



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



**Imunodeteccção do receptor metabotrópico mGluR8 no
núcleo arqueado do hipotálamo de ratos Wistar e estudo
dos efeitos, no receptor, resultantes da exposição oral
sub-crônica ao glutamato monossódico.**

Thaís Fernanda Pinto de Almeida Freitas
Bióloga

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes
Orientador

Prof. Dr. Claudio Antonio Barbosa de Toledo
Co-orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da
Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em
Ciência de Alimentos.

Campinas - SP
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

F884i Freitas, Thaís Fernanda Pinto de Almeida
Imunodeteção do receptor metabotrópico mGluR8 no núcleo arqueado do hipotálamo de ratos Wistar e estudo dos efeitos, no receptor, resultantes da exposição oral sub-crônica ao glutamato monossódico / Thaís Fernanda Pinto de Almeida Freitas. -- Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Felix Guillermo Reyes Reyes
Co-orientador: Claudio Antonio Barbosa de Toledo
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Glutamato. 2. Glutamato monossódico. 3. Receptores glutamatérgicos. 4. Núcleo arqueado do hipotálamo. I. Reyes Reyes, Felix Guilherme. II. Toledo, Claudio Antonio Barbosa de. III. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Imunodetection of mGluR8 receptor in the arcuate nucleus of the hypothalamus of Wistar rats and study of the effects, on the receptor, resulting from sub-chronic exposure to monosodium glutamate

Palavras-chave em inglês (Keywords): Glutamate, Monosodium glutamate, Glutamatergic receptors, Hypothalamic arcuate nucleus

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Felix Guillermo Reyes Reyes

Ana Lúcia Beirão Cabral

Dora Maria Grassi Kassis

Data da defesa: 22/02/2011

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

.....
Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes
(Presidente)

.....
Prof.^a Dr.^a Ana Lucia Beirão Cabral
(Membro)

.....
Prof.^a Dr.^a Dora Maria Grassi Kassisse
(Membro)

.....
Prof.^o Dr.^o Miguel Arcanjo Areas
(Suplente)

.....
Prof.^a Dr.^a Sandra Regina Mota Ortiz
(Suplente)

Campinas - SP

À:
Minha mãe, que tanto me apoiou, foi mais que mãe, foi amiga e professora nas horas em
que foi necessário, sempre me acolhendo e ajudando. Te amo incondicionalmente!
Pai sei que você esteve comigo todo esse tempo, sempre me lembrando da persistência
existente em nós. Te amo!
Marcinha, você é muito mais que companheira de laboratório, minha amiga querida. Te
amo!

Agradecimentos:

Por ordem cronológica.

Meu Pai Celestial que sempre, na sua infinita bondade, me acompanhou, me deu força e discernimento durante toda a jornada.

Profs. Leoni e Raquel sem o incentivo e ajuda de vocês não teria nem cogitado a idéia de prestar o mestrado. O ano em que passamos juntos foi espetacular. Obrigada pela confiança depositada e por todo o apoio.

Prof. Felix pela orientação ajuda e incentivo.

Prof. Miguel pela ajuda e conhecimento repassado.

Susana, minha grande amiga, obrigada pela sabedoria que me passou, pela acolhida em sua casa, por todas as gargalhadas (e não foram poucas), pelos almoços e principalmente por estar comigo até hoje. Te amo!

Aos amigos da UNICAMP: Hellen, Marcela, Silvia, e todos do Lab. Toxicologia de Alimentos, muitíssimo obrigada por tudo, pelas conversas e risadas, conhecimentos adquiridos e ajuda indispensável para que tudo fluísse bem.

Hélio, a sua companhia fez meus dias serem mais divertidos. Te adoro muito e até os 90 anos estarei contigo.

Prof. Claudio, sem você nada disso seria possível. Obrigada pela confiança, por me ceder espaço no NUPEN e me mostrar o quão grande é o mundo da ciência. Te admiro por tudo o que o senhor é, e ainda mais pela pessoa que enxergo: um grande homem com um coração maior ainda. Muito obrigada!

Amigos do Neuro I, Renato, João Roberto, Juliana, Gisele, Vinícius, Thiago e Felipe, Prof.^a Ana e Prof.^a Fátima, Prof.^a Sandra Ortiz, e amigos da UNICID, vocês têm um lugar especial em meu coração. Todos fizeram parte de um momento único em minha vida, e com certeza, serão sempre lembrados com muito carinho. Desejo toda sorte do mundo a vocês! A todos do NUPEN obrigada!

Aos meus amigos de longa data e familiares que me ouviram e ajudaram em todos os momentos. Muito Obrigada!

Carlos, quem diria que estaríamos juntos na fase final de trabalho! Obrigada pelo apoio e paciência. A sua presença fez com que os meus dias se tornassem mais alegres. Amo você!

Para o final as pessoas a quem dedico este trabalho. Obrigada por tudo, sinceramente, não teria conseguido sem a ajuda e presença de vocês. Mãe e Marcinha, os meus profundos pedidos de desculpas sobre as crises que fiz vocês participarem. Agora vamos nos concentrar em rir desses momentos, que não foram poucos.

“Quem decidir se colocar como juiz da Verdade e do Conhecimento é naufragado
pela gargalhada dos deuses.”

Albert Einstein

ÍNDICE

RESUMO GERAL	xiii
SUMMARY	xv
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Referências Bibliográficas.....	3

CAPÍTULO I. Glutamato Monossódico: Aspectos biológicos e sensoriais.

Resumo	6
Abstract.....	7
Introdução.....	8
Metabolismo do Glutamato	9
Metabolismo do Glutamato no Sistema Nervoso Central	12
Receptores de Glutamato no Sistema Nervoso Central.....	15
Desordens no Sistema Nervoso Central e Glutamato.....	23
Glutamato Monossódico: Umami e aspectos de inoquidade.....	25
Considerações Finais	27
Referências Bibliográficas.....	28

CAPÍTULO II. Imunodeteção do receptor metabotrópico mGluR8 no núcleo arqueado do hipotálamo de ratos Wistar e estudo dos efeitos, no receptor, resultantes da exposição oral sub-crônica ao glutamato monossódico.

Resumo	38
Abstract.....	40
Introdução.....	42
Obesidade Hipotalâmica.....	43
Receptores de Glutamato.....	45
Objetivos.....	48
Objetivo Geral.....	48
Objetivos Específicos.....	49
Materiais e Métodos	49
Animais e Dieta.....	49
Avaliação Imunohistoquímica e coloração de giemsa.....	49
Avaliação Estatística.....	52
Resultados.....	53
Ganho de peso.....	53
Avaliação Imunohistoquímica e giemsa	54
Discussão	63
Conclusões	68
Referências Bibliográficas	69
CONCLUSÕES GERAIS	76
ANEXO I - Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal UNICAMP.....	77
ANEXO II - Trabalho apresentado em evento científico.....	79
ANEXO III - Tabelas de ganho de peso e contagem celular	82

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I. Glutamato Monossódico: Aspectos biológicos e sensoriais.

Figura 1. Estrutura linear da molécula de ácido glutâmico.....	9
Figura 2. Reação de transaminação do α -cetoglutarato em glutamato	11
Figura 3. Conversão α -cetoglutarato em glutamato nos hepatócitos	11
Figura 4. Ciclo glutamato-glutamina no sistema nervoso central	14
Figura 5. Receptores Ionotópicos e Metabotrópicos	16
Figura 6. Mecanismos de ação das proteínas Gs	17
Figura 7. Domínios extracelular e intracelular do receptor metabotrópico para glutamato.....	21

CAPÍTULO II. Imunodeteção do receptor metabotrópico mGluR8 no núcleo arqueado do hipotálamo de ratos Wistar e estudo dos efeitos, no receptor, resultantes da exposição oral sub-crônica ao glutamato monossódico..

Figura 1. Local da inserção da sonda para perfusão intracardíaca, após exposição da caixa torácica	50
Figura 2. Encéfalo de rato após perfusão intracardíaca e período de refrigeração	51
Figura 3. Ganho de peso de ratos Wistar alimentados, durante 90 dias, com dietas adicionadas de glutamato monossódico (MSG) nas concentrações de 0% (controle), 1%, 2,5% e 5%	53
Figura 4. Média de células coradas pela técnica de giemsa nos cinco níveis do núcleo arqueado do hipotálamo (NARC) de ratos Wistar alimentados, durante 90 dias, com dietas adicionadas de glutamato monossódico (MSG) nas concentrações de 0% (controle), 1%, 2,5% e 5% (n=3).....	55
Figura 5. Média de células imunopositivas para mGluR8 nos cinco níveis do núcleo arqueado do hipotálamo (NARC) de ratos Wistar alimentados, durante 90 dias, com dietas contendo glutamato monossódico (MSG) nas concentrações de 0% (controle), 1%, 2,5% e 5% (n=3).....	55

Figura 6. Representação do primeiro nível do núcleo arqueado do hipotálamo (NARC) de ratos Wistar	56
Figura 7. Representação do segundo nível do núcleo arqueado do hipotálamo (NARC) de ratos Wistar	57
Figura 8. Representação do terceiro nível do núcleo arqueado do hipotálamo (NARC) de ratos Wistar	58
Figura 9. Representação do quarto nível do núcleo arqueado do hipotálamo (NARC) de ratos Wistar	59
Figura 10. Representação do quinto nível do núcleo arqueado do hipotálamo (NARC) de ratos Wistar	60
Figura 11. Cortes coronais dos encéfalos de ratos Wistar (grupo controle) com coloração de giemsa	61
Figura 12. Cortes coronais dos encéfalos de ratos Wistar alimentados, durante 90 dias, com dietas contendo glutamato monossódico (MSG) nas concentrações de 0% (controle), 1%, 2,5% e 5%, representando diferentes níveis do núcleo arqueado do hipotálamo (NARC) com marcação imunopositiva para mGluR8	62

Lista de Abreviaturas

AMPA: Receptor ionotrópico para glutamato α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propionato

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHE: Barreira hemato encefálica

CAG: Códon para glutamina – Citosina Arginina Guanina

EPSP: Potencial excitatório pós-sináptico

EW: Núcleo de Edinger-Westphal

FASEB: Federação de Sociedades Americanas para Biologia Experimental

FDA: Food and Drug Administration

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GLU: Glutamato

IGluR: Receptores ionotrópicos para glutamato

JECFA: Comitê FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares e Contaminantes

KA: Receptores ionotrópicos para glutamato ácido caínico

LDP: Depressão de longo prazo

LTP: Potenciação de longo prazo

mGluR: Receptor metabotrópico para glutamato

MSG: Glutamato monossódico

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida

NARC: Núcleo arqueado do hipotálamo

NMDA: Receptores ionotrópicos para glutamato N-metil-D-aspartato

OMS: Organização Mundial de Saúde

PolyQ: Poliglutamina agregada

SNC: Sistema nervoso central

SNE: Sistema nervoso entérico

VGluT: Vesícula transportadora de glutamato

RESUMO GERAL

Alimentar-se faz parte da cultura do ser humano não estando unicamente associado a necessidades fisiológicas. Um alimento é constituído de diversas moléculas dentre elas os aminoácidos. O glutamato (GLU) é o anion de um dos principais aminoácidos encontrados nos alimentos que, além de fazer parte da composição dos alimentos, é uma molécula essencial para a fisiologia do ser humano. Pode também ser ingerido devido ao uso do aditivo alimentar glutamato monossódico (MSG). O GLU desempenha inúmeras funções no organismo, dentre elas podemos citar: neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, precursor de GABA e de aminoácidos como prolina e glutamina. Como neurotransmissor o GLU atua sobre quatro tipos de receptores: ionotrópicos (AMPA, Kainato e NMDA) e metabotrópicos (mGluR1-mGluR8) divididos em três grupos de acordo com a sua homologia genética e mecanismos de ação. Esses receptores estão presentes em praticamente todo o sistema nervoso central (SNC) e em outros órgãos como coração, pulmão e intestino. O MSG é utilizado como realçador de sabor em todo o mundo, sendo que o descobrimento do gosto básico conferido pelo glutamato propiciou a produção industrial do seu sal, glutamato monossódico. O gosto básico conferido pelo glutamato é denominado de Umami, que traduzido do japonês significa gosto bom, delicioso. Existem inúmeros estudos sobre o uso do MSG como aditivo alimentar (função tecnológica), assim como sobre sua função fisiológica e seus efeitos no organismo de mamíferos. Organizações internacionais e agências de regulamentação de muitos países têm reportado e/ou avaliado que o uso do MSG como aditivo alimentar é seguro. Todavia, alguns autores têm relatado efeitos adversos no sistema nervoso central (SNC) associados à exposição ao MSG. Assim, o presente estudo teve como objetivo exibir dado morfológico sobre a localização do receptor mGluR8 no núcleo arqueado do hipotálamo (NARC) de ratos Wistar e avaliar o efeito da ingestão de dietas adicionadas de diferentes concentrações de MSG (0% (controle), 1%, 2,5% e 5%) sobre o mGluR8. Também foi avaliado o ganho de peso corpóreo entre os grupos de animais alimentados com as dietas adicionadas de diferentes concentrações de MSG. Para evidenciar a presença do receptor mGluR8 foi utilizada a técnica de imunohistoquímica. Para avaliar o ganho de peso corpóreo os animais foram pesados semanalmente. Todos os dados, tanto da contagem celular da técnica de imunohistoquímica quanto da pesagem, foram analisados por análise de variância. Os

resultados obtidos indicam não haver diferença significativa ($p < 0,05$) entre os ratos que ingeriram as dietas adicionadas das diferentes concentrações de MSG, tanto para o ganho de peso corpóreo como para a presença de receptores mGluR8 no núcleo arqueado do hipotálamo (NARC).

SUMMARY

Food is part of human culture not only associated to physiological needs. Food is composed of several molecules among them amino acids. Glutamate (GLU) is the anion of one of the main amino acids found in foods that, besides being part of the food composition, is a molecule essential for human physiology. It can also be ingested due to the use of the food additive monosodium glutamate (MSG). The GLU performs many functions in the body, among them we could mention: excitatory neurotransmitter in the central nervous system, precursor of GABA and other amino acids such as proline and glutamine. As a neurotransmitter GLU acts on four types of receptors: ionotropic (AMPA, NMDA and kainate) and metabotropic (mGluR1-mGluR8) divided into three groups according to their genetic homology. These receptors are present in nearly all central nervous system (CNS) and other organs such as heart, lung and intestine. MSG is used as a flavor enhancer all over the world. The discovery of the basic taste due to glutamate, led to the industrial production of its salt, monosodium glutamate. The basic taste induced by glutamate is called Umami, which translated from Japanese, means good taste, delicious. There are numerous studies on the use of MSG as a food additive (technological function), as well as its physiological functions and its effects in the organism. International organizations and regulatory agencies of many countries have reported and / or evaluated that the use of MSG as a food additive is safe. However, some authors have reported adverse effects associated with exposure to MSG. Thus, this study aimed to assess the presences of the metabotropic receptor mGluR8 in the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH) of Wistar rats, and to evaluate the effects in the mGluR8 receptor resulting from the dietary intake of different concentrations of MSG (0% [control], 1%, 2, 5% and 5%) during 90 days. Also, it was evaluated the body weight gain of the rats fed with the diets containing MSG in the different concentrations. To demonstrate the presence of the mGluR8 receptor immunohistochemistry technique was employed, and in order to elucidate the weight gain, the animals were weighed weekly. All the data, cell counts from the immunohistochemistry technique and from the rats weighing, were evaluated by analysis of variance. The results showed no significant difference ($p < 0.05$) for both: body weight gain and the presence of mGluR8 receptors among the animals that were fed with the diets containing the different MSG levels.

INTRODUÇÃO GERAL

O ato de se alimentar não abrange somente a necessidade fisiológica, mas é um ato social. O alimento, desde os primórdios da humanidade, simboliza conquistas e desavenças. A utilização de substâncias químicas, modo de preparo para realçar o sabor e aparência, assim como a conservação dos alimentos, intensifica as diferenças culturais. A difusão desses atributos caminha junto ao desenvolvimento de novas técnicas de aprimoramento e de utensílios utilizados na cozinha, história das conquistas marítimas, e o desenvolvimento da indústria, confirmam essa afirmação. Esse conjunto de ações permitiu o conhecimento e disseminação, tanto das técnicas e novos ingredientes, quanto ao surgimento de doenças ligadas à alimentação (GEERTZ, 1989; CARNEIRO, 2005).

O sabor único que sentimos ao saborearmos qualquer alimento é conferido pela mistura de compostos que o constituem. Que podem ser: aminoácidos, açúcares, lipídeos, sais minerais, vitaminas e água (CARVALHO, 1998).

Um dos aminoácidos presentes na maioria dos alimentos é o glutamato. Além de ser encontrado nos alimentos, podemos encontrá-lo também em sua forma livre nos tecidos dos animais, bactérias e plantas (GARANTTINI, 2000).

O glutamato livre desempenha papel fundamental como aminoácido não essencial no organismo do ser humano. Dentre suas diferentes funções, a mais conhecida é a de neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), participando de sinapses excitatórias importantes, como as que ocorrem na formação de memória, e seus receptores estão envolvidos nas mudanças plásticas do sistema nervoso central de vertebrados. No SNC atua sobre duas famílias de receptores: ionotrópicos, conhecidos como NMDA, AMPA e Kainato, e os metabotrópicos denominados de mGluR1 a mGluR8, divididos em três grupos de acordo com sua homologia genética (LARZABAL et al., 1999; MENNERICK & ZORUMSKI, 2001). Esses receptores estão distribuídos por praticamente todas as áreas do encéfalo e também em outros órgãos, como pulmão e coração (GILL et al., 1998; GILL et al., 1999).

Desde sua descoberta, em 1908, o glutamato é alvo de estudos que vão desde seu metabolismo, fisiologia como molécula essencial ao ser humano até sua toxicidade. Os

queijos e tomates são os alimentos que mais contem glutamato, porém, também o podemos encontrar em altas concentrações em peixes e carnes. O gosto conferido pelo glutamato aos alimentos é conhecido como Umami. Esse gosto foi descrito pelo professor Kikunae Ikeda, da Universidade Imperial de Tóquio, Japão (IGIS, 2011).

