo, para relacionar o consumo de MSG e a prevalência da obesidade e ganho de peso corpóreo, sendo que na província de Jiangsu não foi possível observar esta relação (Shi *et al.*, 2010). Contudo um estudo de 9 províncias chinesas, baseado em dados do “China Health and Nutrition Survey” (CHNS), mostrou significativa associação entre o consumo de MSG e o aumento do IMC de forma dose-dependente e aumento de leptina nesses indivíduos (He *et al.*, 2011).

Diversos comitês, como o JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), FASEB (Federation of American Societies for Experimental

Biology), SCF (Scientific Committee for Food), e o FDA (Food and Drug Administration) avaliaram que o MSG não se apresenta como uma ameaça à saúde, mas assumem que há um pequeno subgrupo da população que responde aos sintomas da SRC e mantém a posição de que aditivos alimentares não devem ser usados em alimentos infantis para crianças com até 12 semanas de idade. Dessa forma, o FDA concluiu que, em estudos com animais, altas doses de MSG podem influenciar na função hormonal, mas não há evidências suficientes para considerá-lo um disruptor do eixo neuroendócrino em humanos (Walker & Lupien, 2000).

Contrariamente aos animais adultos, sabe-se que neonatos são sensíveis à ação neurotóxica do MSG na promoção da obesidade. Dessa forma, questionou-se qual seria a ação dessa substância na prole de fêmeas prenhas e lactantes que tivessem contato com o MSG durante este período.

A administração oral materna de MSG durante a gestação promoveu menor resposta de aprendizado no labirinto em Y no dia pós-natal 60 (DPN 60) (Yu *et al.*, 1997). Por outro lado, a administração subcutânea de MSG na mãe, no período de gestação ou lactação resultou em alguns neurônios picnóticos no ARC de fetos ou de recém-desmamados (Takasaki, 1978). Em prole de mães que ingeriram MSG pela ração no período de prenhez e lactação os animais apresentaram aumento de glicose, triacilgliceróis, insulina e leptina no DPN 10 (Afifi & Abbas, 2011), diminuição do peso e distância naso-anal no DPN21 (Von Diemen & Trindade, 2010), e diminuição na concentração de GH e leptina no DPN30 e DPN90, quando continuaram a ingerir MSG pela ração (Hermanussen *et al.*, 2006). Avaliações diretas da passagem placentária em primatas mostraram que o MSG, administrado via intravenosa, atravessou a placenta após extrema elevação de seus valores plasmáticos maternos (Stegink *et al.*, 1975).

Alguns trabalhos mostram alterações neuronais, comportamentais ou bioquímicas, outros questionam esses efeitos. Baseado nessas inconsistências sobre os efeitos fisiológicos e no amplo uso do MSG nos alimentos e devido a grande similaridade entre o genoma de humanos e roedores mais estudos sobre o MSG e suas ações se tornam relevantes, não apenas diretamente sobre o recém-nascido, mas em mães que têm acesso extensivo ao MSG durante o período de gestação e lactação.

2 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da exposição materna ao MSG durante a prenhez e/ou lactação sobre parâmetros ponderais (peso corpóreo, ingestão alimentar, índice de Lee e peso relativo do tecido adiposo branco perigonadal e retroperitoneal), plasmáticos (glicose, colesterol, triacilglicerol, ácidos graxos livres e corticosterona) e hepático (glicogênio) de proles de ratos, machos e fêmeas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Droga

O MSG foi gentilmente cedido pela empresa alimentícia Duas Rodas (Jaraguá do Sul, Brasil).

3.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos, machos e fêmeas, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF), com ambiente de luz (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura (23 ± 2 °C) controladas, e água e alimentação à vontade. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo (LaFiNeM) do CIF/UEL e sempre pela manhã, para minimizar qualquer influência do ritmo circadiano.

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), processo nº 15107.2012.92.

3.3 Acasalamento e prenhez

Ratas Wistar foram colocadas para cruzamento *overnight* na proporção de duas fêmeas para cada macho. Esfregaços vaginais foram realizados para verificação da fase do ciclo estral e presença de espermatozóides, caracterizando a cópula. O dia da detecção espermática no esfregaço vaginal foi considerado o dia gestacional 0 (DG 0).

As ratas acasaladas constituíram, aleatoriamente, os grupos experimentais e controles que foram tratadas durante o período de prenhez, lactação ou prenhez e lactação.

Os filhotes, nascidos naturalmente, foram deixados com suas mães até o desmame. As proles foram compostas de oito recém-nascidos, preferencialmente quatro fêmeas e quatro machos para minimizar influências de gênero, e para cada

grupo experimental foram escolhidos aleatoriamente de dois a três irmãos, totalizando 8 animais por grupo.

3.4 Protocolo de tratamento materno

Injetou-se MSG subcutaneamente, nas ratas prenhas e/ou lactantes, na dose de 4 g/kg peso corpóreo, diluído em solução salina 0,9%; dose baseada nos estudos de Olney (1969) que promoveu alterações metabólicas e obesidade em ratos recém-nascidos. Os grupos controles receberam solução salina 0,9% (S). O peso corpóreo materno foi avaliado antes e durante todo o período de tratamento para acompanhamento da prenhez e/ou lactação e ajuste da dose.

3.4 Protocolos experimentais

Foram realizados 3 protocolos experimentais.

A. Administração de MSG em ratas prenhas: injeções únicas de MSG ou S, em dias alternados, pelo período de 20 dias, entre às 8 e 10 horas com início no DG 1. As proles destas fêmeas constituíram outros 4 subgrupos:

1. Grupo Pm-MSG: 8 ratos (m) cuja mãe recebeu MSG durante a prenhez (P);
2. Grupo Pf-MSG: 8 ratas (f) cuja mãe recebeu MSG durante a prenhez (P);
3. Grupo Pm-S: 8 ratos (m) cuja mãe recebeu S durante a prenhez (P);
4. Grupo Pf-S: 8 ratas (f) cuja mãe recebeu S durante a prenhez (P).

B. Administração de MSG em ratas lactantes: injeções únicas de MSG ou S feitas por 20 dias, em dias alternados, entre às 8 e 10 horas e iniciadas no dia seguinte ao parto (DPN 2). As proles constituíram outros 4 subgrupos:

1. Grupo Lm-MSG: 8 ratos (m) cuja mãe recebeu MSG durante a lactação (L);
2. Grupo Lf-MSG: 8 ratas (f) cuja mãe recebeu MSG durante a lactação (L);
3. Grupo Lm-S: 8 ratos (m) cuja mãe recebeu S durante a lactação (L);
4. Grupo Lf-S: 8 ratas (f) cuja mãe recebeu S durante a lactação (L).

C. Administração de MSG em ratas durante a prenhez e lactação: ratas que receberam MSG ou S durante a prenhez e lactação, conforme protocolos supra descritos. As proles dessas fêmeas constituíram outros 4 subgrupos:

1. Grupo PLm-MSG: 8 ratos (m) cuja mãe recebeu MSG na prenhez e lactação (PL);
2. Grupo PLf-MSG: 8 ratas (f) cuja mãe recebeu MSG na prenhez e lactação (PL);
3. Grupo PLm-S: 8 ratos (m) cuja mãe recebeu S na prenhez e lactação (PL);
4. Grupo PLf-S: 8 ratas (f) cuja mãe recebeu S na prenhez e lactação (PL).

3.5 Avaliação de parâmetros plasmáticos maternos

No dia do desmame da prole, as matrizes foram eutanasiadas por decapitação para retirada de amostras de sangue, para dosagens de glicose, colesterol, triacilglicerol, corticosterona.

3.6 Avaliação do peso corpóreo e da ingestão alimentar das proles

No desmame (DPN 21) os animais selecionados foram colocados em gaiolas individuais do tipo metabólicas, e diariamente, alimento (ração para roedores Nuvilab CR1, Nuvital®) foi oferecido (80 g) e o peso corpóreo (g) obtido para avaliação da ingestão alimentar diária, que foi determinado pela diferença entre a quantidade de alimento oferecido e as sobras após 24 horas, sendo expresso em g/100 g de peso corpóreo.

Após o período de 50 dias (DPN71), as diferenças no ganho de peso corpóreo durante o período avaliado foram utilizadas para o cálculo da área sob a curva (AUC).

3.7 Avaliação do índice de Lee das proles

O índice de obesidade para roedores - índice de Lee - foi avaliado semanalmente, a partir do desmame (DPN21). O cálculo foi feito considerando-se o peso corporal (em gramas) e a medida naso-anal (em centímetros), pela fórmula (Bernardis & Peterson, 1968):

$$IL = \frac{\sqrt[3]{pc}}{NA} \times 1000$$

Onde:

IL: índice de Lee

pc: peso corpóreo

NA: comprimento naso-anal

3.8 Eutanásia das proles

Todos os animais utilizados nos experimentos foram eutanasiados por decapitação e, imediatamente após, os cérebros foram retirados e colocados em recipientes contendo solução fixadora de formol (10%) para posterior análise histológica. Sangue também foi imediatamente coletado em tubos heparinizados e centrifugados a 14000 x *g* por 20 min a 4 °C para a obtenção do plasma que foi separado em alíquotas e armazenado a -20 °C para posteriores dosagens por métodos bioquímicos.

Foram também imediatamente retiradas amostras de fígado para determinação do teor de glicogênio hepático, e tecido adiposo branco perigonadal e retroperitoneal para pesagem e cálculo do peso relativo (g/100g de peso corpóreo).

3.9 Procedimentos analíticos

3.9.1 *Dosagem de glicose plasmática*

A determinação espectrofotométrica da concentração plasmática de glicose foi realizada utilizando-se o Kit Comercial Glicose BioLiquid (Laborclin, PR), baseado na reação da peroxidase (Trinder, 1969), onde a glicose é determinada por sua reação com a glicose oxidase, na qual são gerados o ácido glicurônico e o peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio então reage com o hidroxibenzoato de sódio e 4-aminofenazona, produzindo um complexo corado de cor rosa com máximo de absorção em 500 nm. A intensidade da coloração é

proporcional à concentração de glicose da amostra, sendo seus valores expressos em $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$.

3.9.2 *Dosagem de colesterol plasmático*

A determinação espectrofotométrica da concentração plasmática de colesterol foi realizada utilizando-se o Kit Comercial Colesterol BioLiquid (Laborclin, PR), baseado na reação de peroxidase (Allain *et al.*, 1974) onde os ésteres de colesterol são inicialmente hidrolisados pela colesterol esterase. O colesterol liberado é oxidado pela colesterol oxidase formando colest-4-en-3-ona e peróxido de hidrogênio. Finalmente, o peróxido de hidrogênio produzido é detectado pelo aparecimento de um produto corado, produzido pela reação com 4-aminofenazona e fenol, na presença de peroxidase. O produto final de cor rósea (quinoneimina) apresenta absorvância máxima a 500 nm, sendo diretamente proporcional à quantidade de colesterol presente na amostra, com valores expressos em $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$.

3.9.3 *Dosagem de triacilglicerol plasmático*

A determinação espectrofotométrica da concentração plasmática de triacilglicerol foi realizada utilizando-se o Kit Comercial Triglicérides GPO-Trinder BioLiquid (Laborclin, PR), baseado na reação de Trinder (1969). Neste método, os triacilgliceróis são convertidos a glicerol e ácidos graxos pela lipase, e o glicerol é convertido a glicerol-1-fosfato pela glicerolquinase, pela ação da glicerol-1-fosfato oxidase o glicerol-1-fosfato é oxidado a di-hidroxiacetona fosfato e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, na presença da peroxidase origina um cromógeno (quinoneimina) com máxima absorção em 500 nm. A quantidade de quinoneimina formada é proporcional à concentração de triacilgliceróis na amostra analisada, sendo seus valores expressos em $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$.

3.9.4 *Dosagem de ácidos graxos livres plasmático*

Para a determinação da concentração de ácidos graxos livres foi utilizado o método espectrofotométrico de Falholt *et al.* (1973). Amostras de plasma (100 μL) foram submetidas a duas extrações seguidas de agitação, aspiração da fase

superior e centrifugação. Como padrão, foram utilizados 50 μL de ácido palmítico (2 mmolar) em 1,0 mL de tampão fosfato (pH 6,4) e 6,0 mL de solução extratora, e para o branco apenas a solução extratora. Na primeira extração utilizou-se 1,0 mL de tampão fosfato (pH 6,4) e 6,0 mL de solução de clorofórmio + heptano + metanol, e na segunda extração 2,0 mL de reagente Cooper (CuTEA; pH 8,1). Após, em 3,0 mL da fase superior foi adicionado 1,0 mL do reagente de cor (DPC: 4% de 1,5-difenilcarbazida-difenilcarbazona em 0,1 mL de TEA 1M). A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm e os resultados expressos em $\mu\text{moles.dL}^{-1}$.

3.9.5 Dosagem de corticosterona plasmática

A determinação da concentração de corticosterona plasmática foi feita pelo método fluorimétrico de Guillemin *et al.* (1959), o qual se baseia na fluorescência da corticosterona em ácido sulfúrico. Para a execução do método, tem-se como solução padrão 1 mg de corticosterona dissolvida em 10 mL de etanol absoluto. Em relação às amostras dos animais, 100 μL de plasma foram acrescidos de diclorometano, com posterior agitação e aspiração da fase superior, possibilitando a partição e extração da corticosterona; após isso, 250 μL de NaOH 0,1 N foram adicionados à amostra para lavagem, seguido por agitação e aspiração da fase superior; após, 250 μL de água destilada foram adicionados, fez-se agitação e 2,0 mL da fase inferior foram retirados e transferidos para uma nova bateria de tubos. Como branco, apenas 2,0 mL de diclorometano foram utilizados. Na segunda etapa do método, 10 μL de solução "working" (0,5 mL de solução padrão e etanol) foram adicionados ao tubo da solução padrão, e 0,5 mL de $[\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{Etanol}]$ foi acrescido à todos os tubos para uma segunda extração, seguido por agitação, com repouso de 20 minutos. A leitura foi feita em fluorímetro, com excitação 477 nm, emissão 520 nm e sensibilidade 11. Os valores da concentração plasmática de corticosterona obtidos foram expressos em $\mu\text{g.dL}^{-1}$.