O glutamato monossódico (MSG) é um aditivo alimentar utilizado como realçador de sabor nos alimentos. O MSG é usado, principalmente, em países asiáticos, mas, a culinária ocidental é adepta ao seu consumo (IGIS, 2011).

Diversos alimentos contêm o MSG, como por exemplo, *snacks*, comidas congeladas e *fast foods*. A adição do tempero ao alimento varia de acordo com o resultado que se deseja adquirir, no entanto, uma característica interessante do aditivo é ser auto-limitante, ou seja, uma vez que a quantidade adicionada conferir o sabor desejado, outra quantidade adicional não irá modificar o resultado. O uso do MSG como aditivo alimentar é considerado seguro pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para Alimentos e Agricultura (FAO) através do Comitê Misto de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA), assim como pela *US Food and Drug Administration* (US FDA), entre outros órgãos de regulamentação nacionais e regionais (IGIS, 2011).

Ao longo dos anos, estudos envolvendo o uso do MSG resultaram em diferentes conclusões. Há àqueles que pelos estudos, demonstraram que o seu uso induz efeitos adversos, como obesidade e aumento do apetite (HERMANUSSEN et al., 2005; OLNEY, , 1969; BOGDANOV et al., 1996) e há os que relatam efeitos benéficos como diminuição da pressão arterial e auxílio ao tratamento de pessoas que sofrem de desordens alimentares (KONDOH et al., 2009; YAMAMOTO, 2009).

Visto que a indução de obesidade, aumento do apetite e outras desordens metabólicas associadas à síndrome metabólica terem sido atribuídos a alterações no núcleo arqueado do hipotálamo (NARC) por parte do MSG, o presente estudo teve como objetivo exibir dado morfológico sobre a localização do receptor mGluR8 no NARC de ratos Wistar e avaliar o efeito da ingestão de dietas adicionadas de diferentes concentrações de MSG (0% (controle), 1%, 2,5% e 5%) sobre o mGluR8. Também foi avaliado o ganho de peso

corpóreo entre os grupos de animais alimentados com as dietas adicionadas de diferentes concentrações de MSG.

Referências Bibliográficas

BODGANOV, M.B.; TJURMINA, O.A.; WURTMAN, R.J. Consumption of a high dietary dose of monosodium glutamate fails to affect extracellular glutamate levels in the hypothalamic arcuate nucleus of adult rats. **Brain Research**, 736:76-81,1996.

CARNEIRO, H.S. Comida e sociedade: significados sociais. **Historia: Questões & Debates**, 42:71-80. Editora UFPRN, 2005. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/historia/article/download/4640/3800>>. Acesso em: 19 de agosto de 2010.

CARVALHO, W. **Biologia em Foco**. Editora FTD, vol. 1, 1998.

GARRANTINI, S. Glutamic Acid Twenty Years Later. **Journal of Nutrition**; 130: 901-909, 2000.

GEERTZ, C. **A interpretação das culturas**. Editora LTC, Rio de Janeiro, 1989.

GILL, S.S.; PULIDO, O.M.; MUELLER, R.W.; McGUIRE, P.F. Molecular and immunochemical characterization of the ionotropic glutamate receptors in the rat heart. **Brain Res. Bull.** 46(5): 429-434, 1998.

GILL, S.S.; PULIDO, O.M.; MUELLER, R.W.; McGUIRE, P.F. Immunochemical localization of the metabotropic glutamate receptors in the rat heart. **Brain Res. Bull.** 48(2): 143-146, 1999.

HERMAUSSEM, M.; GARCÍA, A.P.; SUNDER, M.; VOIGT, M.; SALAZAR, V.; TRESGUERRES, J.A.F. Obesity, voracity, and short stature: the impact of glutamate on the regulation of appetite. **European Journal of Clinical Nutrition**: 1-7, 2005.

IGIS. International Glutamate Information Service. **In**: <<http://portuguese.glutamato.org/>> Acesso em 12 de Janeiro de 2011.

- KONDOH, T.; MALLICK, H.N.; TORRI, K. Activation of the gut-brain axis by dietary glutamate and physiologic significance in energy homeostasis. **Am. J. Clin. Nutr.** 90(supp): 832S-837S, 2009.
- LARZABAL, A.; LOSADA, J.; MATEOS, J.M.; BENITEZ, R.; GARMELLA, I.J.; KUNH, R.; GRANDES, P.; SARRIA, R. Distribution of the group II metabotropic glutamate receptors (mGluR2/3) in the enteric nervous system of the rat. **Neuroscience Letters**, 276:91-94, 1999.
- MENNERICK, S.; ZORUMSKI, C. F.. Glutamate as a neurotransmitter. **Encyclopedia of Life Sciences**, 1-7, 2001.
- OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, 164: 719-721, 1969.
- YAMAMOTO, S.; TOMOE, M.; KAWAI, M.; UN EYAMA, H. Can dietary supplementation of monosodium glutamate improve the health of the elderly? **Am. J. Clin. Nutr.** 90(suppl): 844S-849S, 2009.

CAPÍTULO I

Glutamato monossódico: aspectos biológicos e sensoriais.

Glutamato monossódico: aspectos biológicos e sensoriais

Resumo

O ácido glutâmico ou glutamato (GLU) é uma molécula essencial para o organismo do ser humano, além de ser um aminoácido encontrado em abundância. Há cerca de um século atrás, foi descrito o gosto básico produzido pelo glutamato e seu sal glutamato monossódico (MSG), tendo sido denominado de Umami, que em japonês significa “gosto bom, saboroso”. O GLU desempenha inúmeras funções no organismo, umas das principais e mais conhecidas é como neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central de mamíferos. Atua sobre receptores ionotrópicos e metabotrópicos. Esses receptores estão amplamente distribuídos por todo o encéfalo, sendo a eles atribuídas várias funções, tais como: fenômeno de potenciação de longo prazo e depressão de longo prazo, memória e aprendizagem, entre outras. A relação da exposição ao MSG com lesões do hipotálamo e danos neurais tem sido cada vez mais discutida na comunidade científica, visto que existem relatos que evidenciaram a ocorrência de morte neuronal por superestimulação dos seus receptores. O uso do MSG como aditivo alimentar é considerado seguro pela US Food and Drug Administration (USA FDA) e o Comitê de Peritos em Aditivos Alimentares e Contaminantes (JECFA), da Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização das Nações Unidas para Alimentos e Agricultura (FAO), estabeleceu para o MSG uma ingestão diária aceitável (IDA) “não especificada”. Por outro lado, estudos relatam que a utilização do MSG, em pacientes que tenham alguma desordem alimentar como anorexia, bulimia, ou perda de peso, propicia aumento da ingestão de alimentos. A presença do ácido glutâmico nas proteínas vegetais está sendo associado à diminuição da pressão arterial em orientais. Novos estudos são indispensáveis para elucidar cada vez mais o papel do GLU na fisiologia humana, assim como corroborar a inocuidade do uso do MSG como aditivo alimentar. O objetivo deste artigo de revisão é, principalmente, apresentar dados sobre o metabolismo do glutamato no organismo e sobre seus receptores no sistema nervoso central. São também abordados aspectos sobre a inocuidade de uso do MSG como aditivo alimentar e sobre o gosto umami.

Palavras Chaves: *glutamato; MSG; receptores ionotrópicos e metabotrópicos.*

Monosodium glutamate: biological and sensorial aspects

Abstract

Glutamic acid or glutamate (GLU) is an essential molecule for human, besides being an amino acid found in quantity. About a century ago, it was discovered the basic taste produced by glutamate and its salt monosodium glutamate (MSG), and it was called Umami, which in Japanese means "good taste". The GLU performs many functions in the organism; one of the most important is as excitatory neurotransmitter in the central nervous system of mammals. GLU operates under ionotropic and metabotropic receptors. These receptors are widely distributed throughout the brain and there are many functions assigned to them, such as: the phenomenon of long-term potentiation and long-term depression, memory and learning, among others. The relationship between the exposure to MSG with lesions of the hypothalamus and nerve damage has been increasingly debated within the scientific community, since there are evidences that neuronal death occurs by overstimulation of their receptors. The use of MSG as a food additives know to be safe by the US Food and Drug Administration (US FDA) and an acceptable daily intake (ADI) "not specified" was established by the Joint Expert Committee on Food Additives (JECA) of the World Health Organization (WHO) and Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). On the other hand, some studies have reported that the use of MSG in patients with eating disorders likes: anorexia, bulimia or weight loss, it produces increase of food intake. The presence of glutamic acid in plant protein has been associated with decreased blood pressure in Orientals. Further studies are needed to clarify the role of GLU in the human physiology, as well to corroborate as showing the safety of MSG use as a food additive. The purpose of this review article is mainly to provide data on the metabolism of glutamate in the body, as well as on its receptors in the central nervous system. They are also discussed aspects about the safety of MSG as a food additive and on the umami taste.

Keywords: *glutamate; MSG; ionotropic and metabotropic receptors.*

Introdução

As mudanças nas características do sistema nervoso central ao longo da nossa vida são denominadas de plasticidade neural. Essas mudanças estão intimamente ligadas ao desenvolvimento de sinapses, e sofrem influências de fatores externos e internos. As sinapses excitatórias do nosso organismo, em sua maioria, são mediadas por um neurotransmissor denominado de glutamato, o mais abundante do sistema nervoso central de vertebrados. Participa de importantes sinapses que envolvem os mecanismos de formação de memória, e os receptores em que atua estão envolvidos com a plasticidade neural. Essa molécula é um aminoácido não essencial, amplamente distribuído na forma livre ou ligado a proteínas e peptídeos nos alimentos, também é utilizado como aditivo alimentar, conhecido como glutamato monossódico (MSG) com a função de realçador do sabor dos alimentos (MENNERICK & ZORUMSKI, 2001; IGIS, 2011).

O MSG tem sido alvo de vários estudos, que vão desde a sua fisiologia no metabolismo até sua toxicidade. O Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) estabeleceu uma ingestão diária aceitável (IDA) “não especificada” para o MSG. Estima-se que a quantidade do aditivo adicionada nos alimentos varie de 0,1 a 0,8% (IGIS, 2011). Estudos recentes corroboram a avaliação de que a utilização desse aditivo não induz nenhum efeito adverso à saúde e que em determinados casos pode ser benéfico (FERNSTROM, 2009).

O estudo dos receptores para GLU no sistema nervoso central de humanos, roedores e outros animais de experimentação, acontece desde a década de 50, e ao longo dos anos o conhecimento adquirido e o aprimoramento de tecnologias permitiram a caracterização, não por completa, mas de grande valor para a ciência da dinâmica e importante função dessa substância e seus receptores (MATOS, 2007).

O presente artigo de revisão tem por objetivo abordar aspectos sobre o metabolismo do glutamato no organismo humano e sobre o uso do MSG como aditivo alimentar e suas consequências nos seus receptores ionotrópicos e metabotrópicos no sistema nervoso central. São também apresentados aspectos sobre a função sensorial do glutamato.

Metabolismo do Glutamato

O ácido glutâmico ou glutamato (GLU) é um aminoácido não essencial, produzido pelo nosso organismo para diversas funções, como por exemplo: substrato para a síntese de proteínas, precursor de glutamina e intermediários do ciclo dos ácidos cítricos, neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central, precursor de GABA (neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central), substrato para produção de glutatona e inibidor das reações de glutaminase. O seu precursor metabólico é o α -cetoglutarato, um intermediário do ciclo do ácido cítrico (Figura 1) (YONG & AJAMI, 2000; LEHNINGER, 2002).

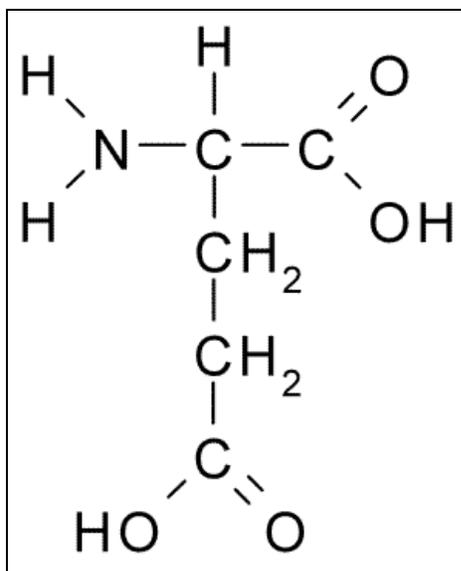


Figura 1. Estrutura linear da molécula de ácido glutâmico. Fonte: Campbell, 2006.

O glutamato está presente na maioria dos alimentos, estima-se que um homem adulto consuma, diariamente, cerca de 28 gramas de GLU proveniente de sua dieta. A concentração de ácido glutâmico em indivíduos maiores de 18 anos se encontra entre 18-98 $\mu\text{mol/L}$ de sangue. O corpo humano produz cerca de 50 gramas de glutamato diariamente. A rápida recaptação e utilização deste aminoácido, não permitem que esses níveis ultrapassem 20mg/L de sangue, de concentração plasmática (GARANTTINI, 2000). Em ratos a concentração plasmática varia de 30- 50 $\mu\text{mol/L}$ de sangue, em outras espécies de

animais, como cães, camundongos e macacos sua concentração varia (GARANTTINI, 1979; SMITH et al., 2000).

O leite materno de primatas e humanos tem altas concentrações de glutamato. A ingestão desse aminoácido por recém-nascidos pode ser de até 36mg/kg de peso corpóreo. Pode ocorrer pequeno aumento de glutamato no plasma após a ingestão de leite, porém, esse GLU é rapidamente metabolizado, principalmente, no fígado (YAMAGUSHI & NINOMYA, 2000).

A massa de glutamato, na forma livre no organismo humano é de aproximadamente 10 gramas, a maior parte do GLU se encontra nos músculos, cerca de 6 gramas (IGIS, 2011).

A participação do glutamato no metabolismo do corpo humano se dá de várias maneiras e por diferentes vias. Originado pelo α -cetogluturato, a reação ocorre no citossol dos hepatócitos, o precursor mais uma molécula de amônia sofrem transaminação, obtendo-se o glutamato. Ainda em menor escala, a síntese de GLU, pode acontecer por ação da enzima L-glutamato desidrogenase, nessa reação existe a necessidade de poder redutor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida (NADPH) (Figuras 2 e 3). A glutamina pode ser outra fonte, em uma reação catalisada pela glutaminase, que converte a glutamina em glutamato e amônia. A alanina e o aspartato sofrem transaminação com o α -cetogluturato, os produtos dessas reações são: glutamato, piruvato e oxalacetato. As reações desses aminoácidos são necessárias para a produção de intermediários do ciclo de Krebs (LEHNINGER, 2002).

O GLU juntamente com a glutamina são fundamentais no metabolismo do nitrogênio. As reações ocorrem no citossol dos hepatócitos, por desaminação oxidativa do L-glutamato ou ainda pela síntese de glutamina, são catalisadas pelas enzimas L-glutamato desidrogenase e glutamina sintetase, respectivamente. Essa via metabólica é de extrema importância, pois é dela que a maioria do nitrogênio será metabolizado tanto para a excreção, ciclo da uréia, quanto para outras vias biossintéticas, como a síntese de ácidos nucléicos (LEHNINGER, 2002; BERG et al., 2008).

A desaminação do glutamato promove a disponibilidade do α -cetogluturato. Quando sofre transaminação libera aspartato e é precursor de aminoácidos como prolina, glutamina e arginina. O glutamato compõe, ainda, a estrutura do anti-oxidante glutatona

(BARRAVIERA & MACHADO, 1989; LEHNINGER, 2002). A descarboxilação do glutamato resulta em uma amina denominada ácido - γ - aminobutírico (GABA), que exerce a função de neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central (BERG et al., 2008)

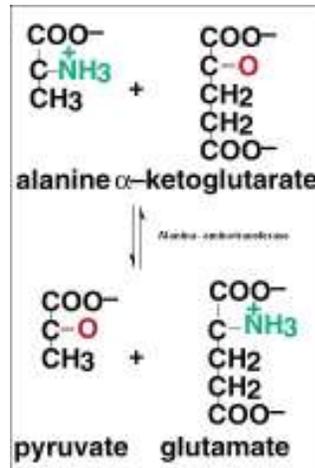


Figura 2. Reação de transaminação do α -cetoglutarato em glutamato. Reação ocorre no citoplasma dos hepatócitos. Adaptado de: Rocha et al., 2005.

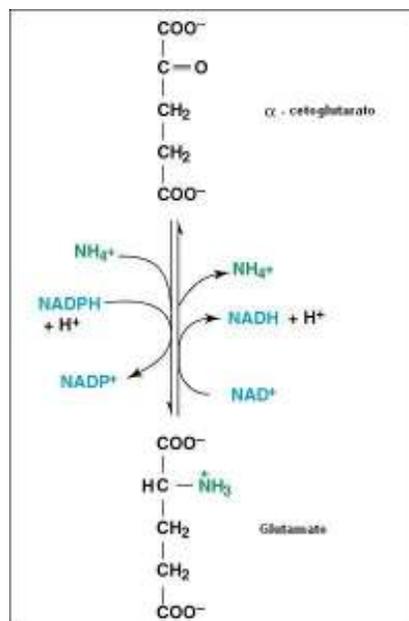


Figura 3. Conversão α -cetoglutarato em glutamato nos hepatócitos. Reação catalisada pela enzima glutamato desidrogenase nos hepatócitos para conversão de α -cetoglutarato em glutamato. Adaptado de: Rocha et al., 2005.

Grande parte do glutamato proveniente da dieta é metabolizado no trato gastrointestinal, principalmente no intestino, órgão responsável pela metabolização do GLU e glutamina. Esse fato foi confirmado no fim da década de 1970 e até hoje é estudado extensivamente, outros autores relatam que uma grande quantidade de glutamato é oxidado na região do baço e na mucosa intestinal (YONG & AJAMI, 2000).

No intestino, o glutamato da dieta, serve como fonte de energia para as células do lúmen intestinal, sendo a abundância do aminoácido nesse órgão indicativo dessa função. A transaminação do glutamato em α -cetogluturato parece ser a principal via de metabolização nos enterócitos e colonócitos. o α -cetogluturato será utilizado no ciclo de Krebs para síntese de ATP, por ser uma das principais fontes de intermediários do ciclo de Krebs nessas células, o glutamato é considerado como importante fonte de energia do metabolismo intestinal. A suplementação da dieta com MSG pode desencadear pequena alteração na concentração de GLU no intestino. Em suínos, cerca de 80 – 85 % do glutamato é metabolizado no intestino, sendo que a hiperglutamatemia ocorre provavelmente devido a falhas no metabolismo intestinal. (BLACHER et al., 2009).