3.9.6 Dosagem de glicogênio hepático

A determinação do teor de glicogênio no fígado foi realizada pelo método de Johann & Lentini (1971) modificado de Hassid & Abraham (1957). Amostras de 500 mg de fígado foram retirados imediatamente após a eutanásia do animal. Para a extração, o fígado foi fervido com 2,4 mL de KOH 30%. Após, foi feita separação em alíquotas de 0,6 mL com 1,3 ml de álcool 95%, com posterior elevação da temperatura a 80 °C e resfriamento por 2 vezes, seguido de centrifugação. Desprezado o sobrenadante, foram adicionados 0,6 mL de água destilada e 1,3 mL de álcool 95%, e foi realizado novo aquecimento a 80 °C, seguido de centrifugação e posteriormente verteu-se o sobrenadante. Para a dosagem, 2,0 mL de água destilada foram adicionados ao tubo e foi realizada uma diluição de 40x em água destilada por se tratar de amostras de animais alimentados. Para a curva padrão foi preparada uma solução de 200 µg/mL de glicose; 4,0 mL de solução de antrona 0,2% em ácido sulfúrico foram adicionados aos tubos da curva padrão e amostras. Posteriormente, foi feita a fervura dos tubos e leitura espectrofotométrica em 620 nm. Os valores da concentração de glicogênio hepático foram expressos em mg/100 mg de tecido hepático.

3.10 Análise histológica de núcleos hipotalâmicos

Para a avaliação dos núcleos hipotalâmicos, os cérebros foram removidos cuidadosamente após a eutanásia, foram fixados em formol 10% por 15 dias e, por secção transversal, foram feitas fatias em torno de 10 mm, contendo a região do hipotálamo. Para o procedimento de inclusão em parafina, as fatias foram lavadas em água corrente, submetidas a sucessivos banhos em etanol 95 °GL e 100 °GL para desidratação do tecido, a banhos de xilol para a diafanização, a banhos de parafina e paraplást para a impregnação, e emblocamento em paraplást. Por microtomia foram obtidos cortes de 10 µm, com intervalos de 200 µm entre eles, abrangendo as áreas do PVN, VMH e ARC. Os cortes foram corados com 0,25% de cresyl violeta, pela técnica de Nissl (Michalany, 1980).

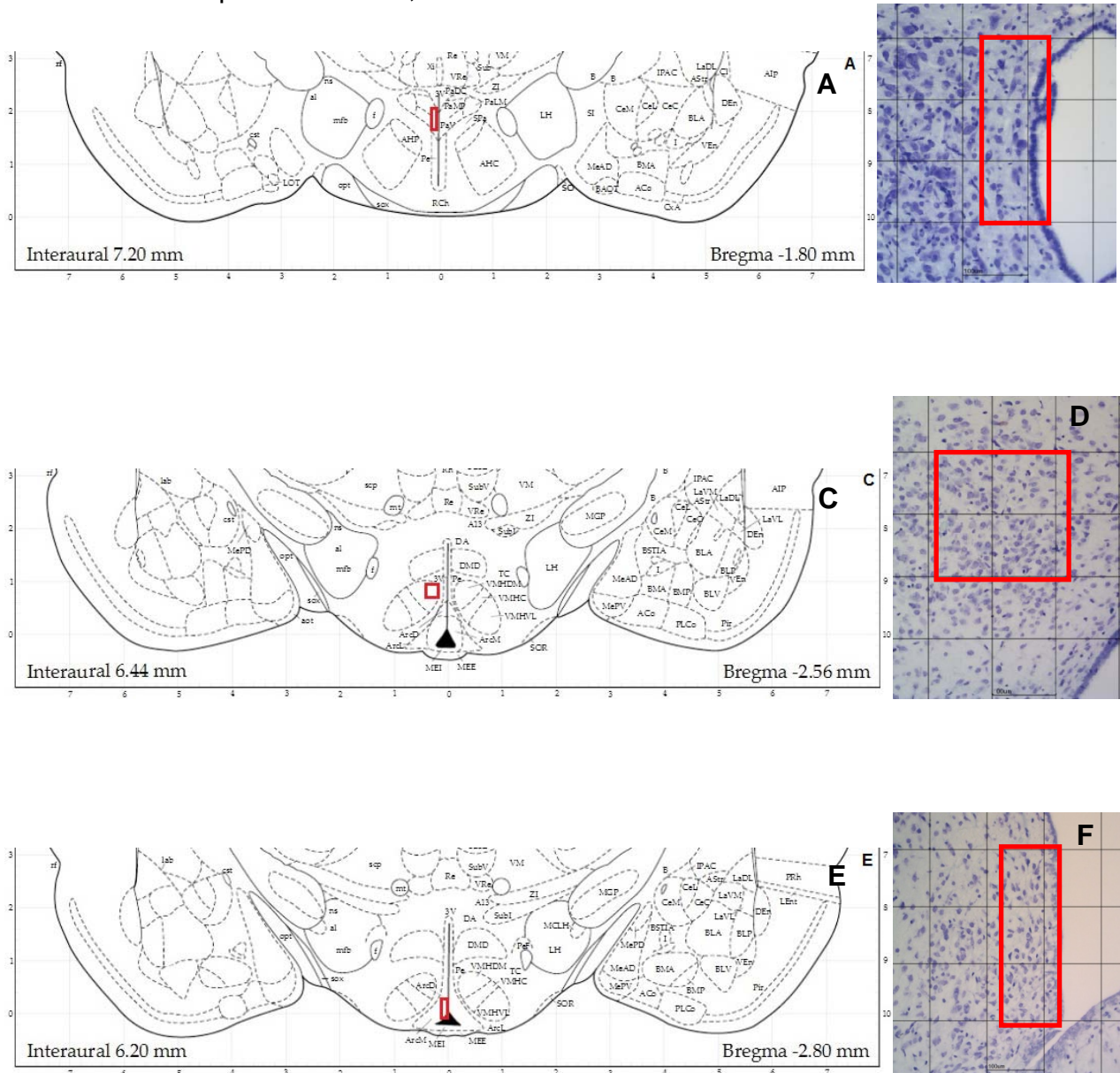
Para a análise dos cortes histológicos utilizou-se o atlas de Paxinos e Watson (1998). Fez-se documentação fotográfica utilizando o sistema de captura de imagens Moticam (Motic, Xiamen, China) acoplado a um microscópio de luz, no

Laboratório de Histologia da Universidade Estadual de Londrina. Para cada animal foram selecionadas as regiões que continham bilateralmente os núcleos hipotalâmicos de interesse e capturadas fotos, com aumento de 10x, de: 2 cortes contendo o PVN, 3 cortes contendo o VMH e 4 cortes contendo o ARC. Foram selecionados 3 campos de 10 mm² em cada corte do PVN (na região parvocelular) e em cada corte do ARC (na porção ventromedial), e 4 campos de 10 mm² em cada corte do VMH (na porção medial próxima ao 3º ventrículo). O total de neurônios foi contado nas áreas selecionadas nos cortes (figura 1) e a quantidade de neurônios foi expressa em unidades/10 mm².

3.11 Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo método estatístico paramétrico, teste “t” de Student, sendo apresentados como médias ± erro padrão da média (E.P.M.). As áreas sob as curvas (AUCs) foram calculadas nos intervalos de tempo indicados nas figuras. Os cálculos e os testes paramétricos foram realizados no programa GraphPad Prism 5.0, considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Figura 1 - Imagens ilustrativas esquemáticas (atlas de Paxinos & Watson, 1998) dos núcleos paraventricular (A), ventromedial (C) e arqueado do hipotálamo (E), com demarcações vermelhas das regiões estudadas bilateralmente, e respectivas fotos (B, D, F) dos cortes histológicos (microscopia óptica com aumento de 10x), demarcadas com grades (em vermelho), contendo 3 ou 4 campos de 10 mm², definindo as áreas avaliadas.



4 RESULTADOS

4.1 Efeito do MSG nos parâmetros plasmáticos maternos

Os valores plasmáticos de glicose, colesterol, triacilglicerol e corticosterona maternos não se alteraram pelo tratamento com MSG nos períodos de prenhez e/ou lactação ($p > 0,05$) quando comparados com seus respectivos controles (tabela 1).

Tabela 1 - Concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL), colesterol (mg/dL), triacilglicerol (mg/dL) e corticosterona ($\mu\text{g/dL}$) de ratas tratadas com salina (S) ou glutamato monossódico (MSG) durante os períodos de prenhez (P), lactação (L) ou prenhez e lactação (PL).

	P-S	P-MSG	L-S	L-MSG	PL-S	PL-MSG
Glicose	102,80 \pm 5,7 (n=4)	103,40 \pm 3,8 (n=4)	104,70 \pm 3,5 (n=3)	107,80 \pm 4,8 (n=4)	113,50 \pm 4,2 (n=3)	103,90 \pm 3,2 (n=4)
Colesterol	96,93 \pm 10,5 (n=4)	90,29 \pm 7,2 (n=4)	57,48 \pm 14,7 (n=3)	74,58 \pm 4,5 (n=4)	101,5 \pm 9,9 (n=3)	79,32 \pm 9,7 (n=4)
Triacilglicerol	55,23 \pm 8,2 (n=4)	53,70 \pm 8,4 (n=4)	40,09 \pm 3,9 (n=3)	47,93 \pm 6,8 (n=4)	76,98 \pm 6,9 (n=3)	70,92 \pm 9,4 (n=4)
Corticosterona	9,86 \pm 0,8 (n=4)	10,54 \pm 1,4 (n=4)	5,87 \pm 0,6 (n=3)	7,59 \pm 1,4 (n=4)	6,02 \pm 2,1 (n=3)	5,63 \pm 1,2 (n=4)

Valores expressos como média \pm EPM. (n) Número de animais.
Resultados analisados por teste "t" de Student.

4.2 Efeito do MSG em proles fêmeas

4.2.1 Peso corpóreo, consumo alimentar e índice de Lee

Nos animais do grupo Pf-MSG (figura 2) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas AUCs do peso corpóreo e ingestão alimentar, comparados com os respectivos controles salina. O grupo Lf-MSG (figura 3D) apresentou alterações pontuais na ingestão alimentar e tendência ao aumento no

peso corpóreo ($p=0,19$; figura 3B), sendo que no último dia avaliado foi observada diferença significativa no peso corpóreo das fêmeas ($p<0,004$). No grupo PLf-MSG (figura 4) houve aumento significativo do peso corpóreo ($p<0,02$) e alterações pontuais na ingestão alimentar ($p<0,007$).

O índice de Lee, avaliado semanalmente, no grupo Pf-MSG (figura 5A) foi significativamente menor em dois períodos avaliados, no DPN 21 ($p<0,05$) e DPN49 ($p<0,05$). No grupo Lf-MSG (figura 5B) não houve diferença significativa durante todo o período avaliado, e no grupo PLf-MSG (figura 5C) o índice de Lee apresentou aumento no DPN 35 ($p<0,006$), DPN 49 ($p<0,006$) e DPN 70 ($p<0,05$).

4.2.2 *Parâmetros plasmáticos, hepáticos e do tecido adiposo*

O peso relativo do tecido adiposo perigonadal e retroperitoneal no grupo Pf-MSG (tabela 2) foi diferente ($p<0,05$) do seu controle, com aumento de 38% e 50%, respectivamente, em relação ao grupo Pf-S. No entanto, os grupos Lf-MSG e PLf-MSG não apresentaram alterações nestes parâmetros.

Os valores médios de glicemia, colesterol, triacilglicerol e glicogênio hepático não diferiram entre os grupos e seus respectivos controles. Porém, no grupo Lf-S houve diminuição da corticosterona ($p<0,05$) e aumento dos ácidos graxos livres ($p<0,05$), e nos grupos Pf-MSG e PLf-MSG estes parâmetros não apresentaram diferença em relação aos controles (tabela 2).

4.2.3 *Núcleos hipotalâmicos*

A análise histológica dos núcleos hipotalâmicos foi feita apenas no grupo de proles PLf, por se tratar do maior período de exposição ao MSG. Pela contagem de células nos núcleos PVN, VMH e ARC (figura 6), não houve diferenças significativas entre o número de células desses núcleos nos grupos controle (PLf-S) e experimental (PLf-MSG).

Figura 2 - Variação temporal do peso corpóreo (A) e a respectiva área sob a curva (AUC; B) e ingestão alimentar (C) de prole de fêmeas de ratas tratadas durante o período da prenhez com salina (Pf-S) ou glutamato monossódico (Pf-MSG). Cada ponto representa a média \pm EPM de 8 animais. Dados analisados por teste "t" de Student. * $p < 0,03$ versus salina.

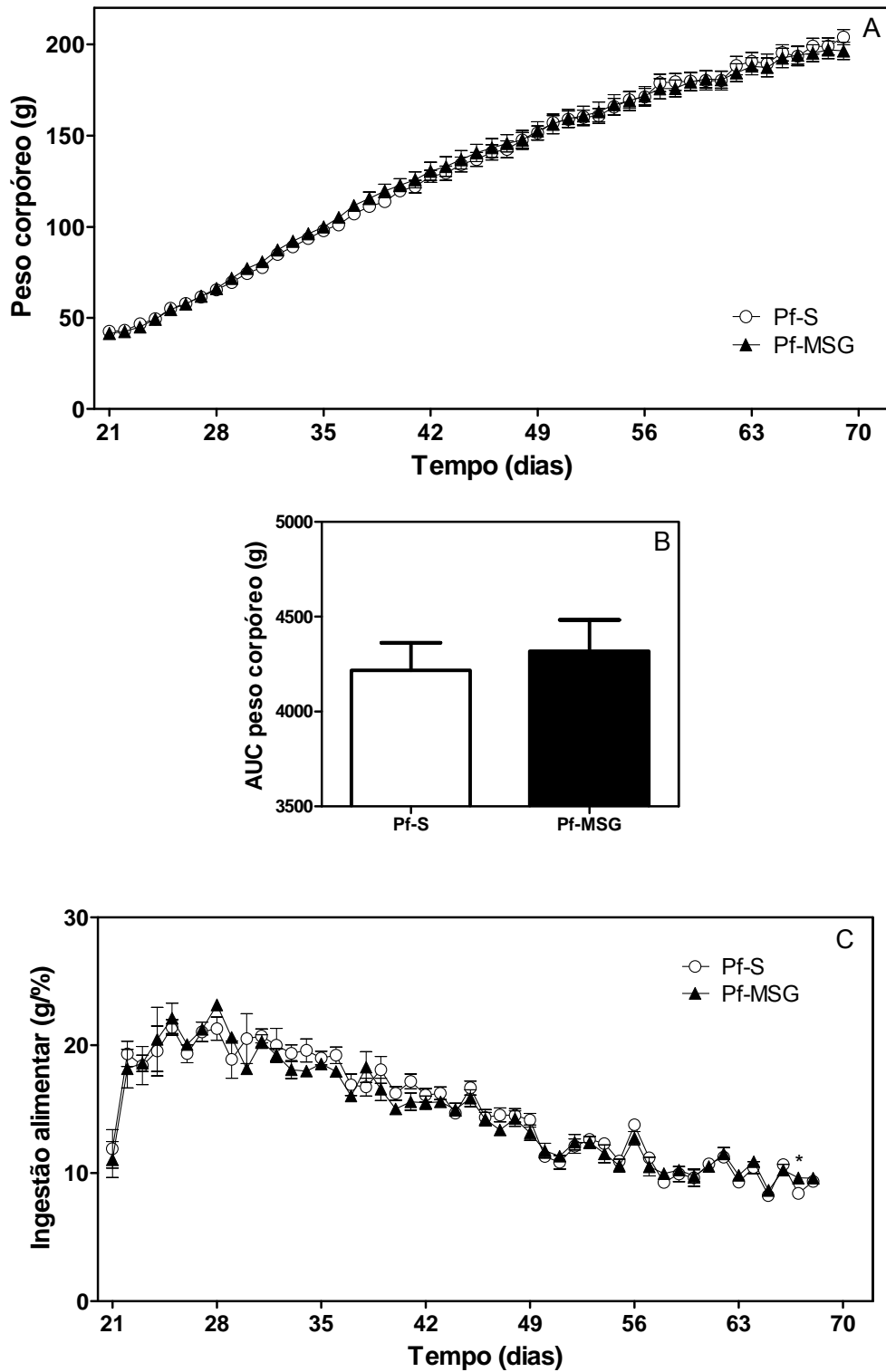


Figura 3 - Variação temporal do peso corpóreo (A) e a respectiva área sob a curva (AUC; B) e ingestão alimentar (C) de prole de fêmeas de ratas tratadas durante o período da lactação com salina (Lf-S) ou glutamato monossódico (Lf-MSG). Cada ponto representa a média \pm EPM de 8 animais. Dados analisados por teste "t" de Student. * $p < 0,04$ versus salina.

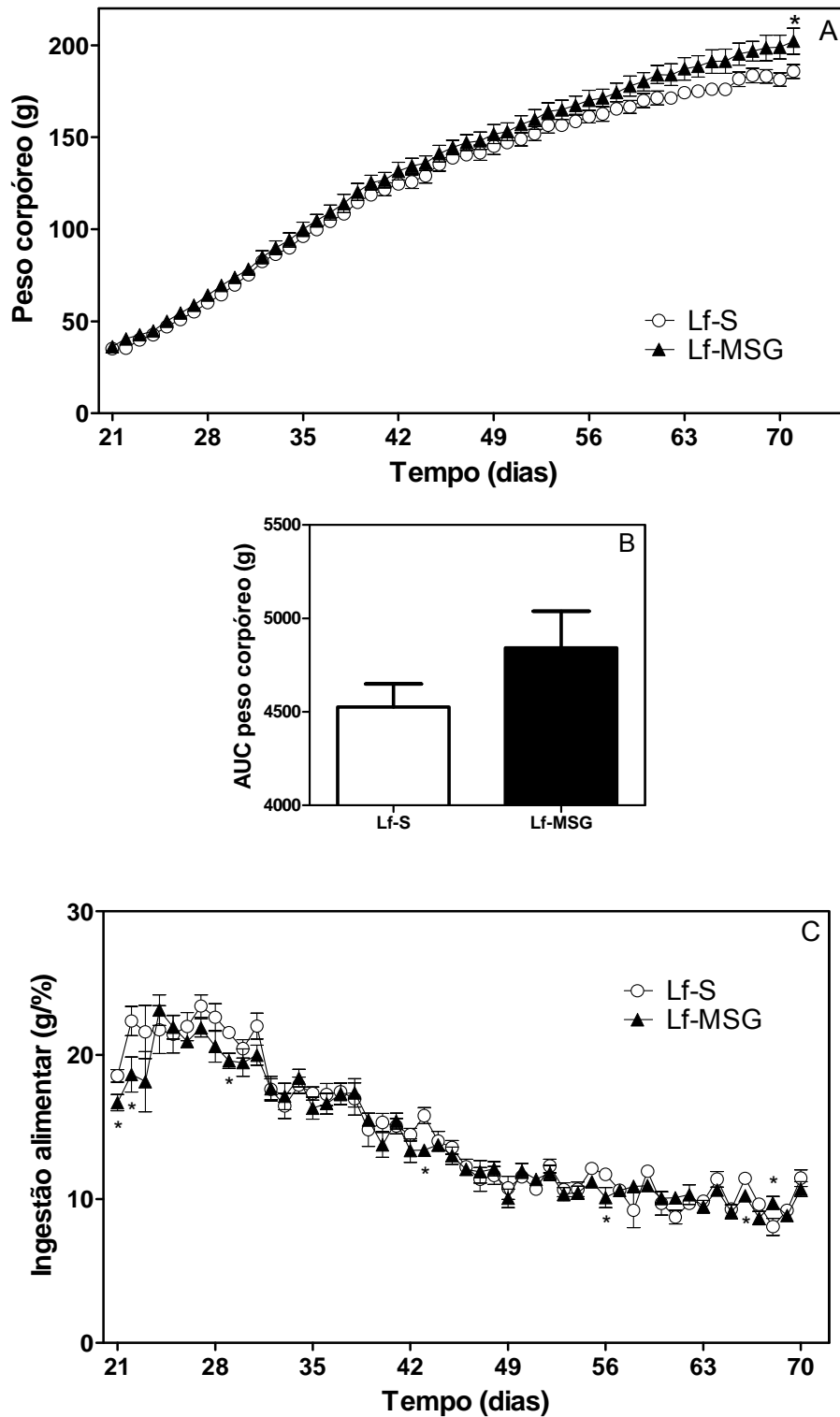


Figura 4 - Variação temporal do peso corpóreo (A) e a respectiva área sob a curva (AUC; B) e ingestão alimentar (C) de prole de fêmeas de ratas tratadas durante o período da prenhez e lactação com salina (PLf-S) ou glutamato monossódico (PLf-MSG). Cada ponto representa a média \pm EPM de 8 animais. Dados analisados por teste "t" de Student. * $p < 0,04$ versus salina.

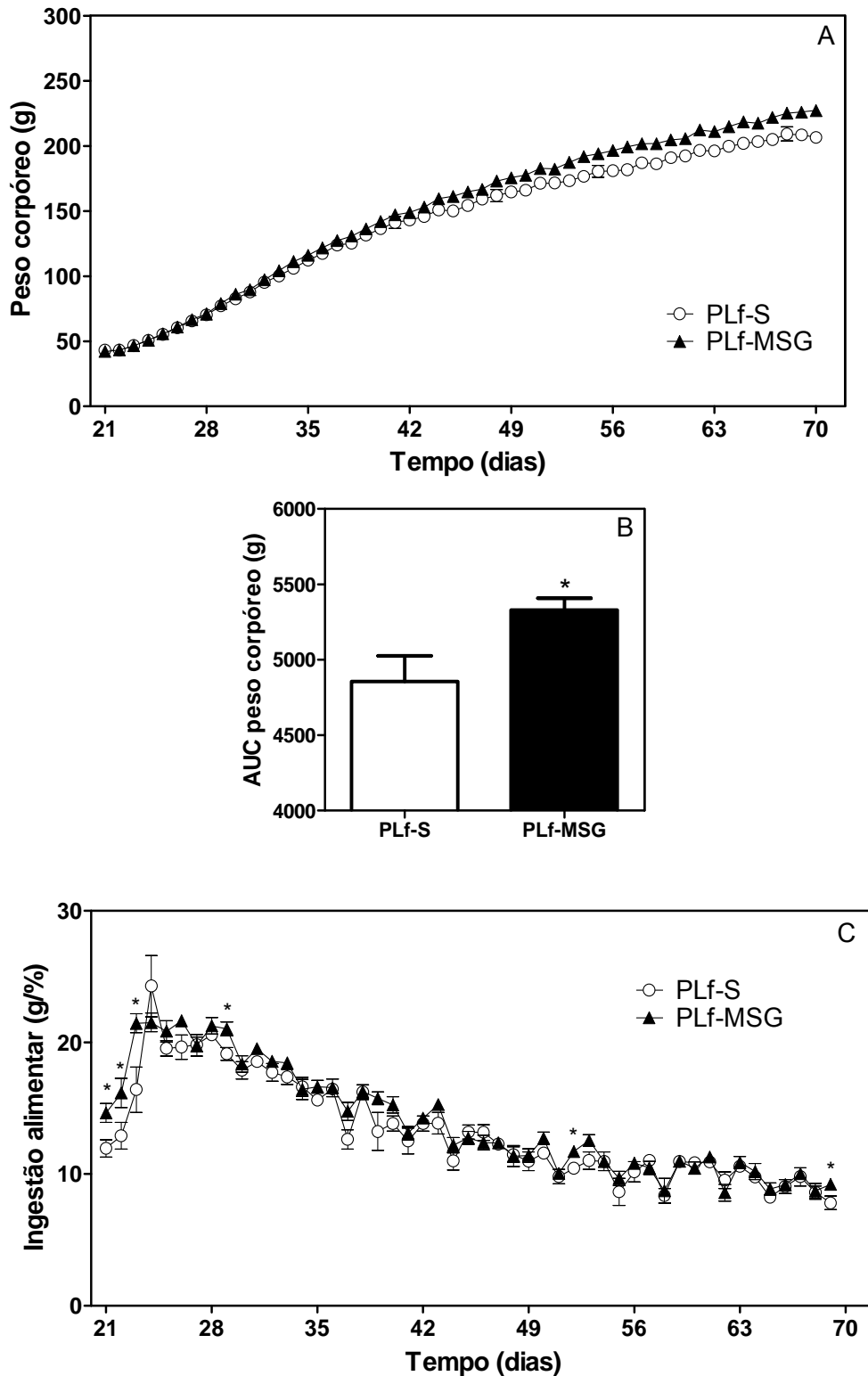


Figura 5 - Variação semanal do índice de Lee de prole de fêmeas de ratas tratadas durante o período da prenhez (Pf; A), lactação (Lf; B) e prenhez e lactação (PLf; C) com salina (S) ou glutamato monossódico (MSG). Cada ponto representa a média \pm EPM de 8 animais. Dados analisados por teste "t" de Student. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,006$ versus salina.