A essencialidade do GLU não se restringe apenas para o homem, vegetais e bactérias o usam como percussor de co-fator para transferência de unidades carbônicas e como regulador do equilíbrio osmótico com o meio externo (LEHNINGER, 2002).

Metabolismo do Glutamato no sistema nervoso central

O glutamato como neurotransmissor é responsável pela maioria das sinapses excitatórias sendo o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central de vertebrados (ZENI et al., 2000).

Todo o glutamato utilizado no SNC como neurotransmissor é sintetizado no próprio sistema, sendo derivado da síntese local de glutamina e de intermediários do ciclo de Krebs, assim como da reciclagem das proteínas no cérebro, a manutenção da produção do neurotransmissor está diretamente ligada com as concentrações de amônia no encéfalo e concentração no líquido extracelular. Sua recaptção e síntese podem ocorrer por neurônios e por células da glia Tanto GLU, como outros neurotransmissores têm seu acesso ao SNC

limitado da circulação externa pela barreira hemato encefálica (BHE) (HERTZ et al., 2000; SUÁREZ et al., 2002).

No SNC o glutamato é armazenado em vesículas, aproximadamente 30-60nm de diâmetro, sendo que sua concentração na vesícula é de aproximadamente 100mmol/L (MELDRUM, 2000). As concentrações no líquido cérebro espinhal e espaço extracelular são consideradas baixas, menores do que 0,4 μ mol/L (SMITH, 2000).

A glicose é utilizada como principal fonte de energia no SNC. Quando a demanda energética é maior do que a disponibilidade de glicose, o glutamato é mobilizado como produtor de energia, através da sua oxidação a oxalacetato (HAWKINS, 2009).

Neurônios glutamatérgicos estão envolvidos em uma serie de processos, tais como: codificação da informação, formação e recuperação de memória, manutenção da consciência (DAIKHIN & YUDKOFF, 2000), aprendizagem e desenvolvimento (MELDRUM, 2000) e com o fenômeno de potenciação (LTP) e depressão de longo prazo (NOLTE, 1998). A presença do glutamato está relacionada a processos isquêmicos e epilepsia, esse fato é observado quando, o excesso de GLU na fenda sináptica causa superestimulação de seus receptores, levando aos danos relatados (CINGOLANI et al., 2004).

Os processos para formação do *pool* de glutamato e glutamina no sistema nervoso central (Figura 4) se iniciam com a liberação do GLU em um evento cálcio – dependente, que envolve a fusão de vesículas pré-sinápticas contendo glutamato com a membrana do neurônio pós-sináptico. A pré-liberação da concentração de glutamato na sinapse é de 2 a 5 μ mols. Não há indícios da existência de enzimas de lise no espaço extracelular que seja capaz de metabolizar o glutamato. O GLU é então transportado para os astrócitos onde é convertido para glutamina, pela enzima glutamina sintetase. (DANBOLT, 2001; MACHADO, 2005).

A glutamina é exportada para os neurônios pré-sinápticos e hidrolisada por ação da enzima glutaminase fosfato dependente, à glutamato e amônia, fechando o ciclo glutamato-glutamina. Nesse caso, parte do glutamato derivado pode ser utilizada para reabastecer o *pool* de transmissão e outra pode ser oxidada nos terminais axônicos por transaminação para 2-oxo-glutarato pela ação da enzima aspartato aminotransferase. O cérebro oxida

glutamato para utilização como potencial combustível, entretanto, não é totalmente conhecido se o poder de oxidação tanto do GLU, quanto da glutamina supre a demanda energética do SNC (DAIKHIN & YUDKOFF, 2000).

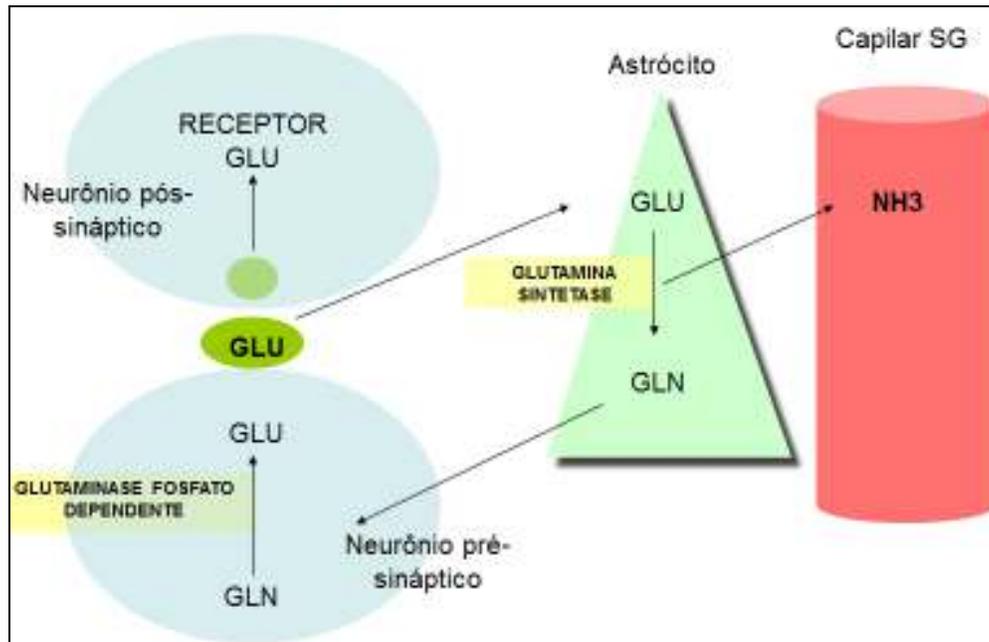


Figura 4. Ciclo Glutamato-glutamina no sistema nervoso central. O GLU é liberado das vesículas que contem glutamato para o neurônio pós-sináptico. O GLU é transportado pelos transportadores para glutamato, para os astrócitos, local que ocorre a conversão à glutamina. A amônia liberada dessa reação será utilizada no ciclo da uréia. A glutamina, produto da reação catalisada nos astrócitos, será transportada para os neurônios pré-sinápticos encerrando o ciclo glutamato-glutamina. GLU: glutamato; GLN: Glutamina; Capilar SG: capilar sanguíneo e NH_3 : amônia.

A recaptação do GLU da fenda para o encerramento de sua ação sináptica é efetuada pelos transportadores de alta afinidade por glutamato, pois, sua degradação na fenda sináptica não é eficiente, como no caso de outros neurotransmissores (TAKAHASHI et al.,

1997). Os transportadores de GLU estão presentes em diferentes regiões do encéfalo e agrupados em duas famílias:

- GLT-1 e GLAST, denominados de transportador de glutamato e transportador de glutamato e aspartato, respectivamente. São encontrados nas células da retina e em astrócitos (ATTWELL, 2000);
- EAAT1, EAAT2, EAAT3, EAAT4, EAAT5 denominados de transportadores de aminoácidos excitatórios e EAAC1 denominado de carreador de aminoácido excitatório. Esses transportadores podem ser encontrados nas células da retina e glia, astrócitos por todo encéfalo e células de Purkinge cerebelares (ATTWELL, 2000).

Além desses transportadores existem vesículas transportadoras de GLU denominadas de VGluT2 que estão presentes em fibras glutamatérgicas relacionadas com a liberação do hormônio liberador do hormônio do crescimento (GNRH) em determinadas áreas do hipotálamo (KISS et al., 2006).

Alguns estudos relataram que a morte neuronal pode ocorrer devido à administração sistêmica de glutamato na forma de aditivo alimentar, geralmente as áreas mais afetadas não são protegidas pela BHE. Nos casos de isquemia existe grande concentração de glutamato no fluído extracelular, que pode desencadear superestimulação dos receptores glutamatérgicos, ocasionando morte celular. Entretanto, sob condições normais, a concentração de glutamato não é afetada por injeção ou outros métodos artificiais de administração de glutamato (HAWKINS, 2009).

Receptores de Glutamato no sistema nervoso central

Os receptores quando ligados ao neurotransmissor podem agir por duas maneiras: abertura de canais permeáveis a íons e por ativação de segundos mensageiros (KANDEL et al., 2000). Os receptores que são permeáveis aos íons são denominados de ionotrópicos, e podem ser do tipo “*ligante voltagem dependente*” permitindo o influxo ou efluxo dos íons apenas com o potencial de ação sem a necessidade de um neurotransmissor, ou “*ligante dependente*”, esses receptores permitem a abertura ou fechamento do canal com a ligação do neurotransmissor. Os que ativam segundos mensageiros são denominados de

metabotrópicos e, geralmente, estão ligados ao sistema de proteína G (Figura 5) (CITOW & MACDONALD, 2004).

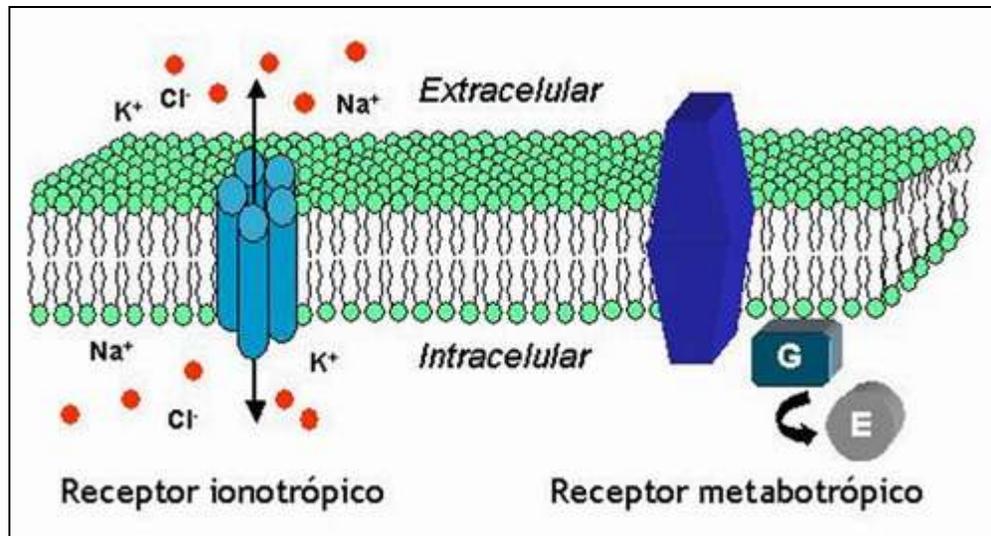


Figura 5. Receptores ionotrópicos e metabotrópicos. A ativação de um receptor ionotrópico permite o influxo e efluxo de íons como sódio, cálcio e cloro. Esses íons serão liberados de acordo com a função e o neurotransmissor que atuará no receptor. Receptores metabotrópicos estão associados ao mecanismo de proteínas Gs. Após a sua ativação ocorre a liberação de segundos mensageiros e também influxo e efluxo de íons, que permitirá maior tempo de abertura ou fechamento do receptor, configurando sua função. **Fonte:** Sommer, 2009.

A mobilização da proteína G ativa canais de membrana ou substâncias intracelulares denominadas de segundos mensageiros. Essa ativação pode acarretar a abertura prolongada de canais iônicos, ativação de genes ou ajustes dos níveis nas concentrações de cálcio intracelular. A ação dos receptores mediados por proteínas G (metabotrópicos) é mais complexa e mais lenta alterando várias funções celulares. A via de ativação de segundos mensageiros tem a seguinte sequência (Figura 6): após a ligação do neurotransmissor ou agonista no receptor, a proteína G é ativada, ocorre a mudança na conformação inicial da proteína, decorrente da substituição da guanosina difosfato por guanosina trifosfato, a cadeia α – uma subunidade da proteína G – se desprende e assume a função de

transportador citoplasmático e ativa uma proteína alvo, quando desativada a cadeia α se une novamente a cadeia $\beta\gamma$ outra subunidade da proteína G. Quando o complexo $\alpha\beta\gamma$ está unido ao receptor, o receptor da membrana não está ativado. A proteína G abre o canal iônico quando é a proteína alvo, atuando sobre proteínas intracelulares que geram um segundo mensageiro passível de difusão, que pode afetar o canal da membrana ou modular a atividade enzimática. Os segundos mensageiros também modulam a concentração de cálcio intracelular, além da abertura de canais iônicos e ativação de genes. Essa concentração de cálcio age como um terceiro mensageiro. Os segundos mensageiros nos neurônios foram identificados como: 1-adenosina monofosfato cíclico (AMPC) que regula o fluxo iônico e a expressão de genes. Como exemplo, a informação da dor no sistema nervoso periférico é transmitida via proteína G (AMPC). 2 - Ácido Araquidônico que é liberado através da enzima fosfolipase A ativado por uma proteína G, essa substância leva a produção de prostaglandinas; 3 - inositol trifosfato (IP_3) liberado através da ação da fosfolipase C, o IP_3 age na liberação de Ca^{++} que será usado em vários processos celulares (LUNDY-EKMAN,2004).

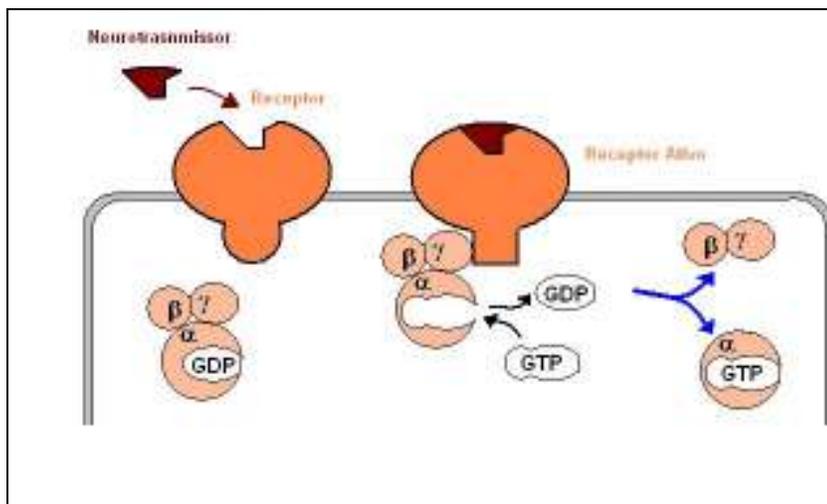


Figura 6. Mecanismos de ação das proteínas Gs. O neurotransmissor se liga ao receptor e a proteína G é ativada com a substituição de guanosina difosfato (GDP) por guanosina trifosfato (GTP). Após a ativação do receptor o complexo $\alpha\beta\gamma$ da proteína G se modifica e altera a configuração do receptor, essa modificação desencadeia as respostas metabólicas. Adaptado de: Silva, 2002.

O glutamato como neurotransmissor atua sobre quatro subtipos de receptores: os ionotrópicos (iGluR): NMDA (*N*-metil-D-aspartato), KA (Ácido Caínico) e AMPA (α -amino-3-hidroxi-5metil-4-isoxazolepropiónico) e os metabotrópicos (mGluR) (NAKANISHI, 1994).

Os receptores de GLU tipo AMPA e KA são muitas vezes chamados de receptores não-NMDA, e participam de um grande número de sinapses excitatórias rápidas. Os receptores NMDAs demonstram papel especializado na memória e no aprendizado (NICHOLS, 1994).

O fenômeno de potenciação de longo prazo (LTP) parece ser devido à ativação de sinapses silenciosas, e isso ocorre por ação dos receptores AMPA e NMDA. A LTP é um dos principais eventos ligados à consolidação de memória. A indução de LTP aumenta a eficiência e o número de receptores AMPAs, e o cálcio liberado para o interior da célula por ação dos receptores NMDAs é fundamental para a formação da memória. (WATIKINS, 2007). O estímulo repetitivo em uma mesma sinapse de forma rápida pode ser de uma maneira resumida, a definição de LTP (MAREN et al., 1995).

A fosforilação dos receptores do tipo AMPA e sua inserção na membrana irão gerar uma nova espinha dendrítica, que consolidam os eventos de memória (LTP) e aprendizado no sistema nervoso central, mudando as características e gerando novas sinapses, além dos eventos causados pelo cálcio intracelular que desenvolvem papel de regulação das alterações genéticas na aprendizagem (OHNO & WATANABE, 1996; LUNDY-EKMAN, 2004).

A LDP – depressão de longo prazo - é um mecanismo utilizado na formação e consolidação de memória, assim como a LTP. Entretanto, nesse fenômeno ocorre diminuição na eficácia dos receptores AMPAs e NMDAs, pela pequena quantidade de glutamato disponível na fenda sináptica. A frequência e tempo dos estímulos são menores e mais duradouros. O retorno ao estado normal de uma sinapse após LTP é um dos mecanismos de ação da LDP (MAREN et al., 1995).

Os receptores NMDA são mais complexos que os do tipo AMPA. Possuem subunidades denominadas NMDAR1a-h com oito variantes e a subunidade NMDAR2 com quatro variantes NMDAR2a-d. A subunidade NMDAR2d possui dois *splincing* alternativos: NMDAR2d1 e NMDAR2d2 (NAKANISHI, 1994; SMITH, 2000; KÖRH,

2006). As subunidades dos receptores NMDAs conferem a este tipo de receptor a propriedade de ser um canal heteromérico ou homérico (MEGURO et al., 1992). A presença da subunidade NMDAR1 determina o tempo constante da abertura do canal e modifica o efeito de antagonistas (MELDRUM, 2000) além de ser responsável pela funcionalidade do receptor (CHEN, 1996).

Os receptores NMDAs são do tipo ligante dependentes, sua voltagem e abertura podem ser reguladas pelo íon Mg^{++} que bloqueia o canal de maneira voltagem-dependente, é permeável ao sódio e potássio e permite o influxo de Ca^{2+} . Além do sítio de ligação para glutamato estima-se que o receptor NMDA possua pelo menos cinco sítios de ligações para diferentes moléculas, como por exemplo, a glicina: a ligação dessa molécula é pré-requisito para a ativação do canal (MONAGHAN et al., 1989).

NMDAs são amplamente distribuídos no sistema nervoso central e coração (GILL et al., 1998). Podem ser encontrados nos neurônios pré e pós-sinápticos astrócitos e oligodendrócitos (KÖRH, 2006; CHEN, 1996). Neurônios de aves de diversas espécies expressam subunidades de NMDAs, em áreas do encéfalo como hipocampo e cerebelo (CORIL et al., 2000).

Os receptores NMDAs são fortemente relacionados com a morte neuronal. O influxo de cálcio promovido pela abertura do canal ocasiona, em muitos casos, a morte celular. Esse evento pode ser observado em lesões isquêmicas do SNC, epilepsia e trauma cerebral e é denominado de excitotoxicidade (CHON, 1988; McDONALD, 1996). Segundo Lucas & Newhouse, 1957 e Olney, 1969, a exposição aos antagonistas ou agonistas de NMDA, glutamato e glutamato monossódico podem desencadear morte celular em diferentes regiões do encéfalo como hipocampo e hipotálamo, e ainda lesões retinianas.

Os receptores do tipo AMPA formam canais iônicos que, quando ligados ao glutamato, permitem o influxo de cátions, como Na^{+} e Ca^{2+} e o efluxo de K^{+} . A estrutura desse receptor é formada por quatro subunidades protéicas e permite várias combinações funcionais dessas quatro variantes, denominadas de GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4, assim a composição de um receptor não-NMDA pode ser homomérica ou heteromérica (WENTHOLD & ROCHE, 1998). Mesmo sendo importantes para as transmissões sinápticas esses receptores quando estimulados excessivamente podem induzir dano ao

sistema nervoso central, e algumas doenças degenerativas crônicas como Huntington e Parkinson estão relacionadas ao excesso de estimulação (BORGES, 1998).

Além de humanos e mamíferos, aves como pombos e galinhas expressam subunidades de receptores AMPA (GLUR1, GLUR2, GLUR3 e GLUR4). Esses receptores podem participar da modulação da resposta ao estímulo visual, no núcleo Edinger-Westphal, que faz parte do sistema nervoso parassimpático, e é o núcleo no tronco cerebral do nervo oculomotor (TOLEDO et al., 2002). A subunidade GluR5 pode ser encontrada em células da retina de peixes, assim como algumas subunidades dos receptores metabotrópicos para glutamato (YAZULLA & STUDHOLME, 2001).

Receptores do tipo Cainato (KA) são do tipo ionotrópicos, possuem cinco subunidades e duas famílias, baseadas na sua sequência homóloga e ligação com agonistas: GLUK5, GLUK6 e GLUK7, além dos GLUK1 e GLUK2. São amplamente distribuídos no SNC, como hipocampo, córtex cerebral, em células da retina e podem exercer função tanto nas sinapses excitatórias e inibitórias quando estão presentes no neurônio pré-sináptico (HUETTNER, 2007). No sistema nervoso de aves, os receptores KA são abundantes e mediam respostas excitatórias de neurônios em determinadas áreas, como por exemplo, o núcleo de Edinger-Westphal (HENLEY, 1994).

Receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) são ligados ao sistema de mensageiros via proteína G, desempenham papel muito variado nas funções do SNC e estão amplamente distribuídos pelas estruturas do encéfalo, e em outros órgãos também, como o coração e intestino (NAKANISHI, 1994; IGLESIAS et al., 2006; SAN GABRIEL, 2007).

A busca pela relação de mGluR-cDNA resultou no isolamento de sete genes e variantes denominados de mGluR1 a mGluR8, essas variantes são divididas em três grupos (CONN & PINN, 1997):

- Grupo I: mGluR1 e mGluR5;
- Grupo II: mGluR2 e mGluR3, além do homólogo DmGluRA encontrado em *Drosophila melanogaster*;
- Grupo III: mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8.

Os receptores mGluRs do Grupo I são acoplados a proteína Gq, os do Grupo II Gi/Go e os do Grupo III Gi/o (MOGHADDAM, 2004).

Esses receptores possuem domínio extracelular N-terminal hidrofílico com aproximadamente 600 aminoácidos e o domínio citoplasmático C-terminal que varia de 32 a 377 aminoácidos de acordo com o subtipo do receptor (Figura 7) (HOLLMANN & HEINEMANN, 1994).

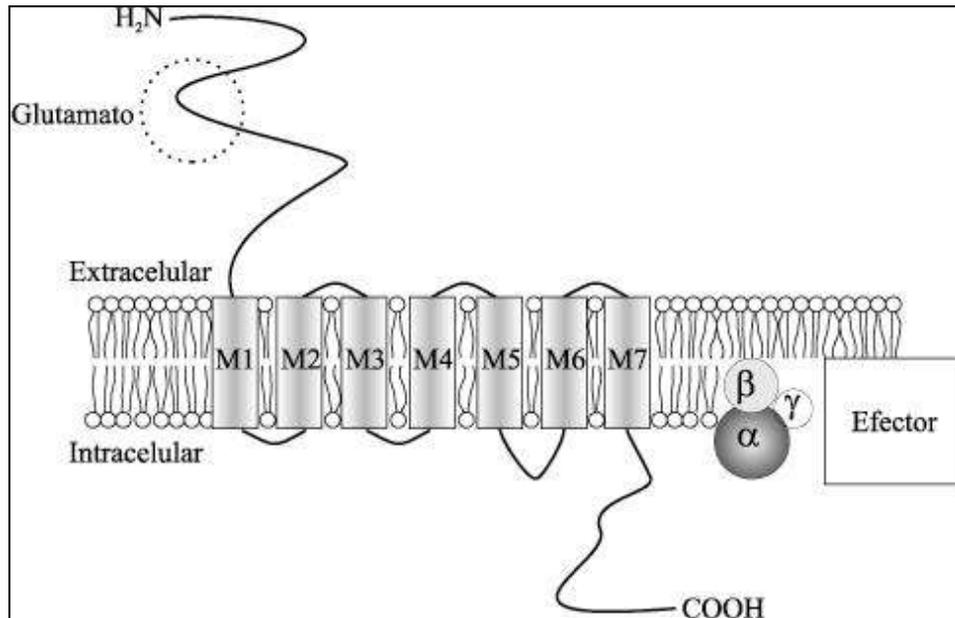


Figura 7. Domínios extracelular e intracelular do receptor metabotrópico para glutamato. H₂N domínio extracelular N-terminal hidrofílico. COOH domínio intracelular C-terminal. M1 – M7 alças transmembrânicas. Fonte: Fouilloux, et al., 2004.

As funções dos mGluR são muitas, dentre elas podemos citar: mediam sinapses lentas e inibitórias, regulam canais de cálcio e potássio, canais para cátions não seletivos, inibição e facilitação da liberação de neurotransmissor nos fenômenos de LTP e LDP (CAMODECA et al., 1999; NAIE et al., 2007), regulação do tráfego dos IGluRs, formação de vários tipos de memórias, modificação do receptor NMDA na transmissão sináptica e regulação do desenvolvimento neuronal (FERRAGUTTI & SHIGEMOTO, 2006).

Os grupos de receptores metabotrópicos atuam de diferentes maneiras pela ativação da proteína G acoplada. Os receptores do grupo I ativam a hidrólise de fosfatidilinositol-bisfosfato (PIP₂) que gera como segundo mensageiro o diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃), esses produtos como segundos mensageiros ativam a proteína quinase (PKC) e liberam estoques de Ca²⁺ intracelular. O grupo II acoplados a proteína Gi, inibem

a adenilato ciclase, canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes e ativam canais de K^+ , como resultado inibem a produção de AMPc. Da mesma maneira do grupo II, os receptores do grupo III produzem praticamente os mesmo efeitos, diminuição de adenilato ciclase, ativação de canais de K^+ e inibição da produção de AMPc (MOGHADDAM, 2004; SWANSON, 2005).

O Grupo I é encontrado em quase todo o encéfalo, principalmente nas células de Purkinge do córtex cerebelar, em alguns núcleos da base e núcleos talâmicos. A subunidade mGluR1 é expressa em células do estomago, participa da estimulação de pepsinogênio C e fator gástrico intrínseco, atuando na digestão de proteínas, principalmente quando houver presença de L-glutamato na dieta (SAN GABRIEL et al., 2007).

Os receptores mGluR2 e mGluR3 que formam o grupo II podem ser encontrados no córtex cerebelar, núcleos olfatórios, tubérculo olfatório, hipocampo e córtex piriforme, nas ultimas três regiões a subunidade mGluR3 é altamente expressa. São encontrados receptores do grupo II no intestino grosso, no jejuno e íleo, nas células que constituem o sistema nervoso entérico e podem contribuir para a fisiologia e processos patológicos do intestino (LARZABAL et al., 1999; MOGHADDAM, 2004; FERRAGUTTI & SHIGEMOTO, 2006).

Quanto às subunidades do grupo III, o mGluR7 se localiza em células da retina onde o mGluR6 também é encontrado, porém em menor quantidade. O mGluR4 está presente nas células granulares do córtex. O receptor mGluR8 é encontrado nos bulbos olfatórios, córtex piriforme, núcleo pontino, hipocampo, córtex cerebral e medula, sendo que sua localização pode ser pré ou pós sináptica (FERRAGUTTI & SHIGEMOTO, 2006; MOGHADDAM, 2004).

A heterogeneidade e sua ampla distribuição promovem a oportunidade de desenvolvimento de agentes farmacológicos que interagem com as variadas funções dos mGluRs no SNC. Estudos revelaram que não há homologia da sequência de genes dos mGluRs com outros receptores ligados a proteína G, sugerindo uma nova família de genes para esses receptores (CONN & PINN, 1997).

Corti et al., 2007 demonstraram o papel de neuroproteção contra morte neuronal, administrando injeções de agonistas dos receptores mGluR2/3 e mGluR3 e mGluR2 em culturas celulares. A presença de agonistas para mGluR2 demonstrou proteção contra a

morte neuronal induzida por NMDA nas culturas celulares. Esse fato também foi observado *in vivo*, mas não para o mGluR3. Concluiu-se que essa proteção ocorra quando astrócitos contendo o receptor mGluR3 são ativados e, de forma inexplicável, que a ativação do mGluR2 pode ser prejudicial aos neurônios expostos a injúria.

Os mGluRs são encontrados em *stem cells*, as subunidades que foram expressas nas células de origem embrionária são: mGluR3, mGluR4 e mGluR5. A presença dessas subunidades está associada à diferenciação e regulação da proliferação. A subunidade mGluR5 isolada de blastocistos, indica sua presença na diferenciação de células de todo o corpo e ainda na proliferação de células germinativas. A ativação do receptor mGluR4 indica partição na diferenciação das linhagens celulares mesodérmicas e endodérmicas, e mGluR3 e mGluR5 são encontradas principalmente em células tronco neurais. Essas subunidades nas células neurais estimulam a diferenciação das mesmas em astrócitos, oligodendrócitos e neurônios (MELCHIORRI et al., 2007).

O papel fisiológicos dos mGluRs (mGluR1 α , mGluR2/3 e mGluR5) no tecido cardíaco não é totalmente esclarecido (GILL et al., 1999). O glutamato presente no tecido cardíaco pode regular o metabolismo energético diminuindo a demanda de energia em casos de lesão isquêmica e assim evitar danos ao miocárdio. Nas condições de hipóxia ou isquemia durante cirurgia cardíaca em ratos, a presença de uma solução de glutamato no tecido diminuiu danos causados por lesões isquêmicas e hipóxicas desenvolvendo cardioproteção durante esses eventos (US et al., 2001). Em um estudo com ratas prenhas que ingeriram cafeína durante o período gestacional, Iglesias et al., 2006, demonstraram que pode ocorrer uma diminuição dos receptores metabotrópicos presentes no tecido cardíaco, e diminuição dos níveis de proteínas Gq e PLC β 1 foi observada nos ratos recém-nascidos e também nas mães. Os resultados desse estudo sugerem que exista uma relação entre os receptores de adenosina A1 e metabotrópicos para glutamato no coração e também sistema nervoso central.

Desordens no Sistema Nervoso Central e Glutamato

A possibilidade de relação entre doenças do SNC e os receptores de glutamato tem sido amplamente estudada. As lesões são geralmente associadas à estimulação de

receptores, quantidade de cálcio no líquido extracelular, dentre outros fatores que levam ao quadro de excitocidade neuronal (OZAWA et al., 1998).

A esclerose múltipla, por exemplo, é uma doença caracterizada pela perda progressiva de neurônios motores de algumas regiões do encéfalo, levando o indivíduo a óbito em pouco tempo, cerca de 5 anos (CLEVELAND & ROTHSTEIN, 2001). A diminuição da eficácia dos transportadores de glutamato e aumento de glutamato no fluido extracelular são observados em casos de esclerose múltipla amiotrófica (ROTHSTEIN, 1990).

Em um estudo imunohistoquímico utilizando tecido cerebral humano, Geurts et al., 2003, elucidaram a presença das subunidades mGluR1 α , mGluR2/3 e mGluR5 nos casos de esclerose múltipla. mGluR1 α foi expresso nos tecidos em que houve dismielinização característica da doença, nos casos crônicos e agudos. As demais subunidades estiveram presentes em ambos os casos. Os resultados do estudo relacionaram a participação dos receptores nos processos de dismielinização e proliferação celular da glia na doença.

A perda da memória característica da doença de Alzheimer ocorre pela atrofia e consequente perda neuronal, principalmente na região do hipocampo e córtex cerebral. O sistema glutamatérgico se apresenta de maneira anormal nos casos da doença. Observa-se diminuição da expressão dos transportadores de glutamato e recaptção de glutamato extracelular, presença de bulbos glutamatérgicos nos terminais axônicos atrofiados (BUTTINI et al., 2005). A excitocidade causada pelo excesso do influxo de Ca²⁺ para o interior das células, por ação dos receptores NMDA, pode ser minimizada com a utilização de medicamentos a base de antagonistas de NMDA nos casos de Alzheimer, uma série de drogas estão sendo desenvolvidas e estudadas para evitar esse efeito, como por exemplo, a memantina, já disponível para utilização (DANYSZ et al., 2000).

A doença de Huntington ou Coréia de Huntington é uma doença degenerativa do SNC de causa hereditária, com prevalência em média de 3 a 7 casos por 100.000 habitantes. As áreas mais afetadas são: gânglios da base, hipotálamo, hipocampo e algumas camadas do córtex cerebral, cuja degeneração leva a perda dos movimentos, cognição e equilíbrio emocional. O gene causador da Coréia de Huntington se localiza no cromossomo 4 e produz repetidas sequências do códon CAG para glutamina. Em um indivíduo normal a presença desse códon é 30 vezes na fita de DNA, porém, em um indivíduo portador da

doença é de 36 vezes ou mais (CARDOSO, 2006; SMITH et al., 2005). O sistema glutamatérgico pode ser afetado pela poliglutamina agregada (PolyQ), afetando as concentrações de glutamato e eficácia dos transportadores de glutamato, como também ativação excessiva dos receptores NMDA, que pode desencadear morte neuronal (SUN et al., 2005).

A utilização da técnica de hibridização *in situ* permitiu visualizar a expressão de RNA mensageiro para transportadores de GLU em algumas regiões afetadas pela doença de Huntington. No tecido afetado a expressão foi menor para transportador EAAT2 (ARZBERGER et al., 1997). A perda neuronal por excitotoxicidade causada pelo GLU pode agravar os sintomas da doença de Huntington (SHELDON & ROBINSON, 2007).

A doença de Parkinson é caracterizada pela degeneração de células nervosas da substância negra, interferindo no metabolismo de dopamina no SNC. Essa interferência provoca os sintomas de Parkinson como tremores, lentidão dos movimentos, alterações na fala e escrita, rigidez muscular e desequilíbrio (DUVOISIN, 1986).

Neurônios glutamatérgicos possuem projeções para a substância negra e, em animais de experimentação e pacientes portadores de Parkinson, a perda dos neurônios dopaminérgicos permite que os neurônios glutamatérgicos atuem livremente nessa região, podendo causar excitotoxicidade por superestimulação de seus receptores. Terapias modernas preveem a utilização do GABA para diminuir os efeitos da superexcitação dos receptores e assim amenizar os transtornos causados pela perda neuronal e também drogas que possam atuar no bloqueio dos receptores NMDA de glutamato (LOZANO & KALIA, 2005).

Além de desordens do SNC, o MSG foi associado com doenças do trato respiratório como, por exemplo, a asma. Em alguns casos foi relatado que a exposição ao aditivo pode aumentar os sintomas. Com doses de 1 ou 5mg de MSG em cápsulas não foram relatados nenhum sintoma de início imediato (WOODS et al., 1998). Stevenson em 2000, conclui que não há evidências de que o MSG possa desencadear sintomas em asmáticos.

Glutamato monossódico: Umami e aspectos de inocuidade

Em meados do século XX, o Professor Kikunae Ikeda da Universidade Imperial de Tóquio, percebeu um gosto distinto dentre os já conhecidos (amargo, doce, salgado e

azedo). Verificou que esse gosto estava presente em alimentos como tomate, *dashi* (caldo preparado com base na alga Kombu e peixe bonito), aspargos, queijos e carnes. Seus experimentos foram iniciados em 1907, e em 1908 isolou cristais de glutamato. A partir daí, começou a produzir um tempero com o produto recém descoberto, pois constatou que era o glutamato que oferecia aquele gosto. Esse gosto foi denominado de UMAMI, que traduzindo literalmente do japonês para o português significa “gosto bom” e hoje é reconhecido com o quinto gosto básico (IGIS, 2011).

O umami, desde sua descoberta há um século, tem sido extensivamente estudado durante todo esse tempo as bases moleculares que permitem a sensação desse gosto têm sido estudadas. Primariamente o Umami é desencadeado quando existe a presença de glutamato, mas hoje além do uso de MSG, sabe-se que os nucleotídeos 5'-inosinato e 5'-guanilato também podem desencadear o gosto umami em humanos e animais de experimentação, assim como também interagir com o MSG potencializando seu efeito (BEAUCHAMP, 2009).