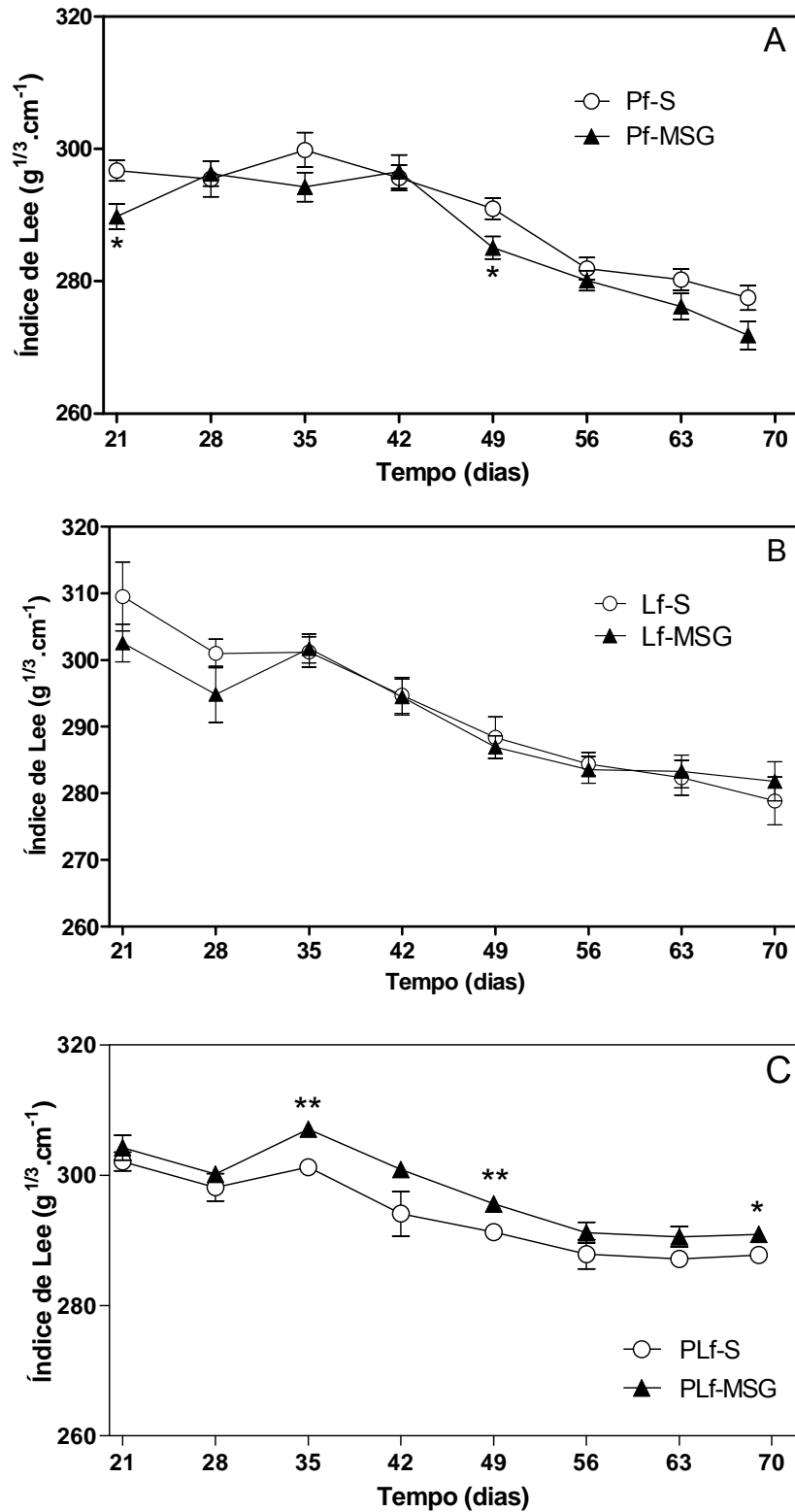


Tabela 2 - Glicose (mg/dL), colesterol (mg/dL), triacilglicerol (mg/dL), corticosterona ($\mu\text{g/dL}$) e ácidos graxos livres ($\mu\text{moles/dL}$) plasmáticos, glicogênio hepático (g/100 g), peso do tecido adiposo (TA) branco perigonadal e retroperitoneal (g/100 g) de proles fêmeas de ratas tratadas durante o período da prenhez (Pf), lactação (Lf), e prenhez e lactação (PLf) com salina (S) ou glutamato monossódico (MSG).

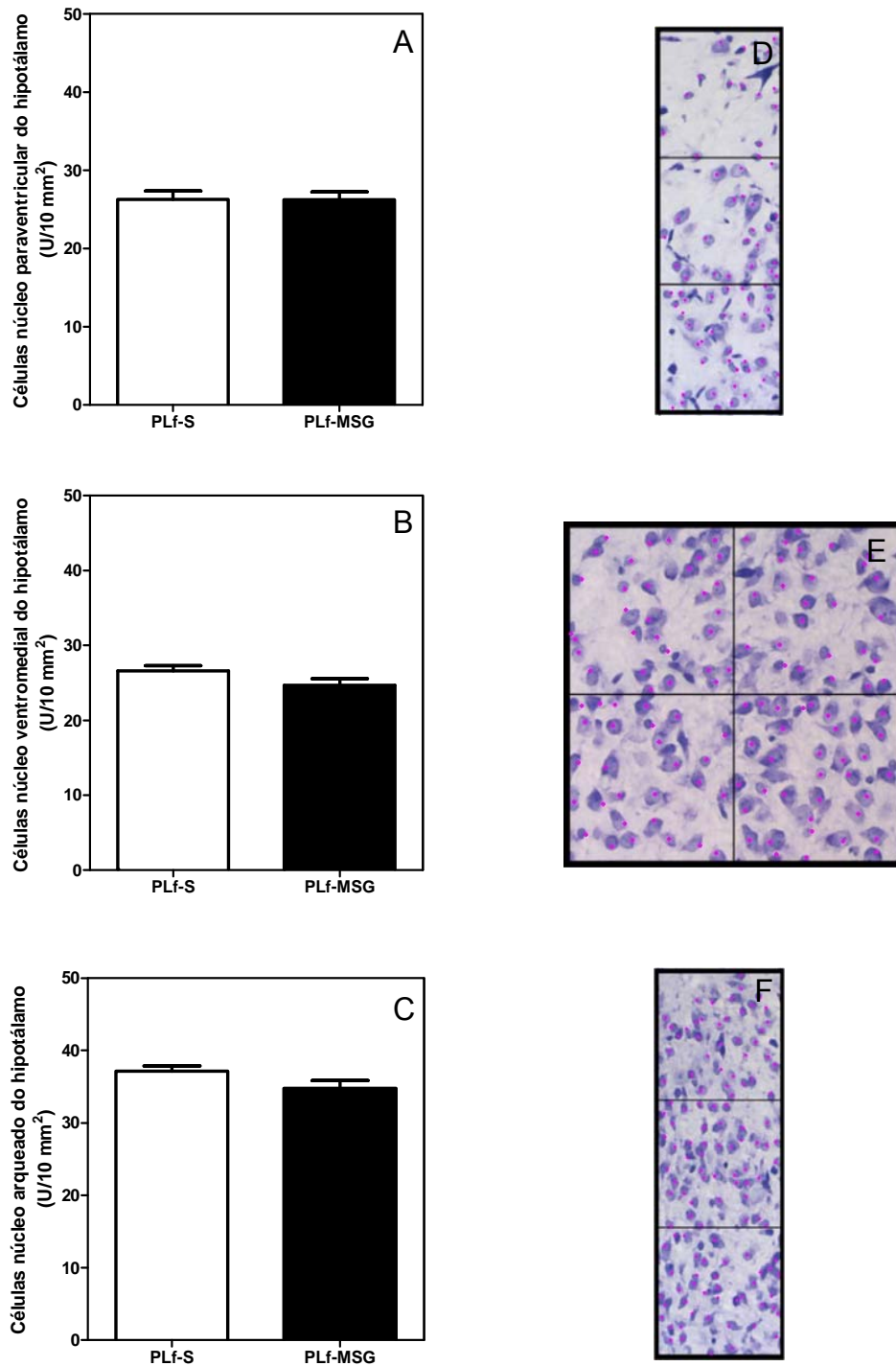
	Pf-S	Pf-MSG	Lf-S	Lf-MSG	PLf-S	PLf-MSG
Glicose	122,10 \pm 2,2 (n=8)	125,8 \pm 4,2 (n=8)	114,60 \pm 4,9 (n=8)	123,10 \pm 3,4 (n=8)	131,90 \pm 3,5 (n=8)	133,00 \pm 4,2 (n=8)
Colesterol	99,23 \pm 3,1 (n=8)	95,01 \pm 7,3 (n=8)	71,52 \pm 4,3 (n=6)	81,14 \pm 2,4 (n=8)	101,90 \pm 8,6 (n=8)	93,92 \pm 6,1 (n=8)
Triacilglicerol	68,53 \pm 8,9 (n=8)	71,68 \pm 10,8 (n=8)	57,29 \pm 9,4 (n=8)	58,70 \pm 9,1 (n=8)	43,92 \pm 4,9 (n=8)	44,97 \pm 4,7 (n=7)
Corticosterona	4,33 \pm 0,8 (n=8)	5,32 \pm 0,6 (n=8)	5,26 \pm 0,5 (n=8)	3,45 \pm 0,5* (n=8)	6,10 \pm 0,8 (n=8)	4,58 \pm 0,3 (n=8)
Glicogênio Hepático	4,69 \pm 0,41 (n=8)	4,71 \pm 0,28 (n=8)	3,65 \pm 0,37 (n=8)	3,64 \pm 0,32 (n=8)	3,33 \pm 0,24 (n=7)	4,29 \pm 0,37 (n=8)
TA perigonadal	1,34 \pm 0,12 (n=8)	1,79 \pm 0,16* (n=8)	1,31 \pm 0,12 (n=8)	1,45 \pm 0,19 (n=8)	2,04 \pm 0,23 (n=8)	2,11 \pm 0,28 (n=8)
TA retroperitoneal	0,42 \pm 0,03 (n=8)	0,65 \pm 0,08* (n=8)	0,47 \pm 0,04 (n=8)	0,48 \pm 0,05 (n=8)	0,70 \pm 0,07 (n=8)	0,68 \pm 0,09 (n=8)
Ácidos graxos livres	67,56 \pm 5,12 (n=8)	54,77 \pm 3,84 (n=8)	43,49 \pm 4,04 (n=8)	56,80 \pm 4,37* (n=8)	28,52 \pm 2,19 (n=8)	31,31 \pm 3,76 (n=8)

Valores expressos como média \pm EPM. (n) Número de animais.

*Comparação entre os respectivos grupos salina e MSG com $p < 0,05$.

Resultados analisados por teste "t" de Student.

Figura 6 - Contagem dos neurônios de 2 cortes contendo o núcleo paraventricular (A), 3 cortes contendo o núcleo ventromedial (B) e 4 cortes contendo o núcleo arqueado (C) do hipotálamo da prole de fêmeas de ratas tratadas durante o período da prenhez e lactação (PLf) com salina (S) ou glutamato monossódico (MSG), com respectivas imagens (D, E, F) obtidas por microscopia óptica (aumento 10x), coloração de Nissl e pontos rosas correspondendo às células contadas. Dados são a média \pm EPM de 8 animais. Resultados analisados por teste “t” de Student.



4.3 Efeito do MSG em proles machos

4.3.1 *Peso corpóreo, consumo alimentar e índice de Lee*

Os grupos Pm-MSG (figura 7) e PLm-MSG (figura 9) não apresentaram diferenças estatísticas nas AUCs do peso corpóreo e aumentos pontuais na ingestão alimentar, sendo que no grupo Lm-MSG (figura 8) houve tendência ao aumento do peso corpóreo ($p=0,13$) sem alterações significativas na ingestão alimentar, quando comparado ao seu respectivo controle.

Em relação ao índice de Lee (figura 10), durante todo o período avaliado, os grupos Pm-MSG e Lm-MSG não foram diferentes de seus controles, contudo o grupo PLm-MSG apresentou aumento significativo em diversos momentos, DPN 21 ($p<0,05$), DPN 35 ($p<0,05$), DPN 63 ($p<0,05$) e DPN 70 ($p<0,009$).

4.3.2 *Parâmetros plasmáticos, hepáticos e do tecido adiposo*

Os valores médios de glicemia, colesterol, triacilgliceróis, glicogênio hepático, tecido adiposo perigonadal e retroperitoneal, e ácidos graxos livres não diferiram entre os grupos (tabela 3). Porém, tendência a aumento dos triacilgliceróis é verificada em todos os grupos de machos em relação aos seus controles, sendo que para o grupo PLm o aumento foi de 58%, mas com uma dispersão muito elevada não resultando em diferença estatisticamente significativa ($p=0,086$).

No grupo Pm-MSG (tabela 3) observou-se diferença ($p<0,02$) apenas na concentração plasmática de corticosterona, com diminuição de 30% em relação ao seu controle.

4.3.3 *Núcleos hipotalâmicos*

Pela análise histológica dos núcleos hipotalâmicos dos grupos PLm-S e PLm-MSG, não encontrou-se nenhuma diferença significativa na contagem de células nos núcleos PVN, VMH e ARC (figura 11) entre controles e experimentais.

Figura 7 - Variação temporal do peso corpóreo (A) e a respectiva área sob a curva (AUC; B) e ingestão alimentar (C) de prole de machos de ratas tratadas durante o período da prenhez com salina (Pm-S) ou glutamato monossódico (Pm-MSG). Cada ponto representa a média \pm EPM de 8 animais. Dados analisados por teste "t" de Student. ** $p < 0,008$ versus salina.