Com o passar dos anos a presença de receptores que podem traduzir o gosto Umami tem sido elucidado. O primeiro receptor a ser candidato a tradução do sinal de Umami foi a variante do receptor mGluR4 encontrado nas papilas gustativas. Atualmente existem 2 famílias de receptores para a tradução do sinal no encéfalo e na língua, dentre eles dois membros dos receptores metabotrópicos para GLU: mGluR1 e mGluR4, e recentemente a descoberta dos receptores T1R1 e T1R3, que pertencem a família T1R (YASUO et al., 2008; LI, 2009; CHAUDARI et al., 2009). Entretanto, atualmente ainda existem dúvidas sobre os mecanismos pelo quais os receptores para umami agem. Especula-se que as diferentes famílias podem interagir entre si ou, ainda, que possam existir receptores diferentes ainda não conhecidos, e que variantes *splicing* dos receptores metabotrópicos possam atuar para a sinalização de Umami (CHAUDARI et al., 2009; SAN GABRIEL et al., 2009).

Por ser um aditivo alimentar, testes químicos, bioquímicos e de toxicidade têm sido realizados para avaliar a inocuidade do uso do MSG. O Comitê FAO/OMS JECFA, estabeleceu para o MSG uma ingestão diária aceitável (IDA) “não especificada” (JECFA, 1988), o que significa que, em base aos dados disponíveis, a ingestão diária total da substância, que se deriva de seu uso para alcançar os efeitos desejados e de sua

concentração natural nos alimentos, não representa um perigo para a saúde. Por esta razão, não se considera necessário o estabelecimento de uma IDA expressa em forma numérica. O US FDA considera o MSG como um ingrediente da mesma maneira que o açúcar ou sal, considerando o seu consumo seguro (IGIS, 2011). A ANVISA adota a IDA “não especificada” estabelecida pelo JECFA e regulamenta o uso do MSG como produto BPF (*quantum satis*), que significa que o limite máximo de seu uso é baseado na quantidade suficiente para se alcançar o efeito necessário. Essa regulamentação é estabelecida apenas para aditivos alimentares considerados de uso seguro (ANVISA, 2010).

Considerações Finais

O glutamato é, sem dúvida nenhuma, indispensável para o nosso organismo. Está presente em mamíferos, aves, plantas e bactérias, evidenciando assim sua grande utilidade na natureza.

Como neurotransmissor, desempenha um importante papel na maioria das sinapses excitatórias do sistema nervoso central, sendo sua participação fundamental em praticamente todos os eventos neurológicos e, como toda substância, seu excesso, em alguns casos, pode ser prejudicial.

O aditivo alimentar glutamato monossódico é amplamente utilizado em todo o mundo, principalmente pelos orientais. Efeitos adversos relacionados à sua exposição, ou a sua administração em animais de experimentação, não são verificados quando seu consumo acontece nos níveis recomendados a seu uso como aditivo alimentar. Os dados atualmente disponíveis sobre a avaliação toxicológica do MSG por parte de organismos internacionais (ex. o Comitê FAO/OMS JECFA) ou agências de regulamentação nacionais (ex. US FDA) indicam que seu consumo na função de aditivo alimentar é seguro à saúde humana.

Referências Bibliográficas

- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Registros**. Disponível em: <
<http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=69&data=09/08/1999>>. Acesso em 24 de fevereiro de 2010.
- ATTWELL, D.. Brain uptake of glutamate: Food for Thought. **J. Nutrition** 130:1023-1025, 2000.
- ARZBERGER, T.; KRAMPFE, K.; LEIMGRUBER, S.; WENDL, A.. Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease – An in situ hybridization study. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 56(4): 440-454, 1997.
- BARRAVIERA, B.; MACHADO, P.E.A.. Glutathione redutase e grupos SH reativos intra-eritrocitários: revisão. **Arq. Bras. Med.** 63(2): 131-136, 1989.
- BEAUCHAMP, G.K.. Sensory and receptor responses to umami: an overview of pioneering work. **Am.J.Clin. Nutr.** 90(suppl):723S-727S, 2009.
- BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L.. **Bioquímica**. 6ª ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2008.
- BLACHER, F.; BOUTRY, C.; BOS, C.; TOMÉ, D.. Metabolism and functions of L-glutamate in the epithelial cells of the small and large intestines. **Am.J.Clin. Nutr.** 90(suppl): 814S-821S, 2009.
- BORGES, K.; DENGLIDINE, R.. AMPA receptors: Molecular and Functional Diversity. *In: The Glutamate Synapse as a therapeutic target : Molecular Organization and pathology of the glutamate synapse. Progress in Brain Research*, 116: 153-170. Elsevier, Amsterdã, 1998.
- BUTTINI, M.; MASLIAH, E.; BARBOUR, R.; GRAJEDA, H.; MOTTER, R.; JOHNSON-WOOD, K.; KHAN, K.; SEUBERT, P.; FREEDMAN, S.; SCHENK, D.; GAMES, D. β -amyloid immunotherapy prevents synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. **J. Neurosci.**, 5:25(40): 9096-90101, 2005.
- CAMPBELL, M.K.. *Bioquímica*. Ed. Artmed, 3ª edição, 2006.

- CARDOSO, F. Seminar on choreas. **Lancet. Neurol.** 5: 589-602, 2006.
- CAMODECA, N.; BREAKWELL, N.A.; ROWAN, M.J.; ANWYL, R.. Induction of LTD by activation of group I mGluR in the dentate gyrus in vitro. **Neuropharmacology**, 38:1597-1606, 1999.
- CHAUDARI, N.; PEREIRA, E.; ROPER, S.D.. Taste receptors for umami: the case for multiple receptors. **Am. J. Clin. Nutr.** 90(supp):738S-742S, 2009.
- CHEN, Q.; REINER, A.. Cellular distribution of the NMDA receptor NR2A/2B subunits in the rat striatum. **Brain Research**, 743:346-352, 1996.
- CHON, D.W.. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron**. 1, 623-634, 1988.
- CINGOLANI, H.E.; HOUSSAY, A. B.. **Fisiologia Humana de Houssay**. 7ª edição. Editora Artmed, Porto Alegre, 2004.
- CITOW, J.S.; MACDONALD, R.L.. **Neuroanatomia e Neurofisiologia: Uma revisão**. Ed. Santos, 2004.
- CLEVELAND DW, ROTHSTEIN JD. From charcot to lou gehrig: Deciphering selective motor neuron death in ALS. **Nature Reviews Neuroscience** 2:806–819, 2001.
- CONN, P. J. & PIN, JEAN-PHILLIPE. Pharmacology and Functions of metabotropic glutamate receptors. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 37:205-37, 1997.
- CORIL, C.; FOIDART, A.; MINET, A.; BALTHAZART, J.. Immunocytochemical localization of ionotropic glutamate receptors subunits in the adult quail forebrain. **The Journal of Comparative Neurology**, 428:577-608, 2000.
- CORTI, C.; BATAGLIA, G.; MOLINARO, G.; RIOZZI, B.; PITTALUGA, A.; CORSI, M.; MUGNAINI, M.; NICOLETTI, F.; BRUNO, V.. The use of knock-out mice unravels distinct roles for mGlu2 mGlu3 metabotropic glutamate receptors in mechanism of neurodegeneration/neuroprotection. **The Journal of Neuroscience**, 27(31):8308-8297, August 1, 2007.
- DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progr. Neurobiol.** 65:1-105, 2001.

- DAIKHIN, Y.; YUDKOFF, M. Compartmentation of Brain Glutamate Metabolism in Neurons and glia. **Journal of Nutrition**; 130: 1026-1031,2000.
- DANYSZ W, PARSONS CG, MÖBIUS H.J.. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer`s disease a unified hypothesis on the mechanism of action. **Neurotoxicity Res**, 2: 85-98, 2000.
- DUVOISIN RC. Etiology of Parkinson's disease: current concepts. **Clin Neuropharmacol**, 9 Suppl 1:S3-21. 1986
- FERRAGUTTI, F.; SHIGEMOTTO,R. Metabotropic glutamate receptors. **Cell Tissue Res**, 326:483–504.2006.
- FERNSTROM, J.D.. Introduction to the symposium. **Am. J. Clinical Nutrition**, 90(3)(suppl), 705-706S, 2009.
- FOUILLIOX, C.; CONTRERAS, F.; RIVERA, M.; TERAN, A.; VELASCO, M.. Receptores de glutamato – Implicaciones terapéuticas. **Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica** 23(2):99-108,2004.
- GARANTTINI S. Evaluation of the neurotoxic effects of glutamic acid. **Nutrition and the Brain** 4:79-124,1979.
- GARANTTINI, S. Glutamic Acid Twenty Years Later . **Journal of Nutrtrtion**; 130: 901-909,2000
- GEURTS, J.J.G.; WOLSWYK, G.; BÖ, L.; VAN DER VALK, P.; POLMAN, C. H.; TROOST, D.; ARONICA, E..Altered expression patterns of group I and II metabotropic glutamate receptors in multiple sclerosis. **Brain**, 126:1755-1766,2003.
- GILL, S.S.;PULIDO, O.M.; MUELLER, R.W.; MCGUIRE, P.F.. Molecular and immunochemical characterization of the ionotropic glutamate receptors in the rat heart. **Brain Res. Bull.** 46(5): 429-434, 1998.
- GILL, S.S.;PULIDO, O.M.; MUELLER, R.W.; MCGUIRE, P.F.. Immunochemical localization of the metabotropic glutamate receptors in the rat heart. **Brain Res. Bull.** 48(2): 143-146, 1999.

- HAWKINS, R.A.. The blood-brain barrier and glutamate. **Am. J. Clin. Nutr.** 90(supp):867S–874S, 2009.
- HENLEY, J.M.. Kainate-binding proteins: phylogeny, structures and possible functions. **Trends Pharmacol. Sci.** 15:182-190,1994.
- HERTZ, L.; YU,A.C.H.; KALA, G.; SCHOUSBOE,A.. Neuronal astrocytic and cytosolic mitochondrial metabolite trafficking during brain activation, hyperammonemia and energy deprivation. **Neurochemistry International**, 37:83-101, 2000
- HOLLMANN,M.; HEINEMANN, S.. Cloned glutamate receptors. **Annu. Rev. Neurosci.**, 17:31-108,1994.
- HUETTNER, J.E.. Kainate receptors and synaptic transmission. **Progress in Neurobiology**, 70:387-407,2007.
- IGLESIAS, I.; LÉON, D.; RUIZ, M.A.; ALBASANZ, J.L.; MARTÍN,M.. Chronic intake of caffeine during gestation down regulates metabotropic glutamate receptors in maternal fetal rat heart. **Amino Acids**, 30:257-266, 2006.
- IGIS. International Glutamate Information Service – Glutamate and Taste. **In:** <<http://www.glutamate.org>>. Acesso em: 12 de janeiro de 2011.
- JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. L-glutamic acid and its ammonium, calcium, monosodium and potassium salts. In *Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants*. New York, Cambridge University Press, 1988: p.97-161.
- KANDEL, E.R.; SCHWARTZ,J.H.; JESSEL, T.M.. **Principles of Neural Science**. 4^a ed., São Paulo, Ed. Manole, 2003.
- KISS, J. CSABA, Z. CSÁKI, A. HALÁSZ, B.. Glutamatergic innervation of growth hormone-releasing hormone-containing neurons in the hypothalamic arcuate nucleus and somatostatin-containing neurons in the anterior periventricular nucleus of the rat. **Brain Research Bull.** 70:278-288, 2006.
- KÖHR, G. NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. **Cell Tissues Res.** 326:439-446, 2006.

- LARZABAL, A.; LOSADA, J.; MATEOS, J. M.; BENITEZ, R.; GARMELLA, I.J.; KUNH, R.; GRANDES,P.; SARRIA,R.. Distribution of the group II metabotropic glutamate receptors (mGluR2/3) in the enteric nervous system of the rat. **Neuroscience Letters**, 276:91-94, 1999.
- LEHNINGER, A. L.. **Princípios de bioquímica**. 3edição. Sarvier, São Paulo, 2002.
- LI, X.. T1R receptors mediate mammalian sweet and umami taste. **Am. J. Clin. Nutr.** 90(supp):733S-737S, 2009.
- LOZANO, A.M.;KALIA, S.K.. **Novos movimentos em Parkinson**. Scientific American Brasil, 40° Ed., 2005. Disponível em: <http://www2.uol.com.br/sciam/reportagens/novos_movimentos_em_parkinson_imprimir.html>. Acesso em : 25 fevereiro de 2010.
- LUCAS, R.D. & NEWHOUSE J.P. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. **AMA Arch. Ophthalmol.**, 58:193-201, 1957.
- LUNDY-EKMAN, L.. **Neurociência Fundamentos para a reabilitação**. 2ª edição. Eslevier, Rio de Janeiro. 2004.
- MACHADO, M. Exercício, amônia e sistema nervoso central. Envolvimento dos receptores NMDA. **Revista Digital Efdeportes** .89:10, 2005. Disponível em: <<http://www.efdeportes.com/efd89/amonia.htm>> . Acesso em: 23 de fevereiro de 2009.
- MATOS, R.J.B.. **Expressão de receptores metabotrópicos de glutamato no sistema visual de ratos e pintos após enucleação ocular**. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.
- MAREN, S.; BAUDRY, M.. Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian. **Neurobiol. Learn. Mem.** 63(1): 1-18, 1995.
- MENNERICK, S.; ZORUMSKI, C. F.. Glutamate as a neurotransmitter. **Encyclopedia of Life Sciences**, 1-7, 2001.
- MCDONALD, A.J.. Glutamate and Aspartate Immunoreactive neurons of the rat basolateral amygdala: Colocalization of excitatory amino acids and projections to the limbic circuit. **J. Comp. Neurol.** 365:367-379, 1996.

- MEGURO, H; MORI, H.; ARAKI, K; KUSHIYA, E. KUTSUAWADA,; YAMAZAKI, M.; KUMANISHI, T.; ARAKAWA, M.; SAKIMURA, K. MISHINA, M.. Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. **Nature**, 357:70-74, May,1992.
- MELDRUM, B.S.. Glutamate as a neurotransmitter in the brain : Review of Physiology and Pathology. **J. Nutrition**. 130:1007S-1015S,2000.
- MELCHIORRI, D.; CAPPUCIO, I.; CICERONI C.; SPENSANTT, D.; MOSILLO, P.; SARICHELOU, I.; SALE, P.; NICOLETTI, F..Metabotropic glutamate receptors in stem cell/progenitors cells. **Neuropharmacology**, 57:473-480,2007.
- MOGHADDAM, B.. Targeting metabotropic glutamate receptors for treatment of the cognitive symptoms of schizophrenia. **Psychopharmacology**, 174:39-44, 2004.
- MONAGHAN, D.T.;BRIDGES, R.J.; COTMAN, C.W.. The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology and distinct properties in the central nervous system. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 29: 365-402,1989.
- NAIE, K.; TSANOV, M.; MANAHAN-VAUGHAN, D.. Group I metabotropic glutamate receptors enable two distinct forms of long-term depression in the rat dentate gyrus *in vivo*. **European Journal of Neuroscience**, 25:3264-3275,2007.
- NAKANISHI, S.. Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. **Neuron** 13:1031-1037, 1994.
- NICHOLLS, D. G.. **Proteins, Transmitters and Synapses**. Blackwelle, Oxford. 1994.
- NOLTE, J.. **The Human Brain: an introduction to its functional anatomy** . Ed. Mosby, 4 edição. St. Louis, Missouri,1998.
- OHNO, M.; WATANABE, S.. Concurrent blockade of hippocampal metabotropic glutamate and N-methyl-D-Aspartate receptors disrupts working memory in the rat. **Neuroscience**, (70)2:303-311,1996.
- OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate.. **Science**. 164:719-721, 1969.

- OZAWA, S.; HARUYUKI, K.; TSUZUKI, K.. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**, 54:581-618, 1998.
- ROCHA, C.R.C.; GUEDES, L.S.; OLIVEIRA, M.B.M.; MAGALHÃES, L.S.S.. Portal Bioquímica 04. **Universidade Federal de Pernambuco**, 2005. Disponível em: <http://www.ufpe.br/dbioq/portalbq04/metabolismo_de_aminoacidos.htm>. Acesso em: 25 de março de 2010.
- ROTHSTEIN, J.D.; TSAI, G.; KUNEL, R.W.; CLAWSON, L.; CORNBLATH, D.R.; DRACHMAN, D.B.; PESTRONK, A.; STAUCH, B.L.; COYLE, J.T.. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. **Ann. Neurol.** . 28:18–25, 1990.
- SAN GABRIEL, A.; MAEKAWA, T.; HISAYUKI, U.; TORII, K.. Metabotropic glutamate receptor type 1 in taste tissue. **Am. J. Clin. Nutr.** 90(supp):743S-746S, 2009.
- SAN GABRIEL, A.M.; MAEKAWA, T.; UNEYAMA, H.; YOSIE, S.; TORII, K.. mGluR1 in the fundic glands of rat stomach. **FEBS Letters**, 581:1119-1123, 2007.
- SHELDON, A.L.; ROBINSON, M. B.. The role of glutamate transporters in neurodegenerative and potential opportunities for intervention. **Neurochemistry International**, 51: 333-355, 2007.
- SILVA, P.. **Introdução a endocrinologia**. Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2002. Disponível em: <<http://www2.ufp.pt/~pedros/qfisis/hormonas1.htm>>. Acesso em: 24 de maio de 2010.
- SMITH, Q.R.. Transport and other amino acids at the Blood-Brain Barrier. **J.Nutr.**,130:1016S-1022S,2000.
- SMITH, R. B.; LI, J.Y.. Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 62(17): 1901-1912, 2005.
- SUN, X.J.; WEI, X.Y.; HU, M.; WANG, L.; WANG, H. H.; ZHANG, Q.H.; CHON, S.J.; HUANG, Q.H.; CHEN, Z.; Identification and characterization of a novel human histone H3 lysine 36-specific methyltransferase. **J.Biol.Chem.**, 280(42): 35261-35271, 2005.