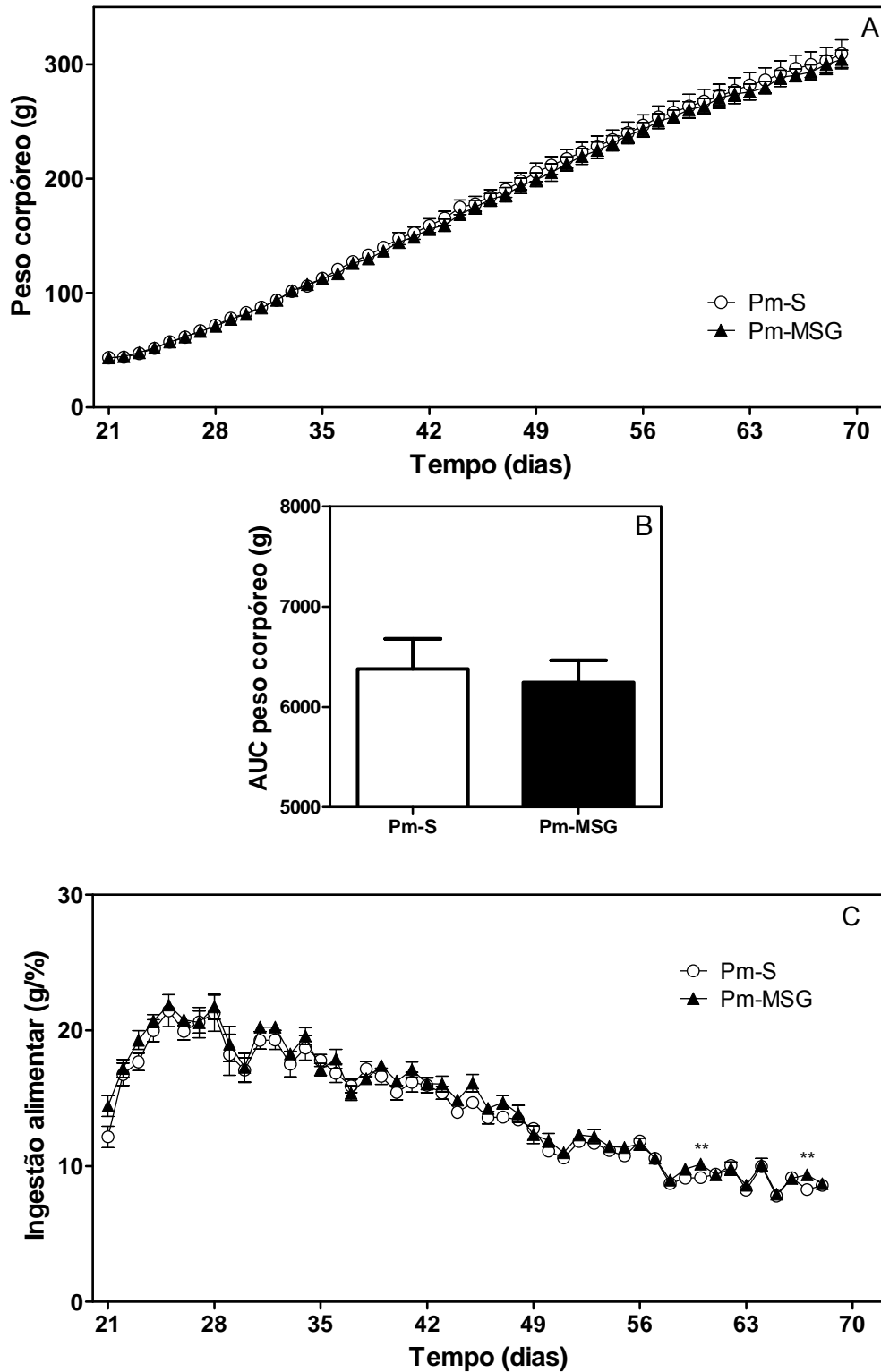


Figura 8 - Variação temporal do peso corpóreo (A) e a respectiva área sob a curva (AUC; B) e ingestão alimentar (C) de prole de machos de ratas tratadas durante o período da lactação com salina (Lm-S) ou glutamato monossódico (Lm-MSG). Cada ponto representa a média \pm EPM de 8 animais. Dados analisados por teste “t” de Student.

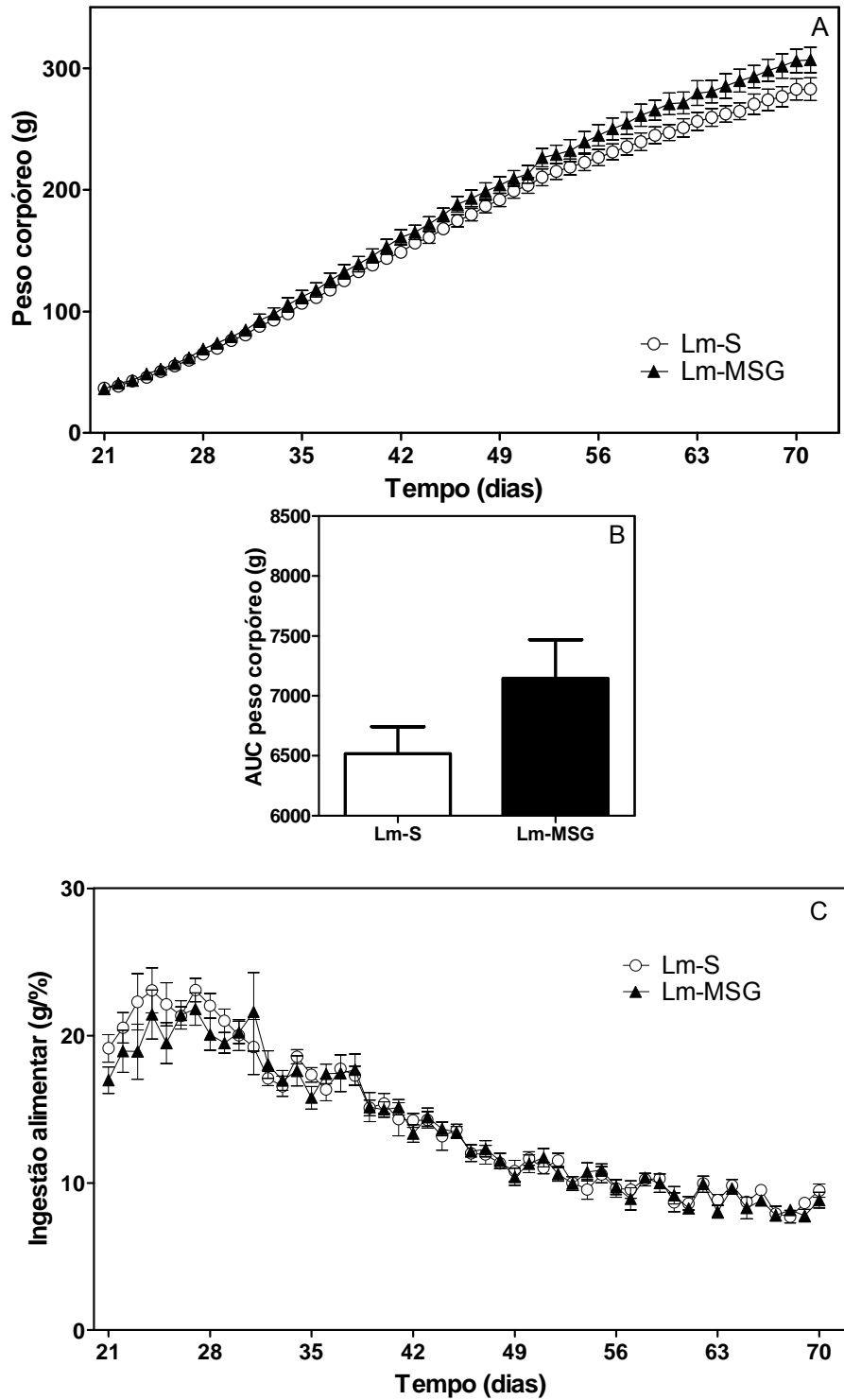


Figura 9 - Variação temporal do peso corpóreo (A) e a respectiva área sob a curva (AUC; B) e ingestão alimentar (C) de prole de machos de ratas tratadas durante o período da prenhez e lactação com salina (PLm-S) ou glutamato monossódico (PLm-MSG). Cada ponto representa a média \pm EPM de 8 animais. Dados analisados por teste "t" de Student. * $p < 0,04$ e ** $p < 0,006$ versus salina.

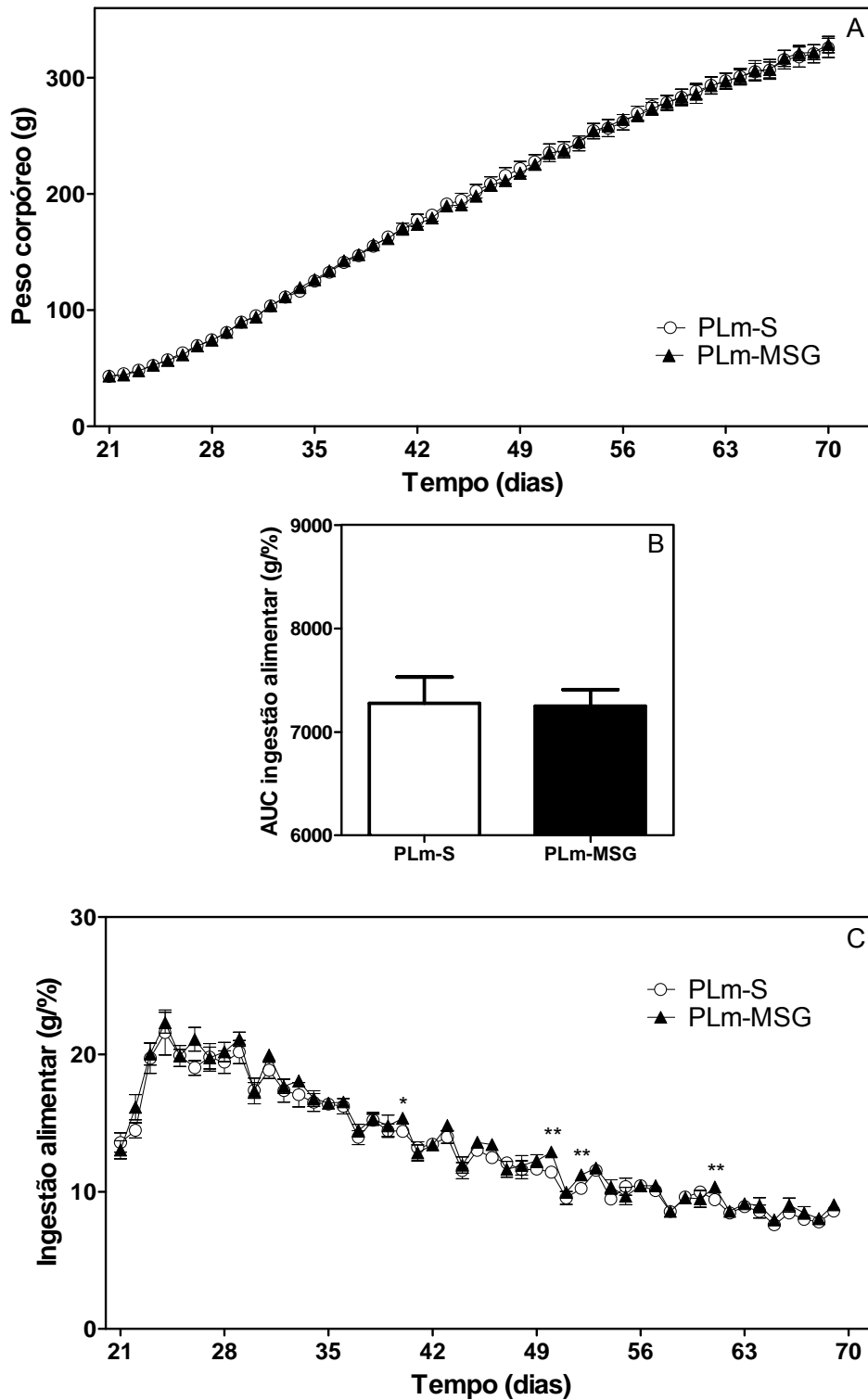


Figura 10 - Variação semanal do índice de Lee de prole de machos de ratas tratadas durante o período da prenhez (Pm; A), lactação (Lm; B) e prenhez e lactação (PLm; C) com salina (S) ou glutamato monossódico (MSG). Cada ponto representa a média \pm EPM de 8 animais. Dados analisados por teste "t" de Student. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,009$ versus salina.

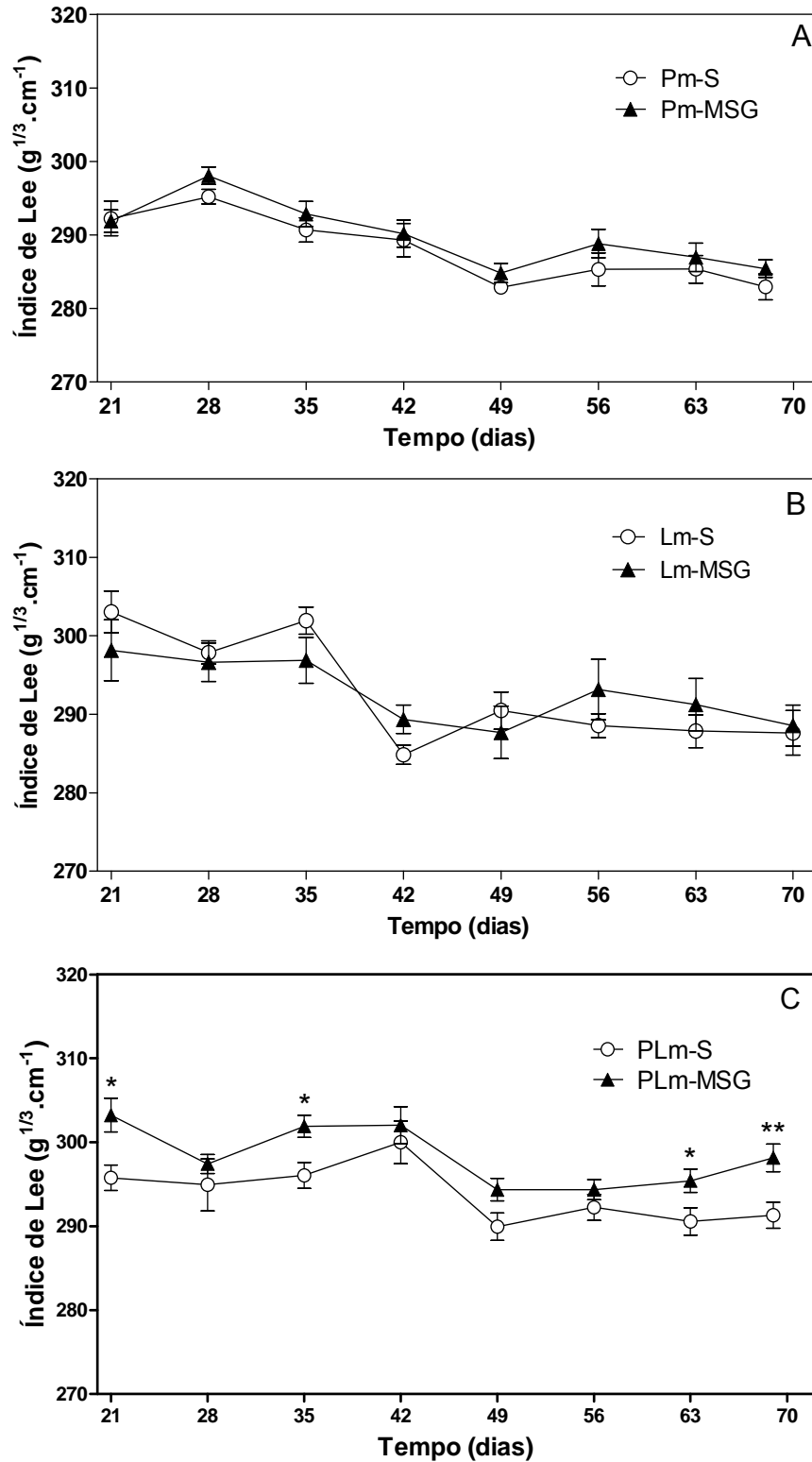


Tabela 3 - Glicose (mg/dL), colesterol (mg/dL), triacilglicerol (mg/dL), corticosterona ($\mu\text{g/dL}$) e ácidos graxos livres ($\mu\text{moles/dL}$) plasmáticos, glicogênio hepático (g/100 g), peso do tecido adiposo (TA) branco perigonadal e retroperitoneal (g/100 g) de proles machos de ratas tratadas durante o período da prenhez (Pm), lactação (Lm), e prenhez e lactação (PLm) com salina (S) ou glutamato monossódico (MSG).