- SOMMER, C.. **Bioquímica**. 2009. Disponível em: <
<http://blogs.abril.com.br/bioquimica/2009/12/receptores-ionotropicos-metabolotropicos.html>> Acesso em: 24 de maio de 2010.
- STEVENSON, D.D.. Monosodium glutamate an asthma. **J. Nutr.** 130:1067S-1073S, 2000.
- SUÁREZ, I.; BODEGA, G.; FERNÁNDEZ. B.. Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. **Neurochemistry International**, 41:123-142, 2002.
- SWANSON, C. J.; BURES, M.; JOHNSON, M.P.; LINDEN, ANNI-MAIJA.; MONN, J.A.; DARRYLE, D.. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. **Natures Reviews**, 4:131-144, 2005.
- TAKAHASHI M.; BILLUPS B.; ROSSI D.; SARANTIS M.; HAMANN M.; ATTWELL D. The Role of Glutamate Transporters in Glutamate Homeostasis in the Brain. **J. Exper. Biol.** 200: 401-409, 1997.
- TOLEDO, C.A.B.; BRITO. L.R.G.; PIRES, R.S.; VEENMAN C.L.; REINER, A.. Interspecific differences in the expression of the AMPA-type glutamate receptors and parvalbumin in the nucleus of Edinger-Westphal of chicks and pigeons. **Brain Research**, 947:122-130, 2002.
- US, M. H.; OZKAN, S.; OQUS, T.; ACAR, H.V.; EGE, T.; CAKIR, O.; GÖKBEN, M.; OZTÜRK, O.Y.. Efficacy of topically applied glutamate-aspartate and pentoxifylline solutions in decreasing myocardial damage during open-heart surgery in rats. **J. Int. Med. Res.**, 29(6): 497-502, 2001.
- WATKINS, J.. **Plasticidade**. Disponível em: <<http://www.cf.ac.uk/plasticity/index.html>> . Acesso em: 12 de fevereiro de 2007
- WENTHOLD, R. & ROCHE, R.. The organization and regulation of NON-NMDA receptors in neurons. *In* : The Glutamate Synapse as a therapeutical target: molecular organization and pathology of the glutamate synapse. **Progress in Brain Research**, 116:133-152, 1998.
- WODDS, R.K.; WEINER, J.M.; THEIN, F.; ABRAMSON, M.; WALTERS, E.H.. The effects of monosodium glutamate in adults with asthma who perceive themselves to be monosodium glutamate-intolerant. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 101:762-771, 1998.

- YAMAGUSHI, S.; NINOMYA, K.. Umami and food palatability. **Journal of Nutrition**, 130:921S-929S, 2000.
- YASUO, T.; KSUHARA, Y.; YASUMATSU, K.; NINOMYA, Y.. Multiple receptor systems for glutamate detection in the taste organ. **Biol. Pharm. Bull.** 31(10): 1833-1837, 2008.
- YAZULLA, S; STUDHOLME, K.. Neurochemical anatomy of the zebrafish retina as determined by immunocytochemistry. **Journal of Neurocytology**, 30:551-592, 2001.
- YONG, V.R.; AJAMI, A.M.. Glutamate: An amino acid of particular distinction. **Journal of Nutrition**; 130:892-900, 2000.
- ZENI, L.A.Z.R.; SEIDLER, H.B.K.; DE CARVALHO, N.A.S. FREITAS, C.G.; MARINO-NETO.J.; PADCHOALINI M.A.. Glutamatergic control of food intake in pigeons: effects of central injections of glutamate, NMDA, and AMPA receptor agonists and antagonists. **Pharmacology Biochem. And Behavior**, 65(1) :67-74,2000.

CAPÍTULO II

Imunodeteccção do receptor mGluR8 no núcleo arqueado do hipotálamo de ratos Wistar e estudo dos efeitos, no receptor, resultantes da exposição oral sub-crônica ao glutamato monossódico.

Imunodeteccão do receptor mGluR8 no núcleo arqueado do hipotálamo de ratos Wistar e estudo dos efeitos, no receptor, resultantes da exposição oral sub-crônica ao glutamato monossódico.

Resumo

O hipotálamo desempenha papel fundamental no controle neuroendócrino da homeostasia. O núcleo Arqueado do hipotálamo (NARC) está situado no assoalho do III ventrículo, possui neurônios do tipo parvicelulares e participa da conexão do hipotálamo com a hipófise. Os neurônios do NARC são responsáveis pela produção de diversos hormônios, e a lesão dessa área pode acarretar diversas doenças endócrinas. O glutamato (GLU) é o anion de um dos principais aminoácidos presentes no nosso organismo e desempenha diferentes funções, sendo uma delas como neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (SNC) Na forma livre, o GLU pode estar naturalmente presente nos alimentos, assim como decorrente do seu uso como aditivo alimentar, o glutamato monossódico (MSG) No SNC o GLU atua sobre dois tipos de receptores sendo eles: ionotrópicos (AMPA, Cainato e NMDA) e metabotrópicos (mGluR1-8) divididos de acordo com sua homologia genética. Experimentalmente, o MSG é administrado, por via intraperitoneal, em ratos e camundongos recém-nascidos para desenvolver obesidade hipotalâmica, podendo levar à destruição do NARC e, assim, desenvolvimento de doenças ligadas à fome e a saciedade. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar a presença do receptor metabotrópico mGluR8 no NARC e o ganho de peso em ratos Wistar alimentados com dieta acrescida de MSG nas concentrações de 0% (controle), 1%, 2,5% e 5%, durante 90 dias. No final do período experimental os animais foram sacrificados por perfusão intracardiaca e seus encéfalos retirados para a realização da técnica de imunohistoquímica e, assim, evidenciar a presença do receptor mGluR8. Os animais foram pesados semanalmente para o controle do ganho de peso. Análise de variância (ANOVA) com $\alpha=5\%$ foi realizada para verificar se houve diferença significativa para o ganho de peso e expressão de células imunopositivas para mGluR8 entre os animais dos grupos experimentais. Verificou-se que a adição de MSG na dieta não afetou o ganho de peso dos ratos de todos os grupos. A expressão do receptor mGluR8 foi positiva no NARC dos animais de todos os grupos, sendo que a análise estatística não revelou diferença ($p<0,05$)

no número de células imunopositivas para mGluR8, nem para as células da coloração de giemsa, entre os ratos de todos os grupos experimentais. Portanto, os resultados obtidos indicaram que o receptor mGluR8 está presente em células do NARC de ratos Wistar e que a exposição sub-crônica (90 dias) ao MSG, através da dieta na concentração de até 5%, não afetou o ganho de peso nem a expressão de células imunorreativas ao receptor mGluR8 no NARC de ratos Wistar.

Palavras-chave: *glutamato monossódico; MSG; núcleo arqueado do hipotálamo; receptores metabotrópicos.*

Immunodetection of mGluR8 receptor in the arcuate nucleus of the hypothalamus of Wistar rats and study of the effects, on the receptor, resulting from sub-chronic exposure to monosodium glutamate

Abstract

The hypothalamus plays a key role in the neuroendocrine control of homeostasis. The Arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH) is located on the floor of third ventricle, has parvicellular type neurons and participates in the connection of the hypothalamus with the pituitary. Neurons of ARH are responsible for the production of various hormones, and the lesion of this area can result in various endocrine diseases. Glutamate (GLU) is the anion of one of the main amino acids in our body and performs different functions, one of them as excitatory neurotransmitter in the central nervous system (CNS). In the free form, GLU is naturally present in foods, as well as a result of its use as a food additive, like monosodium glutamate (MSG). In the CNS, GLU acts on the two types of receptors, which are: ionotropics (AMPA, NMDA and kainate) and metabotropics (mGluR1- to mGluR8) divided according to their genetic homology. Experimentally, MSG is administered intraperitoneally in newborn mice and rats to develop hypothalamic obesity, and may lead to the destruction of ARH and thus to the development of diseases related to hunger and satiety. Thus, this study aimed to assess the presence of the metabotropic receptor mGluR8 in the ARH of Wistar rats, and to evaluate the effects in the mGluR8 receptor resulting from the dietary intake of different concentrations of MSG (0% [control], 1%, 2,5% and 5%), during 90 days. Also, it was evaluated the body weight gain of the rats fed with the diets containing MSG in the different concentrations. At the end of the experimental period, the animals were sacrificed by intracardiac perfusion and their brains removed to perform the immunohistochemistry technique and, thus, highlight the presence of the mGluR8. The animals were weighed weekly to control weight gain. Analysis of variance (ANOVA) with $\alpha = 5\%$ was performed to evaluate differences for weight gain and immunopositive cells for expression of mGluR8 between the experimental groups. The results showed that consumption of MSG through the diet did not affect weight gain of the rats from all the experimental groups. Receptor expression for mGluR8 was positive at the ARH of the rats from all the experimental groups, and statistical analysis showed no difference ($p < 0.05$) for

the number of immunopositive cells to mGluR8, nor for the cells positive to the giemsa stain, between the rats of all the experimental groups. Therefore, the results indicated that oral consumption of MSG, during 90 days, at concentrations up to 5% in the diet did not affect weight gain nor the expression of the immunoreactive cells to the mGluR8 receptor in the ARH of Wistar rats.

Keywords: *monosodium glutamate; MSG; arcuate nucleus of the hypothalamus; metabotropic receptors.*

Introdução

O controle da homeostasia no organismo humano ocorre por ação dos diversos núcleos localizados no hipotálamo e outras áreas do encéfalo. Os núcleos que compõe o hipotálamo podem ser divididos por sua função, ou por sua localização. No plano tuberal são encontrados os núcleos dorsomedial, arqueado (NARC) e ventromedial, enquanto que no plano supra óptico, os núcleos supraquiasmático, supra-óptico e paraventricular, e, por último os núcleos mamilares e posterior no plano mamilar (MACHADO, 2005).

As conexões do hipotálamo são variadas e desempenham diferentes funções, dentre elas podemos citar as conexões com a hipófise, sistema límbico e área pré-frontal, entre outras. Todas as aferências ou eferências do hipotálamo são importantes. Porém, uma das conexões mais estudadas, é a decorrente das aferências por meio dos tratos hipotálamo-hipofisário e túbero-infundibular. O trato hipotálamo-hipofisário é formado por fibras que se originam nos grandes neurônios dos núcleos supra-óptico e paraventricular, e terminam na neuro-hipófise. O trato túbero-infundibular é constituído por fibras neurosecretoras que se originam nos pequenos neurônios do núcleo arqueado e áreas vizinhas do hipotálamo tuberal e terminam na eminência mediana e haste infundibular (MACHADO, 2005; BERNE & LEVY, 2000).

Os neurônios do NARC são do tipo parvicelulares sendo responsáveis pela secreção de neurotransmissores, peptídeos e hormônios liberadores que são extremamente importantes. Essas substâncias são fundamentais para o desenvolvimento do sistema neuroendócrino. Como exemplos temos: hormônios hipotalâmicos e hormônios como substância P, corticotropina, somatostatina, prolactina e gonadotróficos (BERNE & LEVY, 2000).

O neurotransmissor dopamina está presente na conexão hipotálamo adeno-hipófise, sendo que, os principais neurônios dopaminérgicos são encontrados no NARC. Os núcleos dorsomedial e paraventricular desempenham papel importante na regulação do peso corpóreo, fome e saciedade. A concentração de glicose no líquido extracelular atua como sinal de fome no hipotálamo lateral e dorsomedial, sendo que, seu aumento no sangue estimula a produção de insulina pelo pâncreas. Esse conjunto de ações atua sobre neurônios

glicoreceptores, constituindo-se em um sinal de saciedade no hipotálamo (CINGOLANI & HOUSSAY, 2004).

Os neurônios do NARC e outros núcleos hipotalâmicos que fazem parte do eixo hipotálamo-hipofisário, projetam seus axônios muitas vezes para a eminência mediana (EM), considerada um órgão circumventricular. Nesse local os neurotransmissores são armazenados em sinaptossomos e, quando necessário, são liberados para a adeno-hipófise por um sistema porta. Os principais neurotransmissores que participam de aferências no hipotálamo para a hipófise anterior são, geralmente, dopamina, acetilcolina, GABA e peptídeo opióide β -endorfina (BERNE & LEVY, 2000; HAWKINS, 2009).

A grande relação existente entre as concentrações de glutamato (GLU) no encéfalo e o ciclo Glutamato/Glutamina, demonstra que além da recaptação feita por células gliais, transportadores de GLU e a barreira hemato-encefálica (BHE) limitam os possíveis danos causados pela superestimulação dos receptores de GLU, quando os níveis da concentração desse aminoácido diferir do normal (HAWKINS, 2009; DAIKHIN&YUDKOFF, 2000). O núcleo arqueado é uma das regiões mais susceptíveis à lesão por injeção de glutamato monossódico, sendo que, a lesão desse núcleo pode acarretar em diversos problemas endócrinos (SOUZA et al., 2001).

Estudos relatam que a morte neuronal pode ocorrer devido à administração sistêmica de glutamato, sendo que, geralmente as áreas mais afetadas não são protegidas pela BHE como, por exemplo, o núcleo arqueado do hipotálamo. Em casos de isquemia existe grande concentração de glutamato no fluido extracelular, o que pode levar a superestimulação de seus receptores, ocasionando morte celular (HAWKINS, 2009).

Obesidade Hipotalâmica

Diversos trabalhos sobre obesidade hipotalâmica desencadeada pela administração de glutamato monossódico (MSG) relatam, como consequência, lesão do núcleo arqueado. As vias e doses utilizadas variam entre autores, mas, geralmente, a administração ocorre por injeções subcutâneas e, em poucos casos, por via oral (CAMPOS et al, 2008; BOGDANOV et al., 1996; HIRATA et al., 1997; DINIZ et al., 2004; BLOCH et al., 1984; HERMAUSSEN et al., 2005).

Além de aumento de peso, outros sintomas estão ligados a lesões no núcleo arqueado, como por exemplo, hipogonadismo e hipotireoidismo. Lesões do órgão subfornical – uma região do hipotálamo – causadas pela injeção de glutamato monossódico em ratos neonatos mostraram danos neurais, e possibilidade de alterações cardiovasculares pela diminuição do volume deste órgão em decorrência do tratamento com MSG (PENISI et al., 2004).

Bodganov et al., 1996, examinaram os efeitos sistêmicos do consumo oral *ad libitum* de MSG para elucidar as variações nas concentrações plasmáticas de glutamato, e a liberação de GLU para o NARC. Usando sondas de microdiálise, administraram MSG intraperitonealmente (0,25 a 2 g/kg de peso corpóreo), e por via oral (6,6% na dieta). Os resultados indicaram que existe uma relação dose-dependente do consumo de MSG na dieta com influência no valor dos níveis de glutamato no NARC e plasma. No hipotálamo, os níveis de MSG foram maiores do que os basais, em 16%, para os animais que receberam MSG intraperitonealmente. A adição do MSG na dieta levou a um aumento menor em comparação com os obtidos para as injeções, tanto no NARC quanto no plasma.

A administração de MSG em animais de experimentação recém nascidos ou adultos, leva a diferentes resultados relacionados ao NARC. Foi observado redução do peso corpóreo em ratos hipertensos (IWASE et al., 2000), resistência a insulina e intolerância a glicose (HIRATA et al., 1997), perda da ritmicidade do ciclo estral em ratas e aumento no tempo da instalação da puberdade em ratos (OLIVEIRA et al., 2004), obesidade em ratas que não afeta os índices de reprodução, assim como obesidade na prole dos animais tratados com MSG (CAMPOS et al., 2008).

Os efeitos tóxicos do GLU são mais acentuados no NARC devido à falta da BHE. No sistema nervoso entérico (SNE), o plexo intestinal, que possui a mesma função da BHE, permite menor susceptibilidade aos efeitos tóxicos de GLU no intestino (SOARES et al., 2006).

O aumento da pressão arterial com injeções de L-glutamato na área pressora caudal foi elucidado por Silva et al., 2001, os quais demonstraram que pode haver relação dos receptores de glutamato com o controle da modulação da pressão arterial e, também da respiração.

A substância P (SP) liberada por neurônios do núcleo arqueado parece sofrer alterações quando injeções de glutamato e alguns antagonistas do grupo I de receptores metabotrópicos e NMDA são utilizados. O aumento de neurônios imunorreativos a NMDA e SP foi observado, e isso pode ser relacionado ao papel do GLU na secreção neuroendócrina via receptores NMDA (CARUSO et al., 2006).

A obesidade hipotalâmica pode ou não afetar a ingestão de alimentos, o animal pode se tornar hiperfágico, normofágico ou hipofágico, indicando que existem fatores que influenciam o comportamento alimentar, que diferem daqueles relacionados com a morte neuronal no NARC (RACOTTA & HERNANDEZ-GARCIA, 1989).

Park et al., 2000, estudaram os efeitos de injeções de MSG e aspartato em ratos adultos no comportamento da retenção de memória, e ainda na perda neuronal em algumas áreas do encéfalo, dentre elas o NARC. Após única injeção intraperitoneal de 4,0 mg/ g de peso corpóreo, a retenção de memória não foi afetada. As observações sobre a perda neuronal foram marcantes na área do núcleo arqueado nos animais tratados com MSG e aspartato, sugerindo que este núcleo não está protegido pela BHE e constituindo-se em um sítio de toxicidade por MSG.

Receptores de Glutamato

Os receptores para GLU estão presentes em diversas áreas do SNC, sistema entérico, coração, pulmão e em outros órgãos. São denominados de ionotrópicos (iGluRs): NMDA (*N*-metil-D-aspartato), KA (ácido caínico) e AMPA (α -amino-3-hidroxi-5metil-4isoxazolepropiónico) e metabotrópicos (mGluRs) (LARZABAL et al., 1999; CINGOLANI et al., 2004; IGLESIAS et al., 2006; MELCHIORRI et al., 2007; SAN GABRIEL et al., 2007).

AMPA e KA são muitas vezes chamados de receptores não NMDA e mediam um grande número de sinapses excitatórias rápidas. Os NMDA demonstram papel especializado na memória, aprendizado e potenciação de longo prazo (LTP) e na morte neuronal por superestimulação (NICHOLS, 1994; OHNO & WATANABE, 1996; SMITH, 2000; LUNDY-EKMAN, 2004; KÖRH, 2006).

Os receptores metabotrópicos para GLU (mGluR) são divididos de acordo com sua homologia genética em 3 grupos: Grupo I – mGluR1 e mGluR5; Grupo II- mGluR2 e mGluR3, além, do homólogo encontrado em *Drosophila melanogaster* DmGluRA; Grupo III- mGluR4, 6, 7 e 8 (CONN & PINN, 1997). Os receptores mGluRs do grupo I são acoplados à proteína Gq, os do grupo II à Gi/Go, e os do grupo III à Gi/o (MOGHADDAM, 2004). Os mGluR do grupo I estão relacionados ao metabolismo de fosfatidilinositol bifosfato e liberação de Ca^{2+} , os dos grupos II e III inibem a síntese de AMPc (TSUCHIHASHI et al., 2000; MOGHADDAM, 2004; SWANSON, 2005).

As funções dos mGluRs são variadas: mediam sinapses lentas, participam de LTP e depressão de longo prazo (LTD), regulam tráfego de IGluRs, facilitam ou inibem a liberação de neurotransmissores, atuam na modificação de receptores NMDA e, ainda, no desenvolvimento neuronal e na interação do sistema GABA/GLU do córtex (CAMODECA et al., 1999; LARZABAL et al., 1999; SEGOVIA et al., 2004; FERRAGUTTI & SHIGEMOTO, 2006; NAIE et al., 2007). Além disso, podem estar relacionados com a regulação da pressão arterial e da resposta cardiovascular induzida pelo GLU (TSUCHIHASHI et al., 2000).

Os principais agonistas do grupo I de receptores metabotrópicos são: quisqualato e 1S, 3Raminociclopentano- 1,3-dicarboxilato (1S,3R-ACPD) ambos relacionados com a hidrólise de fosfolipídios de membrana. O grupo II é ativado por 1S, 3R-ACPD, já o grupo III por L-2-amino-4-fosfonobutirato (L-AP4). Nos dois últimos grupos os agonistas modulam a adenilato ciclase (DUVOISIN et al., 1995).

Os do grupo I podem ter papel chave no desempenho dos circuitos motores dos gânglios basais e, dessa maneira, ser um importante alvo terapêutico para doenças neurodegenerativas como o mal de Parkinson (CONN et al., 2005). Além do Parkinson outras doenças, como ansiedade e estresse podem ter relação com mGluRs, sugerindo mais um modelo para tratamento dessas alterações (SWANSON et al., 2005).

No cerebelo existe envolvimento de mGluRs nas sinapses das células de Purkinje. O grupo I está relacionado à transmissão excitatória, já os dos grupos II e III, aparentemente, são necessários para a inibição sináptica nessas células, sendo o mGluR1 um forte candidato para essa função (NEALE, 2001).

Os receptores do grupo III mGluR4 e mGluR7 são modulados negativamente pelo GLU e GABA. Localizam-se nos neurônios pré-sinápticos dos gânglios da base, e também são expressos nas células da retina de aves durante o desenvolvimento. Estão ligados à modulação da liberação de glutamato em eventos excitotóxicos podem atuar na prevenção desses danos (SAMPAIO et al., 1998).

O último receptor a ser identificado do grupo III foi o mGluR8, com cerca de 97,5kDa. Primariamente isolaram seu DNA em células da retina e, posteriormente, o RNA mensageiro desse receptor foi encontrado em diversas áreas do encéfalo como: bulbo olfatório, córtex cerebral, hipocampo, cerebelo e células fotoreceptoras, principalmente nos terminais axônicos (DUVOISIN et al., 1995; SAUGAST et al., 1997; MICHAELIS, 1998; KOULEN & BRANDSTATTER, 2002).

O mGluR8 é amplamente distribuído em neurônios pré-sinápticos que participam de sinapses glutamatérgicas relacionados à via de dor na amígdala, sendo essa e o hipocampo duas grandes áreas de expressão dessa subunidade (SWANSON et al., 2005).

Segundo Shigemoto et al., 1997, os receptores mGluR8 podem ser encontrados externamente à fenda sináptica e terminais pré-sinápticos. Nesses casos são ativados quando há excessiva quantidade de glutamato disponível (SCANZIANI et al., 1997).

Além da amígdala e corpos mamilares, mGluRs dos três grupos são expressos no núcleo supraquiasmático no hipotálamo, participando da regulação dos ritmos circadianos em resposta à luminosidade (HAAK et al., 2006).

O perfil farmacológico de mGluR8 possui características dos grupos II e III que permitem um papel interessante na retina. Desempenha papel de autoreceptor nos terminais axônicos dos fotoreceptores, assim como outros mGluRs em diferentes áreas do encéfalo. Entretanto, nas células da retina apenas esse receptor desempenha essa função. A diminuição da concentração de Ca^{2+} citosólico nos fotoreceptores após a ativação do mGluR8, corrobora a ideia da sua função de autoreceptor (CONN & PINN, 1997; KOULEN & BRANDSTATTER, 2002).

O mGluR8 possui homologia com os outros representantes do grupo III na seguinte seqüência: mGluR4 e 7 - 74% e mGluR6 - 70%. A expressão do receptor na retina e em outras áreas se dá por volta do 16º dia de vida embrionária, pode ser verificado na região do

telencéfalo, hipotálamo, medula e retina. Na idade adulta a expressão nessas mesmas áreas é maior (DUVOISIN et al., 1995).

Ratos *knockout*, sem o receptor mGluR8 não apresentaram alteração na atividade motora, audição ou tônus muscular. No entanto, em testes de aquisição de memória, com a utilização de nado forçado, os animais mutantes demonstraram déficits nos resultados. Nos testes de exploração espontânea com choque os animais *knockout* apresentaram redução da sensibilidade à dor (GERLAI et al., 2002).

A justificativa para este trabalho encontra-se na discrepância entre resultados obtidos por diversos autores em relação aos efeitos adversos e fisiológicos decorrentes da exposição ao MSG, tanto por via oral, quanto por via endovenosa. Alguns autores relataram efeitos tóxicos causados pelo MSG, descrevendo lesões no núcleo arqueado e outras áreas do hipotálamo. Segundo os autores, essas lesões ocorreriam pela superestimulação dos receptores ionotrópicos e metabotrópicos de GLU, sendo que poderiam estar relacionadas com o aumento de doenças degenerativas do SNC (BLOCH et al., 1984; BODGANOV et al., 1996; HIRATA et al., 1997; SOUZA et al., 2001; DINIZ et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2004; PENISI et al., 2004; CONN et al., 2005; FERNANDEZ-TRESGUERRES, 2005; HERMANUSSEN et al., 2005; CAMPOS et al., 2008; HAWKINS, 2009). No entanto, outros autores utilizaram agonistas e antagonistas dos receptores de GLU para o tratamento desses danos (NEALE, 2001; SWANSON et al., 2005). Ainda, as doses de MSG utilizadas nos trabalhos que evidenciam efeitos tóxicos são muito altas, ou por vias de administração que não representa a utilização do MSG como aditivo alimentar na dieta do ser humano.

Objetivos

Objetivo Geral

Após estudos relatando que altas doses de MSG causam lesão no núcleo arqueado do hipotálamo e, conseqüentemente, resistência à insulina, intolerância a glicose e relação com doenças degenerativas do SNC, este trabalho teve como objetivo geral avaliar a expressão do receptor metabotrópico mGluR8 no núcleo arqueado hipotálamo de ratos Wistar, assim como avaliar os efeitos no receptor decorrentes da alimentação dos animais, durante 90 dias, com dietas adicionadas de MSG em até 5%.

Objetivos específicos

- Avaliar a expressão do receptor metabotrópico mGluR8 no núcleo arqueado do hipotálamo de ratos Wistar;
- Avaliar se a dieta adicionada de MSG, nas concentrações de 0% (controle), 1%, 2,5% e 5%, influencia o número de células reativas ao receptor mGluR8 no núcleo arqueado do hipotálamo, assim como o número de células coradas pela técnica de giemsa, nessa mesma região do encéfalo.
- Avaliar se a dieta adicionada de MSG, nas concentrações de 0% (controle), 1%, 2,5% e 5%, influencia o ganho de peso dos animais durante o período experimental (90 dias).

Materiais e Métodos

Animais e dieta

O protocolo deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal, do Instituto de Biologia, IB/Unicamp. Foram utilizados 32 ratos machos da linhagem *Wistar*, desmamados com 21 dias e procriados no Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas.

Os animais foram divididos em grupos que receberam dieta comercial (Purina® Labina) sem a adição de MSG (grupo controle, n= 8) e grupos (n= 8) que receberam a dieta adicionada de MSG nas seguintes concentrações: 1%, 2,5% e 5%, durante todo o período experimental (90 dias). Os animais foram mantidos em caixas próprias para roedores com 4 animais cada, em temperatura constante de 21 ± 2 °C, com ciclo claro/escuro de 12 horas e alimentados com dieta e água *ad libitum*.

Para controle do ganho de peso, os animais foram pesados semanalmente.

Avaliação Imunohistoquímica e coloração giemsa

Para a realização da técnica de imunohistoquímica e giemsa, após o término dos 90 dias de período experimental, os animais foram sacrificados por perfusão intracardíaca sob anestesia (Figura 1). A anestesia foi aplicada em associação de cloridato de ketamina (Ketalar, PARKE-DAVES) 0,06ml /100g de peso corporal, e cloridato de xilazina

(Rompum, MILES-LAB), 0,04ml/100g de peso corporal, intramuscular. Com auxílio de material cirúrgico a caixa torácica foi exposta e a sonda colocada no ventrículo esquerdo para a perfusão, em primeiro momento com solução salina 0,9%, cerca de 300 mL por animal e subsequentemente com solução de paraformaldeído a 4%, em tampão fosfato (PB 0,1M) pH 7,40, à aproximadamente 4°C, 1 litro por animal. Após a perfusão os animais foram refrigerados por 3 horas, para então a remoção do encéfalo (Figura 2). O encéfalo foi retirado e mantido em solução crioprotetora de sacarose 30% em solução PB 0,1M pH 7,40 por quarenta e oito horas. Terminado o tempo de crioproteção os encéfalos foram emblocados e congelados a -80°C em solução congelante TBS Tissue Médium Freezing®, posteriormente seccionados em criostato a 40µm de espessura. Os cortes foram armazenados em PB 0,1M na geladeira e com a solução trocada periodicamente ou em solução anti-freezing e congelados em freezer a -20°C (SANTANA, 2007).



Figura 1 - Local da inserção de sonda para perfusão intracardíaca, após exposição da caixa torácica.

Foram utilizados 3 encéfalos de cada grupo tratado com MSG 1%, 2,5% e 5% e 3 encéfalos do grupo controle (0% de adição de MSG na dieta). Cerca de 10 cortes da região do diencéfalo, por animal foram selecionados para a realização da técnica de imunohistoquímica e da coloração de giemsa.



Figura 2 - Encéfalo de rato após perfusão intracardíaca e período de refrigeração.

Os cortes selecionados para a coloração de giemsa foram embebidos em solução própria de montagem e montados em lâminas gelatinizadas. Durante 48 horas foi realizada secagem em placa quente (37°C) antes da coloração de giemsa. A coloração das lâminas foi realizada seguindo uma seqüência que se inicia com a desidratação dos cortes por 1 hora no clorofórmio, cerca de 1 minuto e 30 segundos em alcoóis de diferentes concentrações e 45 minutos no corante, nova desidratação por outra série de alcoóis, fixação do corante e clarificação em solução CitriSolv (Fisher Scientific ®). Para adesão da lamínula foi utilizada a resina Pemount®, a secagem da lâmina durou cerca de 24 horas em temperatura ambiente (SANTANA, 2007).

A técnica de imunohistoquímica foi realizada com a incubação do anticorpo primário policlonal de guinea pig contra mGluR8 fornecido por Chemicon International (Temecula, CA, USA), por no mínimo 12 horas, em temperatura ambiente ou na geladeira, com concentração entre 1:1000 – 2000. Os cortes foram incubados com Triton X-100 e soro normal de Burro fornecido por Jackson ImmnuoResearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA, USA) (SANTANA, 2007).

Após o término de incubação, os cortes foram lavados em PB 0,1M por 3 vezes de 10 minutos, e incubados com o anticorpo secundário biotinilado contra as imunoglobulinas do animal do qual foi feito o anticorpo primário mGluR8, Burro contra Guinea Pig,

fornecido por Jackson ImmnuoResearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA, USA) Os cortes ficaram por 1 hora em temperatura ambiente em contato com os anticorpos. Seqüencialmente ao término da incubação, os cortes foram lavados em PB 0,1M e incubados com o complexo avidina-biotina-peroxidase em solução de Triton-X-100 0,3% em PB 0,1M e 0,4M de NaCl por mais 1 hora. Após a incubação com o complexo avidina-biotina-peroxidase, outra série de lavagens foi realizada e então os cortes foram imersos em meio contendo diaminobenzidina (DAB) (Sigma, St. Louis, MO) 0,05% em PB 0,1M por cerca de cinco minutos. A seguir foi acrescentado um volume não específico de solução de peróxido de hidrogênio para evidenciar a reação. Em seguida os cortes foram lavados 3 vezes de 10 minutos cada em PB 0,1M e posteriormente montados em lâminas gelatinizadas. A secagem das lâminas ocorreu por no mínimo 48 horas em placa quente (37°C), e assim foram banhados em solução de tetróxido de ósmio para intensificação da marcação, seguindo o protocolo de lavagem em água destilada, intensificação em tetróxido de ósmio, lavagem novamente, desidratação em alcoóis, clarificação em solução de CitriSolv (Fisher Scientific) e montagem da lamínula com resina Pemount®, após a secagem em temperatura ambiente por 24 horas as lâminas puderam ser observadas em microscópio óptico de luz (SANTANA, 2007).

Para a contagem das células tanto da coloração de giemsa quanto para imunohistoquímica, imagens digitalizadas dos cortes coronais foram retiradas em aumento de 200x, e com auxílio de ferramentas do software Adobe Photoshop®, as células foram contabilizadas. As células da coloração de giemsa e da técnica de imunohistoquímica foram contabilizadas em todos os níveis do NARC, segundo Swanson, 1998.

Avaliação Estatística

A análise estatística de todos os resultados foi realizada utilizando o método ANOVA com nível de significância $\alpha=5\%$, e teste de Tukey para comparações das médias. O software Graph Pad Prism 5.0® foi utilizado para a realização das análises.

Resultados

Ganho de peso

A partir das pesagens semanais dos animais do grupo controle e dos grupos tratados com MSG, foram obtidos os valores de ganho de peso durante o período experimental. As médias e desvio padrão dos dados estão apresentados na Figura 3 (e no ANEXO III, Tabelas 1 e 2). A análise de variância entre os grupos tratados com MSG nas concentrações estabelecidas (1%, 2,5% e 5%) e o grupo controle (0%), não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias analisadas, indicando que a adição de MSG na dieta não afetou o ganho de peso.

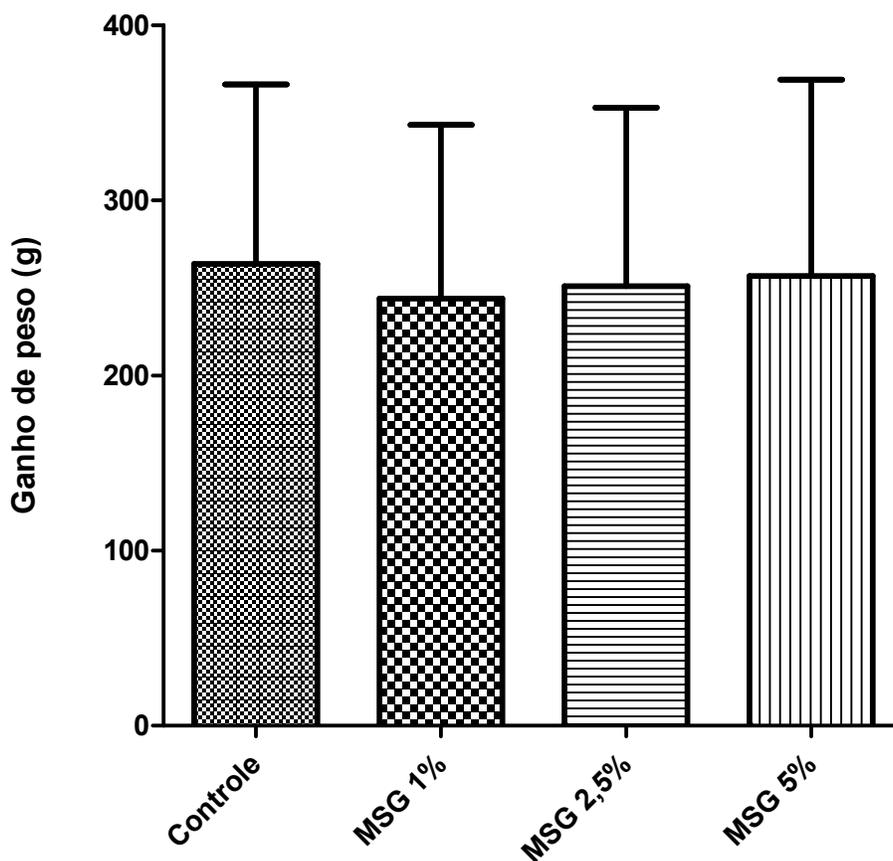


Figura 3. Ganho de peso de ratos Wistar alimentados, durante 90 dias, com dietas adicionadas de glutamato monossódico (MSG) nas concentrações de 0% (controle), 1%, 2,5% e 5% (n=8).

Avaliação Imunohistoquímica e giemsa

As médias (n=3) da contagem das células coradas pela técnica de giemsa nos grupos dos ratos Wistar alimentados, durante 90 dias, com dietas contendo MSG (1%, 2,5% e 5%) e do grupo controle estão apresentadas na Figura 4 (e no ANEXO III, Tabela 3), e as médias da contagem celular das células imunopositivas para mGluR8 nos cinco níveis do núcleo arqueado do hipotálamo (NARC) para todos os grupos experimentais são apresentadas na Figura 5 (e no ANEXO III, Tabela 4).

A coloração pelo método de giemsa foi utilizada para identificação e dimensionamento da área estudada. Segundo Swanson, 1998, o núcleo arqueado está situado a AP= -1.78 de β a AP = -3.25 de β (Figuras 6 a 10).

Na Figura 11 são apresentados cortes coronais dos encéfalos dos ratos Wistar com coloração de giemsa em todos os níveis do NARC do grupo controle. Na Figura 12 são apresentados cortes coronais representando diferentes níveis do núcleo arqueado do hipotálamo (NARC) com marcação imunopositiva para mGluR8 dos animais tratados, durante 90 dias, com MSG nas diferentes concentrações 0% (controle), 1%, 2,5% e 5%. Para representar a marcação do receptor mGluR8 foram digitalizadas imagens de um ou dois níveis de um mesmo animal, tanto para o grupo controle como para os animais tratados.