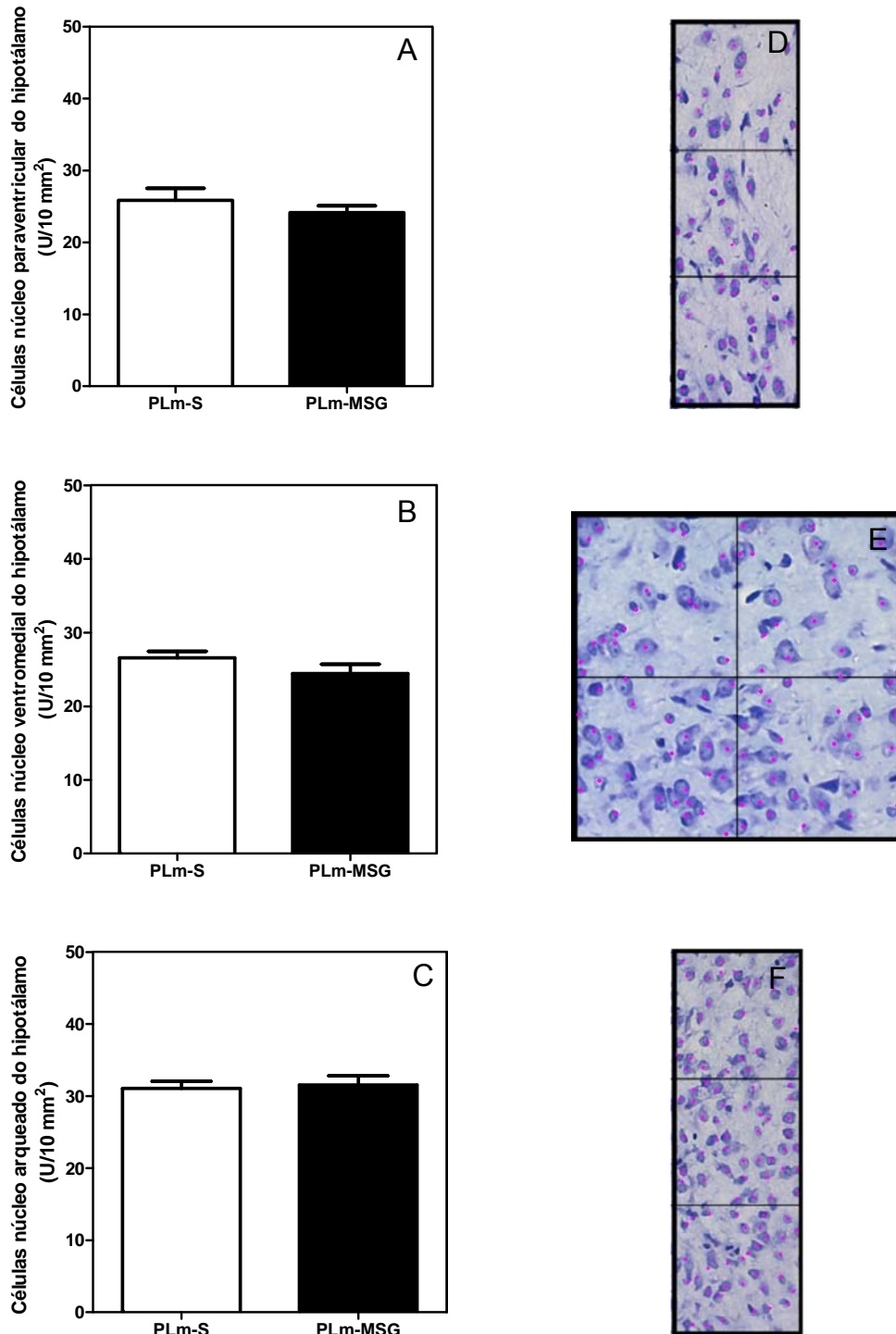
	Pm-S	Pm-MSG	Lm-S	Lm-MSG	PLm-S	PLm-MSG
Glicose	125,3 \pm 2,2 (n=8)	120,2 \pm 2,1 (n=8)	121,5 \pm 3,9 (n=8)	126,3 \pm 2,8 (n=8)	133,3 \pm 2,1 (n=8)	132,0 \pm 2,1 (n=8)
Colesterol	92,03 \pm 7,9 (n=8)	83,99 \pm 7,1 (n=8)	76,69 \pm 6,9 (n=6)	89,86 \pm 4,9 (n=8)	91,62 \pm 4,0 (n=8)	88,63 \pm 7,1 (n=8)
Triacilglicerol	151,6 \pm 19,5 (n=8)	174,2 \pm 16,1 (n=8)	88,87 \pm 10,2 (n=8)	108,60 \pm 12,9 (n=8)	94,73 \pm 13,1 (n=8)	150,1 \pm 26,9 (n=7)
Corticosterona	3,81 \pm 0,4 (n=8)	2,62 \pm 0,2* (n=8)	3,74 \pm 0,8 (n=8)	2,89 \pm 0,3 (n=8)	6,45 \pm 0,3 (n=8)	6,09 \pm 0,3 (n=8)
Glicogênio Hepático	5,39 \pm 0,21 (n=8)	5,61 \pm 0,26 (n=8)	4,68 \pm 0,41 (n=8)	4,46 \pm 0,41 (n=8)	4,53 \pm 0,23 (n=7)	5,15 \pm 0,26 (n=8)
TAperigonadal	1,09 \pm 0,07 (n=8)	1,14 \pm 0,06 (n=8)	0,77 \pm 0,09 (n=8)	0,78 \pm 0,04 (n=8)	0,82 \pm 0,06 (n=8)	0,99 \pm 0,08 (n=8)
TAretroperitoneal	0,94 \pm 0,09 (n=8)	1,18 \pm 0,11 (n=8)	0,75 \pm 0,07 (n=8)	0,72 \pm 0,06 (n=8)	1,03 \pm 0,09 (n=8)	0,97 \pm 0,10 (n=8)
Ácidos graxos livres	78,85 \pm 8,70 (n=8)	73,53 \pm 9,44 (n=8)	65,71 \pm 6,94 (n=8)	74,39 \pm 9,93 (n=8)	37,01 \pm 4,45 (n=8)	33,36 \pm 3,29 (n=8)

Valores expressos como média \pm EPM. (n) Número de animais.

*Comparação entre os respectivos grupos salina e MSG com $p < 0,02$.

Resultados analisados por teste "t" de Student.

Figura 11 - Contagem dos neurônios de 2 cortes contendo o núcleo paraventricular (A), 3 cortes contendo o núcleo ventromedial (B) e 4 cortes contendo o núcleo arqueado (C) do hipotálamo da prole de machos de ratas tratadas durante o período da prenhez e lactação (PLm) com salina (S) ou glutamato monossódico (MSG), com respectivas imagens (D, E, F) obtidas por microscopia óptica (aumento 10x), coloração de Nissl e pontos rosas correspondendo às células contadas. Dados são a média \pm EPM de 8 animais. Resultados analisados por teste “t” de Student.



5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, a exposição materna ao MSG nos períodos de prenhez e lactação foi realizada para avaliar a ação deste aditivo alimentar sobre o crescimento da prole e sobre seus parâmetros ponderais, metabólicos e hormonais.

A avaliação de parâmetros plasmáticos maternos demonstrou não haver alterações significativas nos valores de glicose, colesterol, triglicérides e corticosterona. Esses achados corroboram estudos que sugerem o desenvolvimento de mecanismos de proteção nas áreas hipotalâmicas com o aumento da idade (O'Hara & Takasaki, 1979; Bogdanov *et al.*, 1996), impedindo a ação neurotóxica do MSG em adultos. São fatores envolvidos nessas alterações, a maturação da barreira hematoencefálica, alterações neuronais induzidas pelo envelhecimento ou mudanças na habilidade do fígado em metabolizar o glutamato (Kizer *et al.*, 1978).

Estudos com animais adultos mostram que dano neuronal causado pelo excesso de glutamato é inexistente ou observado em menor extensão (Dawson, 1983; O'Hara & Takasaki, 1979; Bogdanov *et al.*, 1996; Airoldi *et al.*, 1980; Bunyan, *et al.*, 1976; Monno *et al.*, 1995) e que alterações metabólicas relacionadas à glicemia e insulina não estão presentes em animais tratados quando adultos (Betrán *et al.*, 1992), diferentemente do tratamento em neonatos, sugerindo que a regulação endócrina é muito sensível ao MSG apenas durante o início do período pós-natal. A administração subcutânea de MSG, em ratos neonatos, atinge o tecido cerebral quase imediatamente após a injeção (López-Pérez *et al.*, 2010) pois a barreira hematoencefálica é imatura (Ek *et al.*, 2006).

A exposição materna ao MSG durante o período da prenhez não revelou diferenças significativas no peso corpóreo e ingestão alimentar em prole de fêmeas e machos, porém, a exposição materna ao MSG durante a lactação mostrou uma tendência ao aumento do peso corpóreo, sem alteração significativa na ingestão alimentar em sua prole. E a exposição materna ao MSG durante a gestação e lactação promoveu o aumento do peso corpóreo na prole feminina, sendo que na prole masculina esse parâmetro não se alterou, assim como não houve alteração significativa na ingestão alimentar durante todo o período avaliado.

Em primatas, estudos mostram que grande parte do glutamato administrado nas mães permanece circulante no plasma elevando os valores maternos deste aminoácido, e mesmo com grandes elevações de glutamato no

plasma não ocorre transferência ao feto (Pitkin *et al.*, 1979) e que apenas doses 70 vezes acima do normal resultam em transferência placentária de MSG para a circulação fetal (Stegink *et al.*, 1975).

Esses relatos corroboram dados do presente estudo, mostrando ausência de alterações na prole tratada apenas durante a prenhez e sugerem uma ação eficaz da placenta em proteger o feto, quando comparado à exposição do neonato ao glutamato presente no leite materno. Inclusive, nesse período de amamentação, a barreira hematoencefálica ainda é imatura e seu completo desenvolvimento ocorre 13 dias após seu nascimento (Xu & Ling, 1994).

As proles de fêmeas e machos, em que houve exposição materna ao MSG durante o período de prenhez e lactação apresentaram aumento significativo do índice de Lee em diversos pontos durante todo o período avaliado. Este aumento observado no presente estudo ocorreu devido ao aumento do peso corpóreo, pois a distância naso-anal não diferiu dos controles, da mesma forma como observado por Von Diemen & Trindade (2010).

Bernardis & Pattersson consideram índice de Lee normal para ratos adultos valores entre 294 e 306 g^{1/3}.cm⁻¹, sendo valores acima desses indicativo de obesidade (Bernardis & Patterson, 1968; Bunyan *et al.*, 1976; Nakagawa *et al.*, 2000; Roman-Ramos *et al.*, 2011; Terry *et al.*, 1981). No presente estudo, os valores do índice de Lee não foram superiores aos de referência na literatura, contudo é importante lembrar que a avaliação ocorreu durante a fase de desenvolvimento do animal e nos grupos experimentais houve significativa diferença com relação aos seus controles durante o mesmo período.

Outro fator que sinaliza o quadro de obesidade é o teor lipídico, evidenciado pelo acúmulo de tecido adiposo retroperitoneal (Nakagawa *et al.*, 2000) e perigonadal com aumento significativo da carcaça lipídica (Ribeiro *et al.*, 1997). Contudo, somente na prole feminina em que houve exposição materna ao MSG durante a prenhez, houve aumento significativo do tecido adiposo perigonadal e retroperitoneal.

Resultados controversos também são encontrados em relação às alterações em parâmetros plasmáticos. Não se observou neste estudo alteração na glicemia, colesterolemia e glicogênio hepático, mas tendência a aumento de triacilgliceróis nas proles de machos, corroborando estudos de outros autores (Ribeiro *et al.*, 1997; Collison *et al.*, 2010; Nakagawa *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*,

2013). Nakagawa *et al.* (2000) e Collison *et al.* (2010) observaram significativo aumento de triacilgliceróis em machos e tendência nas fêmeas com 29 semana de idade cujas mães receberam MSG na água pelo período de prenhez e lactação. Essas diferenças entre os resultados aqui apresentados e desses autores podem estar relacionadas ao período de tempo de avaliação da prole no presente estudo. Além disso, os autores salientam as diferenças em relação ao sexo que aqui também se fizeram presentes.

Em relação aos ácidos graxos livres, apenas na prole feminina de mães expostas ao MSG no período da lactação houve aumento significativo desse parâmetro. Estudos em prole de machos são controversos, pois Afifi & Abbas (2011) relataram aumento dos lipídeos totais enquanto Nakamura e colaboradores (2013) não observaram alterações nos ácidos graxos livres.

Envolvido na etiologia da obesidade de animais neonatos tratados com MSG está o aumento de corticosterona, o qual exerce efeito supressivo sobre o tecido adiposo, e promove resistência insulínica com diminuição de GLUT4 (Magariños *et al.*, 1988; Dolnikoff *et al.*, 1988; Papa *et al.*, 1997; Dolnikoff *et al.*, 2001). No presente trabalho, os grupos que apresentaram aumento no índice de Lee, proles de machos e fêmeas de mães expostas ao MSG durante a prenhez e lactação, não apresentaram alteração na corticosteronemia. A diminuição significativa de corticosterona plasmática observada na prole de machos de mães expostas ao MSG durante a prenhez e na prole de fêmeas de mães expostas ao MSG durante a lactação não foi acompanhada de qualquer outra alteração metabólica, sugerindo novas investigações para esclarecer essa resposta.

O ácido glutâmico atua em todas as células do corpo como um intermediário metabólico e constituinte proteico, mas no SNC exerce sua principal função como um importante neurotransmissor excitatório em receptores NMDA, sendo liberado em 40% das sinapses no cérebro de mamíferos (Fonnum, 1984)

O mecanismo básico agudo para produção da excitação e consequente neurotoxicidade do ácido glutâmico baseia-se na despolarização de membranas pós-sinápticas pelo glutamato, em que trocas de íons e água, em excesso, entre os meios intracelular e extracelular, promove o acúmulo intracelular desses íons e água, resultando em edema tóxico e ruptura dos neurônios e dendritos afetados (Rothman & Olney, 1986). Em longo prazo, o acúmulo de cálcio intracelular (Choi, 1985) leva a danos neuronais, com consequente prejuízo da função mitocondrial,

alteração do citoesqueleto e produção de radicais livres tóxicos, resultando na morte neuronal (White *et al.*, 2000).

Susceptível à ação neurotóxica do glutamato sistêmico está principalmente a região cerebral dos órgãos circumventriculares, composta pelo órgão subfornical, área postrema e eminência mediana, contínua ao núcleo arqueado do hipotálamo. Os vasos sanguíneos dessa região possuem endotélio fenestrado e espaço perivascular aumentado, o que permite o contato com as possíveis exotoxinas circulantes no sangue (Price *et al.*, 1981; Perez & Olney, 1972).

No modelo de obesidade por MSG os animais apresentam geralmente hipofagia ou normofagia, peso corpóreo semelhante ou inferior ao controle e índice de Lee indicando obesidade (Bunyan *et al.*, 1976; Terry *et al.*, 1981; Fernandes *et al.*, 2012.) e lesão do ARC (Bunyan *et al.*, 1976; Takasaki, 1978; Ren *et al.*, 2011). Entretanto, Roman-Ramos *et al.*(2011) encontraram peso corpóreo aumentado e Tanaka *et al.*(1978) e Zhang *et al.*(1994) observaram obesidade com ligeiro aumento da ingestão de alimentos e lesão não só no ARC, mas também em dois terços do VMH, ou diminuída função do VMH (Zhang *et al.*,1994), sugerindo que a obesidade por MSG pode estar relacionada a lesões no ARC e no VMH.

No presente trabalho a contagem de neurônios dos núcleos hipotalâmicos PVN, VMH e ARC que estão relacionados ao controle da ingestão alimentar não revelou alteração significativa entre a prole de mães expostas ao MSG no período de prenhez e lactação quando comparado aos seus controles. Mesmo na prole de fêmeas em que houve o aumento da ingestão alimentar não foi observada diminuição no número de células, dessa forma, não confirmando a sugestão de lesão do ARC e VMH para justificar as possíveis causas dessa alteração.

Em concordância com nossos resultados, o estudo de duas gerações de camundongos não mostrou alterações neuronais no hipotálamo, especialmente no ARC (Anantharaman, 1979), da mesma forma, as proles de mães tratadas por via oral com MSG durante o final da prenhez não apresentaram danos neuronais nos órgãos periventriculares e outras regiões do hipotálamo apesar de terem sido observados prejuízos relacionados ao comportamento do animal (Yu *et al.*, 1997).

A avaliação das proles pelo período de 70 dias, no presente estudo, foi suficiente para mostrar uma tendência ao aparecimento de aumento de peso corpóreo e do índice de Lee, principalmente no grupo em que a mãe foi tratada com MSG durante a prenhez e lactação, assim como, o aparecimento de alterações em

alguns parâmetros ponderais e plasmáticos. Algumas alterações ou tendências são aqui evidenciadas inclusive sugerindo diferentes respostas ou sensibilidade entre machos e fêmeas.

Diversos estudos que avaliam a interferência do MSG na prenhez e lactação utilizam a via oral (Afifi & Abbas, 2011; Hermanussen *et al.*, 2006), sendo que no estudo de Von Diemen & Trindade (2010), com exposição materna ao MSG pela ração nos períodos de prenhez e lactação, a prole apresentou diminuição do peso e distância naso-anal (Von Diemen & Trindade, 2010), e naquelas que receberam MSG por administração subcutânea, mas não oral, foi confirmada lesão do ARC dos fetos e das proles recém-desmamadas (Takasaki, 1978).

No presente estudo, optou-se pela via de administração subcutânea, ao invés da via oral, por se tratar de uma via parenteral, em que a absorção é mais lenta e as perdas decorrentes de metabolização são menores, possibilitando um maior tempo de exposição ao MSG. Essa situação foi proposta considerando que humanos se expõem ao aditivo alimentar por diversas refeições durante o dia, as quais podem conter grandes quantidades de MSG aumentando significativamente suas concentrações plasmáticas por um longo período de tempo.

É importante considerar que apesar das semelhanças genômicas entre humanos, primatas e roedores, estudos confirmam que a capacidade de metabolizar o glutamato difere entre eles. Camundongos e macacos adultos metabolizam o glutamato mais rapidamente que humanos adultos (Stegink *et al.*, 1979a). E macacos, assim como homens, possuem variações individuais na habilidade de metabolizar o glutamato (Stegink *et al.*, 1979b).

Comitês (FDA, FASEB e SCF) declaram que o MSG não apresenta risco à saúde, porém, em resposta a estudos em animais, preconizam que aditivos alimentares não devem ser utilizados em alimentos infantis (Walker & Lupien, 2000).

Os dados obtidos no presente estudo sugerem que diversas alterações ocorrem na prole de mães expostas ao MSG. Toda a bibliografia referente ao estudo do MSG nos últimos 50 anos não é conclusiva e em vários momentos controversa, mas há evidência de que o MSG pode ser danoso em diversas condições. Por isso, o consenso em relação ao MSG é seu uso racional em humanos, principalmente durante a gestação e em lactantes.

6 CONCLUSÃO

Os resultados permitiram concluir que:

- Exposição materna ao MSG durante a prenhez promoveu aumento do tecido adiposo branco perigonadal e retroperitoneal em prole de fêmeas, sendo um indicador de obesidade, e diminuição da corticosterona na prole de machos.
- Exposição materna ao MSG durante a lactação promoveu diminuição da ingestão alimentar na prole de fêmeas e machos, e diminuição da corticosterona com aumento de ácidos graxos livres na prole feminina.
- Exposição materna ao MSG no período da prenhez e lactação promoveu aumento do peso corpóreo e ingestão alimentar na prole de fêmeas, e aumentou o índice de Lee, indicador de obesidade, em vários pontos avaliados no tempo, na prole de fêmeas e machos, sugerindo que um maior tempo de exposição pode levar a um quadro de obesidade na idade adulta.

A exposição materna ao MSG durante os períodos de prenhez e/ou lactação promoveu diferentes alterações em sua prole quando adulta, sugerindo um potencial do MSG em causar alterações metabólicas e ponderais e promover obesidade, com diferentes respostas ou sensibilidade entre machos e fêmeas.

REFERÊNCIAS

- AFIFI, M.M.; ABBAS, A. Monosodium glutamate versus diet induced obesity in pregnant rats and their offspring. *Acta Physiologica Hungarica*, v.98, n.2, p.177-188, 2011.
- AIROLDI, L.; BONFANTI, M.; GHEZZI, P.; SALMONA, M.; GARATTINI, S. Effect of oral monosodium glutamate on glutamic acid levels in the nucleus arcuatus of the hypothalamus and on serum osmolality of adult and infant mice. *Toxicology letters*, v.7, p.107-111, 1980.
- ALLAIN, C.C., POON, L.S., CHAN, C.S.G., RICHMOND, W. & FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical Chemistry*, v. 20, p.470-475, 1974.
- ANANTHARAMAN, K. *In utero* and dietary administration of monosodium L-glutamate to mice: reproductive performance and development in a multigeneration study. *Glutamic Acid: Advances in Biochemistry and Physiology*, p.231-253. Raven Press, New York, 1979.
- BERNARDIS, L.L.; PATTERSON, B.D. Correlation between "Lee Index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *Journal Endocrinology*, v.40, p.527-528, 1968.
- BETRÁN, M.A.; ESTORNELL, E.; BARBER, T.; CABO, J. Nitrogen metabolism in obesity induced by monosodium-L-glutamate in rats. *International journal of obesity and related metabolic disorders*, v.16, n.8, p.555-564, 1992.
- BOGDANOV, M.B.; TJURMINA, O.A.; WURTMAN, R.J. Consumption of high dietary dose of monosodium glutamate fails to affect extracellular glutamate levels in the hypothalamic arcuate nucleus of adult rats. *Brain research*, v.736, p.76-81, 1996.
- BUNYAN, J.; MURRELL, E.A.; SHAH, P.P. The induction of obesity in rodents by means of monosodium glutamate. *The British journal of nutrition*, v.35, n.1, p.25-39, 1976.
- COLLISON, K.S.; MAKHOUL, N.J.; INGLIS, A.; AL-JOHI, M.; ZAIDI, M.Z.; MAQBOLL, Z.; SALEH, S.M.; BAKHEET, R.; MONDREAL, R.; AL-RABIAH, R.; SHOUKRI, M.; MILGRAM, N.W.; AL-MOHANNA, F.A. Dietary trans-fat combined with monosodium glutamate induces dyslipidemia and impairs spatial memory. *Physiology Behavior*, v.99, p.334-42, 2010.
- CHOI, D.W. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neuroscience Letters*, v.58, n.3, p.293-297, 1985.
- DAWSON, JR. R. Acute and long lasting neurochemical effects of monosodium glutamate administration to mice. *Neuropharmacology*, v.22, p.1417-1419, 1983.
- DAWSON, J.R.; WALLACE, D.R.; GABRIEL, S.M. A pharmacological analysis of food intake regulation in rats treated neonatally with monosodium L-glutamate (MSG). *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v.32, p.391-398, 1989.
- DOLNIKOFF, M.S.; KATER, C.E.; EGAMI, M.; DE ANDRADE, I.S.; MARMO, M.R. Neonatal treatment with monosodium glutamate increases plasma corticosterona in the rat. *Neuroendocrinology*, v.48, n.6, p.645-649, 1988.
- DOLNIKOFF, M.; MARTÍN-HIDALGO, A.; MACHADO, U.F.; LIMA, F.B.; HERRERA, E. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. *International Journal of Obesity*, v.25, p.436-433, 2001.

EK, C.J.; DZIEGIELEWSKA, K.M.; STOLP, H.; SAUNDERS, N.R. Functional effectiveness of the blood-brain barrier to small water soluble molecules in developing and adult opossum (*Monodelphis domestica*). *The journal of comparative neurology*, v.496, n.1, p.13-26, 2006.

FALHOLT, K.; LUND, B.; FALHOLT, W. An easy colorimetric micro method for routine determination of free fatty acids in plasma. *Clinica Chemica Acta*, v.46, p.105-111, 1973.

FERNANDES, G.S.A.; ARENA, A.; CAMPOS, K.E.C.; VOLPATO, G.T.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; DAMASCENO, D.C.; KEMPINAS, W.G. Glutamate-induced obesity leads to decrease sperm reserves and acceleration of transit time in the epididymis of adult male rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.10, p.105, 2012.

FERNSTROM, J.D.; CAMERON, J.L.; FERNSTROM, M.H.; MCCONAHA, C.; WELTZIN, T.E.; KAYE, W.H. Short-term neuroendocrine effects of a large oral dose of monosodium glutamate in fasting male subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v.81, n.1, p.184-191, 1996.

FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *Journal of neurochemistry*, v.42, n.1, p.1-11, 1984.

GAO, S.; MORAN, T.H.; LOPASCHUK, G.D.; BUTLER, A.A. Hypothalamic malonyl-Coa and the control on food intake. *Physiology Behavior*, v.122, p.17-24, 2013.

GEHA, R.S.; BEISER, A.; REN, C.; PATTERSON, R.; GREENBERGER, P.A.; GRAMMER, L.C.; DITTO, A.M.; HARRIS, K.E.; SHAUGHNESSY, M.A.; YARNOLD, P.R.; CORREN, J.; SAXON, A. Multicenter, double-blind, placebo-controlled, multiple-challenge evaluation of reported reactions to monosodium glutamate. *The Journal of allergy and clinical immunology*, v.106, n.5, p.973-980, 2000.

GHO, 2011. Global Health Observatory. Overweight and obesity. *World Health Organization*. Retirado de http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/ Web 06 Fev 2014.

GUILLEMIN, R.; CLAYTON, G.W.; LIPSCOMB, H.S.; SMITH, J.D. Fluorimetric measurement of rat plasma and adrenal corticosterone concentration. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v.53, p.830-832, 1959.

HASSID, W.Z.; ABRAHAM, S. Chemical procedures for analysis of polysaccharides. *Methods in Enzimology*. NY: Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. Academic Press, v.3, p.34-51, 1957.

HE, K.; DU, S.; XUN, P.; SHARMA, S.; WANG, H.; ZHAI, F.; POPKIN, B. Consumption of monosodium glutamate in relation to incidence of overweight in Chinese adults: China Health and Nutrition Survey (CHNS). *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.93, n.6, p.1328-1236, 2011.

HERMANUSSEN, M.; GARCIA, A.P.; SUNDER, M.; VOIGT, M.; TRESGUERRES, J.A. Obesity, voracity, and short stature: the impact of glutamate on the regulation of appetite. *European Journal of Clinic Nutrition*, v.60, n.1, p.25-31, 2006.

HIRATA, A.E.; ANDRADE, I.S.; VASKEVICIUS, P.; DOLNIKOFF, M.S. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.30, n.5, p.671-674, 1997.

- JOHANN, C.; LENTINI, A. Simultaneous determination of glycogen from heart muscles. *Analytical Biochemistry*, v.43, p.183-187, 1971.
- KIZER, J.; NEMEROFF, C.B.; YOUNGBLOOD, W.W. Neurotoxic amino acids and structurally related analogs. *Pharmacological reviews*, v.29, n.4, p.301-218, 1978.
- KURIHARA, K.; KASHIWAYANAGI, M. Physiological studies on umami taste. *The Journal of nutrition*, v.130, p.931S-934S, 2000.
- LAWRENCE, C.B.; TURNBULL, A.V.; ROTHWELL, N.J. Hypothalamic control of feeding. *Current opinion in neurobiology*, v.9, n.6, p.778-783, 1999.
- LEIBOWITZ, S.F.; SLADEK, C.; SPENCER L.; TEMPEL, D. Neuropeptide Y, epinephrine and norepinephrine in the paraventricular nucleus: Stimulation of feeding and the release of corticosterone, vasopressin and glucose. *Brain Research Bulletin*, v. 21, p. 905-912, 1988.
- LEIBOWITZ, S.F.; WORTLEY, K.E. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides*, v.25, p.473-504, 2004.
- LÓPEZ-PÉREZ, S.J.; UREÑA-GUERRERO, M.E.; MOLARES-VILLAGRÁN, A. Monosodium glutamate neonatal treatment as a seizure and excitotoxic model. *Brain research*, v.1317, p.246-256, 2010.
- LUCAS, D. R.; NEWHOUSE, J. P. The toxic effect of Sodium L-Glutamate on the inner layers of the retina. *Archives of Ophthalmology*, v.58, n.2, p.193-201, 1957.
- MACHO, L.; FICKOVÁ, M.; JEZOVA, D.; ZÓRAD, S. Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. *Physiology Research*, v.49, n.1, p.79-85, 2000.
- MAGARIÑOS, A.M.; ESTIVARIZ, F.; MORADO, M.I.; DE NICOLA, A.F. Regulation of the central nervous system-pituitary-adrenal axis in rats after neonatal treatment with monosodium glutamate. *Neuroendocrinology*, v. 48, n.2, p.105-111, 1988.
- MAITER, D.; UNDERWOOD, L.E.; MARTIN, J.B.; KOENIG, J.I. Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. *Endocrinology*, v.128, n.2, p.1100-1106, 1991.
- MEISTER, B.; CECCATELLI, S.; HÖKFELT, T., ANDÉN, N.E.; THEODORSSON, E. Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions. *Experimental Brain Research*, v.76, n.2, p.343-368, 1989.
- MICHALANY, J. *Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico*. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária LTDA., 1980.
- MILLIKEN, J.R.; STANDEN, J.L. An investigation into the effects of glutamic acid on human intelligence. *Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry*, v.14, n.1, p.47-54, 1951.
- MONNO, A.; VEZZANI, A.; BASTONE, A.; SALMONA, M.; GARATTINI, S. Extracellular glutamate levels in the hypothalamus and hippocampus of rats after acute or chronic oral intake of monosodium glutamate. *Neuroscience letters*, v.193, n.1, p.45-48.

MORRIS, M.J.; TORTELLI, C.F.; FILIPPIS, A.; PROIETTO, J. Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat. *Regulatory peptides*, v.75-76, p.441-447, 1998.

MORSELLI, P.L.; GARATTINI, S.; Monosodium Glutamate and the Chinese Restaurant Syndrome. *Nature*, v.227, p.611-612, 1970.

NAKAGAWA, T.; UKAI, K.; OHYAMA, T.; GOMITA, Y., OKAMURA, H. Effects of chronic administration of sibutramine on body weight, food intake, and motor activity in neonatally monosodium glutamate-treated obese female rats: relationship of antiobesity effect with monoamines. *Experimental Animals*, v.49, n.4, p.239-49, 2000.

NAKAMURA, H.; KAWAMATA, Y.; KUWAHARA, T.; SMRIGA, M.; SAKAI, R. Long-Term ingestion of monosodium L-glutamate did not induce obesity, dyslipidemia or insulin resistance: a two-generation study in mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v.59, p.129-35, 2013.

O'HARA, Y.; TAKASAKI, Y. Relationship between plasma glutamate levels and hypothalamic lesions in rodents. *Toxicology letters*, v.4, p.499-506, 1979.

PAPA, P.C.; SERAPHIM, P.M.; MACHADO U.F. Loss of weight restores GLUT4 content in insulin-sensitive tissues of monosodium glutamate-treated obese mice. *International journal of obesity*, v.21, p.1065-1070, 1997.

PAPA, P.C.; VARGAS A.M.; DA SILVA, J.L.T.; NUNES, M.T.; MACHADO U.F. GLUT4 protein is differently modulated during development of obesity glutamate-treated mice. *Life Sciences*, v.71, p.1917-1928, 2002.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press. San Diego, 1998.

PEREZ, V.J.; OLNEY, J.W. Accumulation of glutamic acid in the arcuate nucleus of the hypothalamus of the infant mouse following subcutaneous administration of monosodium glutamate. *Journal of neurochemistry*, v.19, n.7, p.1777-1782, 1972.

PITKIN, R.M.; ANN REYNOLDS, W.; STEGINK L.D.; FILER JR. L.J. Glutamate metabolism and placental transfer in pregnancy. *Glutamic Acid: Advances in Biochemistry and Physiology*, pg.103-110. Raven Press, New York, 1979.

PRICE, M.T.; OLNEY, J.W.; LOWRY, O.H.; BUCHSBAUM, S. Uptake of exogenous glutamate and aspartate by circumventricular organs but not other regions of brain. *Journal of neurochemistry*, v.36, n.5; p.1774-1780, 1981.

REN, X.; FERREIRA, J.G.; YECKEL, C.W.; KONDOH, T.; DE ARAUJO, I.E. Effects of ad libitum ingestion of monosodium glutamate on weight gain in C57BL6/J mice. *Digestion*, v.83, p.32-36, 2011.

RIBEIRO, E.B.; NASCIMENTO, C.O.; DE ANDRADE, I.S.; HIRATA, A.E.; DOLNIKOFF M.S. Hormonal and metabolic adaptations to fasting in monosodium glutamate-obese rats. *Journal of comparative physiology. B, biochemical, systemic, and environmental physiology*, v.167, p.430-437, 1997.

ROTHMAN, S.M.; OLNEY, J.W. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damaged. *Annals of Neurology*, v.19, n.2, p.105-111, 1986.

ROMAN-RAMOS, R.; ALMANZA-PEREZ, J.C.; GARCIA-MACEDO, R.; BLANCAS-FLORES, G.; FORTIS-BARRERA, A.; JASSO, E.I.; GARCIA-LORENZANA, M.; CAMPOS-SEPULVEDA, A.E.; CRUZ, M.; ALARCON-AGUILAR, F.J. Monosodium glutamate neonatal intoxication associated with obesity in adult stage is characterized by chronic inflammation and increased mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptors in mice. *Basic and clinical pharmacology and toxicology*, v.108, n.6, p.406-413, 2011.

SCHAUMBURG, H.; BYCK, R. Sin cib-syn: Accent on glutamate. *The New England Journal of Medicine*, v.279, n.2, p.105, 1968.

SCHAUMBURG, H.H.; BYCK, R.; GERSLT, R.; MASHMAN, J.H. Monosodium L-Glutamate: Its pharmacology and role in the Chinese Restaurant Syndrome. *Science*, v.163, n.3869, p.826-828, 1969.

SCHWARTZ, M.W.; WOODS, S.C.; PORTE, D.JR.; SEELEY, R.J.; BASKIN, D.G. Central nervous system control of food intake. *Nature*, v.404, p.661-671, 2000.

SHI, Z.; LUSCOMBE-MARSH, N.D.; WITTERT, G.A.; YUAN, B.; DAI, Y.; PAN, X.; TAYLOR, A.W. 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. *The British journal of nutrition*, v.104, n.3, p.457-463, 2010.

STEGINK, L.D.; PITKIN, R.M.; REYNOLDS, W.A.; FILER, L.J.JR.; BOAZ, D.P.; BRUMMEL, M.C. Placental transfer of glutamate and its metabolites in the primate. *American journal of obstetrics and gynecology*, v.122, n.1, p.70-78, 1975.

STEGINK, L.D.; ANN REYNOLDS, W.; FILER JR., L.J.; BAKER, G.L.; DAABEES, T.T.; PITKIN, R.M. Comparative metabolism of glutamate in the mouse, monkey, and man. *Glutamic Acid: Advances in Biochemistry and Physiology*, pg.85-102. Raven Press, New York, 1979a.

STEGINK, L.D.; FILER JR., L.J.; BAKER, G.L.; MUELLER, S.M.; WU-RIDEOUT, M.Y-C. Factors affecting plasma glutamate levels in normal adult subjects. *Glutamic Acid: Advances in Biochemistry and Physiology*, pg.333-35. Raven Press, New York, 1979b.

TAKASAKI, Y. Studies on brain lesions after administration of monosodium L-glutamate to mice. II. Absence of brain damage following administration of monosodium l-glutamate in the diet. *Toxicology*, v.9, p.307-18, 1978.

TANAKA, K., SHIMADA, M., NAKAO, K., KUSUNOKI, T. Hypothalamic lesion induced by injection of monosodium glutamate in suckling period and subsequent development of obesity. *Experimental neurology*, v.62, p.191-199, 1978.

TARASOFF, L.; KELLY, M.F. Monosodium L-glutamate: a double-blind study and review. *Food and chemical toxicology*, v.31, n.12, p.1019-1035, 1993.

TERRY, L.C.; EPELBAUM, J.; MARTIN, J.B. Monosodium glutamate acute and chronic effects on rhythmic growth hormone and prolactin secretion, and somatostatin in the undisturbed male rat. *Brain Research*, v.217, p.129-42, 1981.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry*, v.6, p.24, 1969.

TOKUYAMA, K.; HIMMS-HAGEN, J. Adrenalectomy prevents obesity in glutamate-treated mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, v.257, p.139-144, 1989.

VON DIEMEN, V.; TRINDADE, M.R.M. Effect of the oral administration of monosodium glutamate during pregnancy and breast-feeding in the offspring of pregnant Wistar rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.25, n.1, p.37-42, 2010.

XU, J.; LING, E. Studies of the ultrastructure and permeability of the blood-brain barrier in the developing corpus callosum in postnatal rat brain using electron dense tracers. *Journal of anatomy*, v.184, p.227-237, 1994.

ZHANG, W.M.; KUCHÁR, S.; MOZES, Š. Fat and RNA content of the VMH cells in rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Brain Research Bulletin*, v.35, n.4, p.383-85, 1994.

ZELENA, D.; JEZOVA, D.; ACS, Z.; MAKARA, G.B. Monosodium glutamate lesions inhibit the N-methyl-D-aspartate-induced growth hormone but not prolactin release in rats. *Life sciences*, v.62, n.22, p.2065-2072, 1998.

WALKER, R.; LUPIEN, J.R. The safety evaluation of monosodium glutamate. *The Journal of nutrition*, v.130, p.1049S-1052S, 2000.

WHEIL-MALHERBE, H. Studies on brain metabolism: The metabolism of glutamic acid in brain. *The biochemical journal*, v.30, n.4, p.665-676, 1936.

WHITE, B.C.; SULLIVAN, J.M.; DEGRACIA, D.J.; O'NEIL, B.J.; NEUMAR, R.W.; GROSSMAN, L.I.; RAFOLS, J.A.; KRAUSE, G.S. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of neurological sciences*, v.179, p.1-33, 2000.

YAMAGUCHI, S.; NINOMIYA, K. Umami and food palatability. *The Journal of nutrition*, v.130, p.921S-926S, 2000.

YANG, W.H.; DROUIN, M.A.; HERBERT, M.; MAO, Y.; KARSH, J. The monosodium glutamate symptom complex: assessment in a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *The Journal of allergy and clinical immunology*, v.99, n.6, p.757-762, 1997.

YU, T.; ZHAO, Y.; SHI, W.; MA, R.; YU, L. Effects of maternal oral administration of monosodium glutamate at a late stage of pregnancy on developing mouse fetal brain. *Brain Research*, v.747, n.2, p.195-206, 1997.