Nos cortes dos animais alimentados com dieta adicionada de MSG nas concentrações de 2,5% e 5%, foram verificadas vesículas no tecido cerebral (Figura 12), porém a área estudada (NARC) foi pouco afetada. Conseqüentemente, o resultado da avaliação estatística para a contagem celular tanto para giemsa quanto para as células imunorreativas ao mGluR8, pode não ter sido alterado pela perda de tecido. Falhas na técnica, no momento da microtomia de congelamento, podem ter causado a perda tecidual. Assim a adição de MSG não teria sido responsável pelo aparecimento das vesículas.

Células do núcleo arqueado, em todos os seus níveis, estiveram presentes nos cortes dos animais controle e tratados com MSG. O resultado da contagem celular da técnica de giemsa foi aproximado em todos os grupos (ANEXO III, Tabela 3). A análise estatística dos resultados, pelo método de análise de variância com $\alpha=5\%$, indica que não há diferença significativa ($p<0,05$) na marcação celular para os animais que tiveram em sua dieta adição de MSG em relação ao grupo controle. O fato das médias não diferirem estatisticamente,

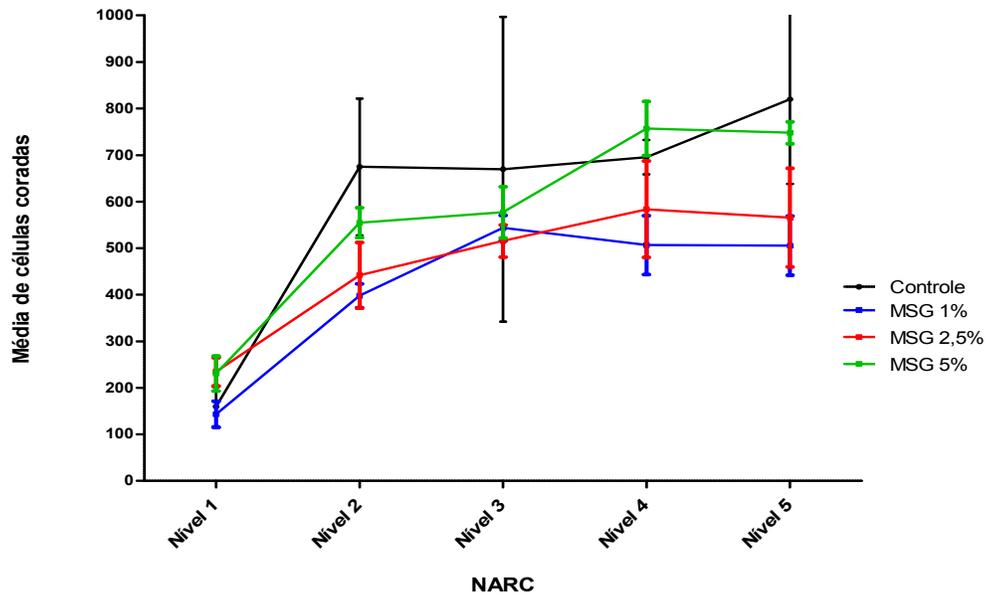


Figura 4. Média de células coradas pela técnica de giemsa nos cinco níveis do núcleo arqueado do hipotálamo (NARC) de ratos Wistar alimentados, durante 90 dias, com dietas adicionadas de glutamato monossódico (MSG) nas concentrações de 0% (controle), 1%, 2,5% e 5% (n=3).

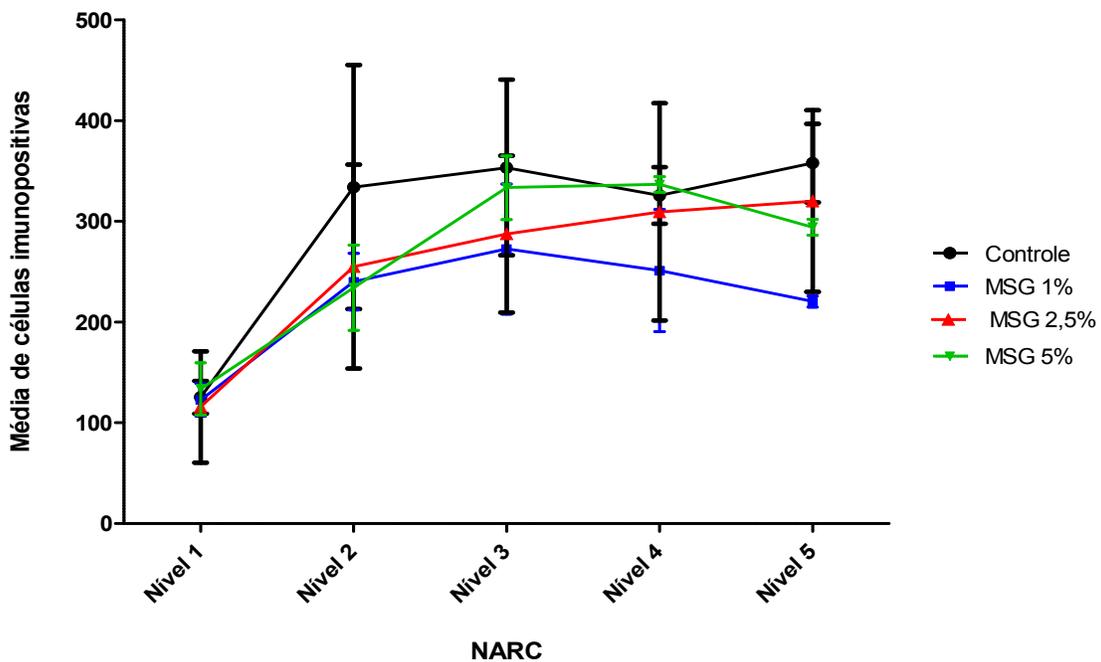


Figura 5. Média de células imunopositivas para mGluR8 nos cinco níveis do núcleo arqueado do hipotálamo (NARC) de ratos Wistar alimentados, durante 90 dias, com dietas contendo glutamato monossódico (MSG) nas concentrações de 0% (controle), 1%, 2,5% e 5% (n=3).

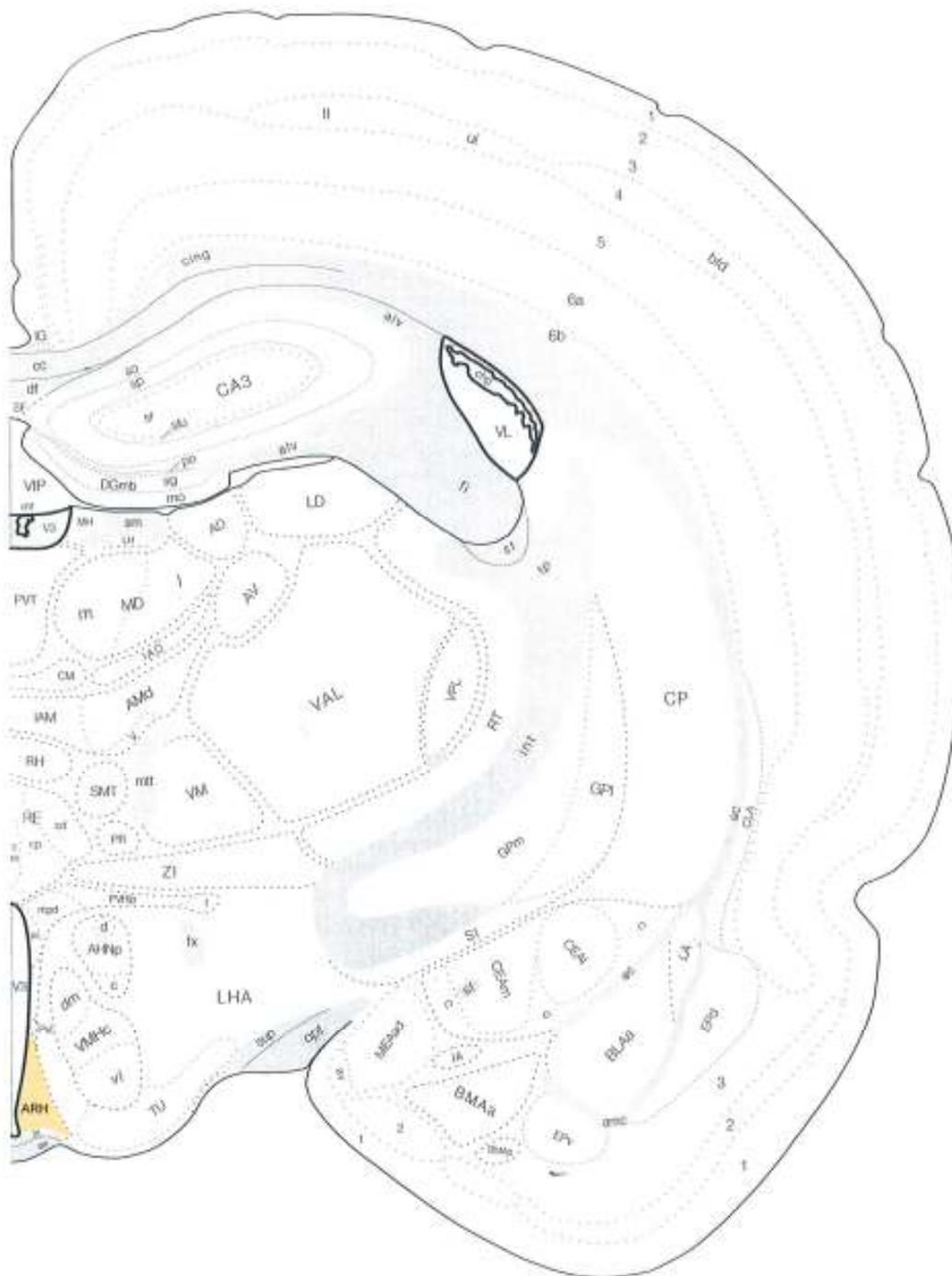


Figura 7 – Representação do segundo nível do núcleo arqueado (NARC) do hipotálamo de ratos Wistar. AP = - 2,00 de β . Área em destaque região que representa o núcleo arqueado. Modificado de Swanson, 1998.

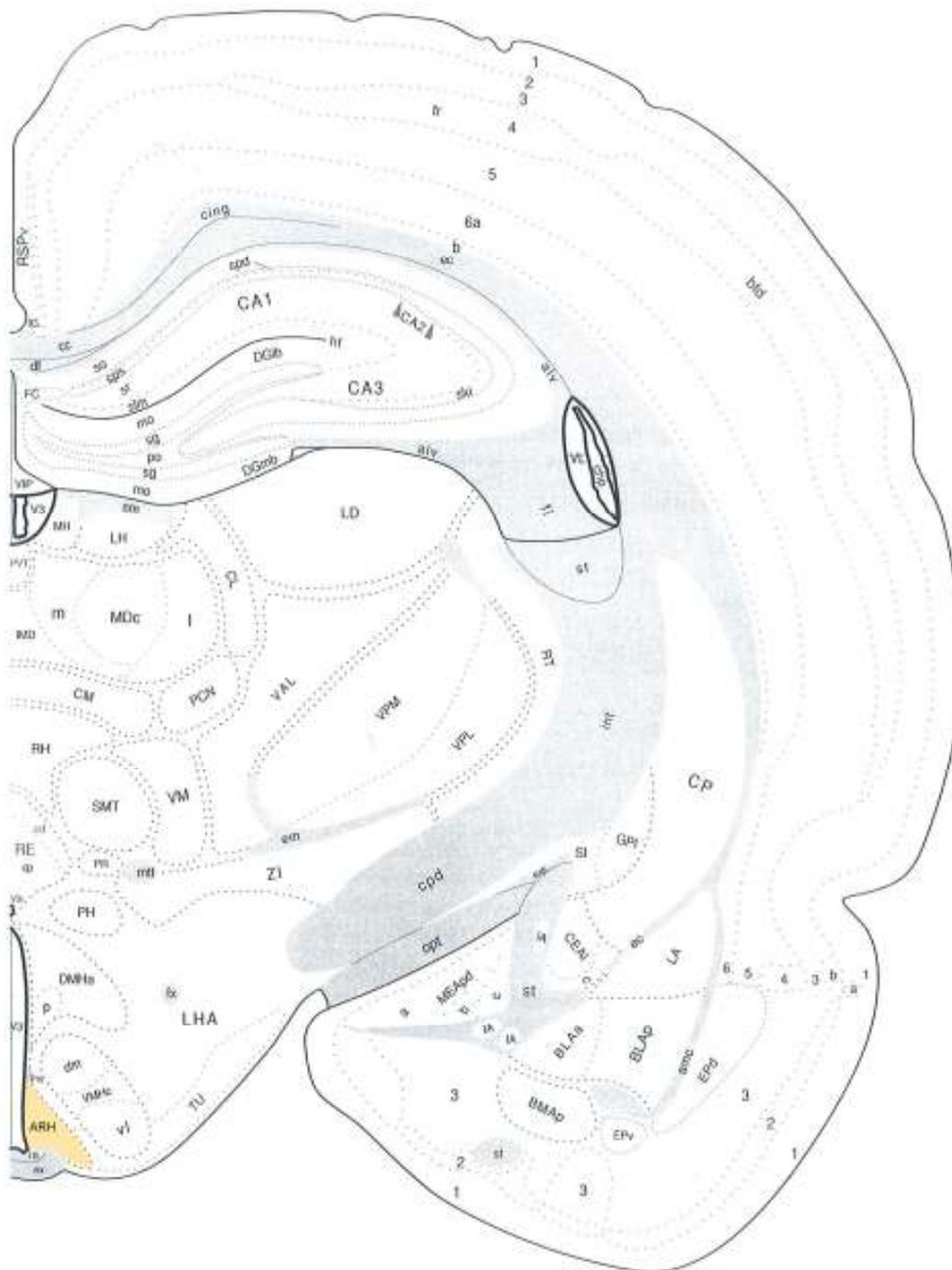


Figura 9 – Representação do quarto nível do núcleo arqueado (NARC) do hipotálamo de ratos Wistar. AP = - 2,85 de β . Área em destaque região que representa o núcleo arqueado. Modificado de Swanson, 1998.

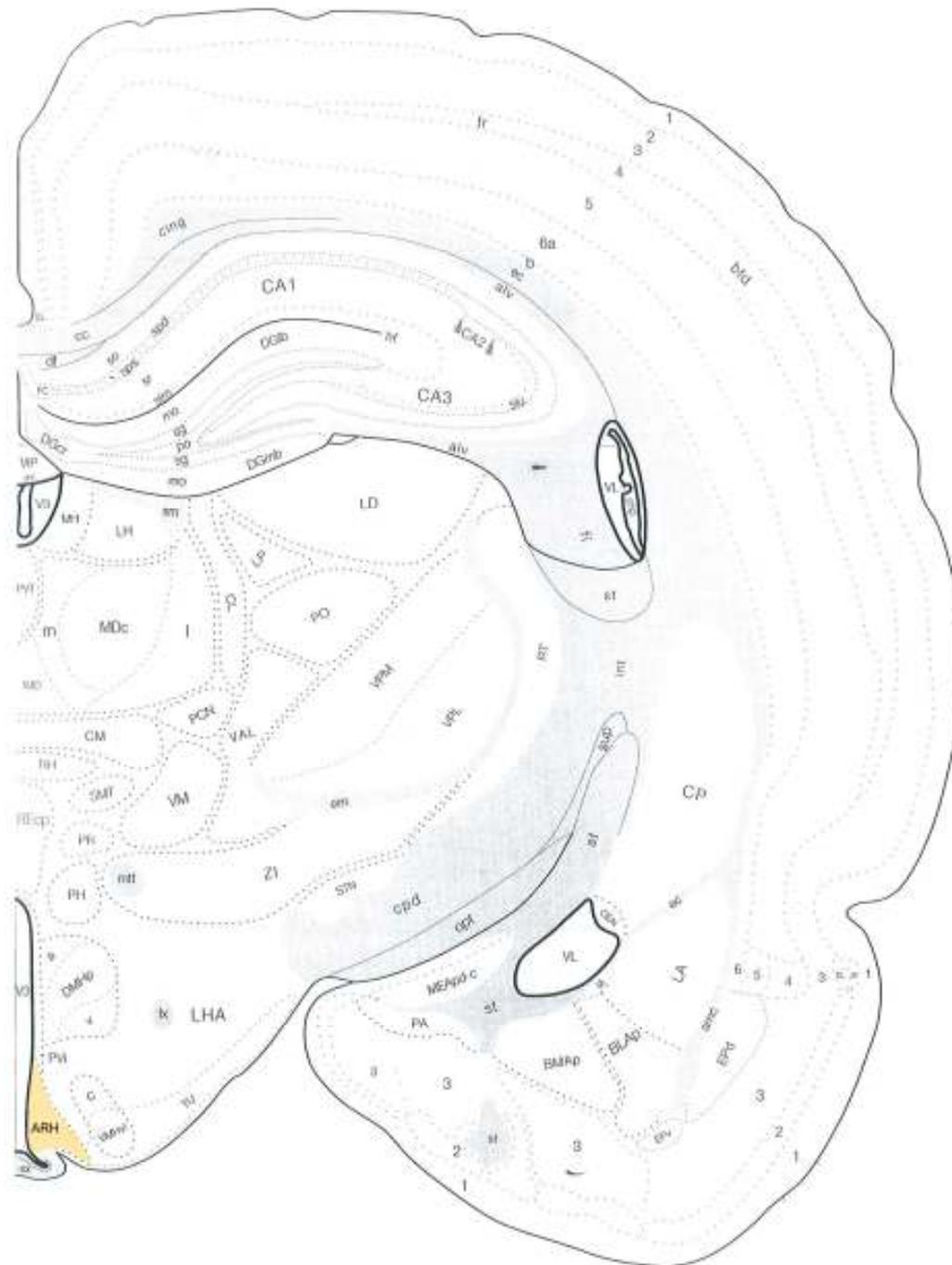


Figura 10 – Representação do quinto nível do núcleo arqueado (NARC) do hipotálamo de ratos Wistar. AP = - 3,25 de β . Área em destaque região que representa o núcleo arqueado. Modificado de Swanson, 1998.

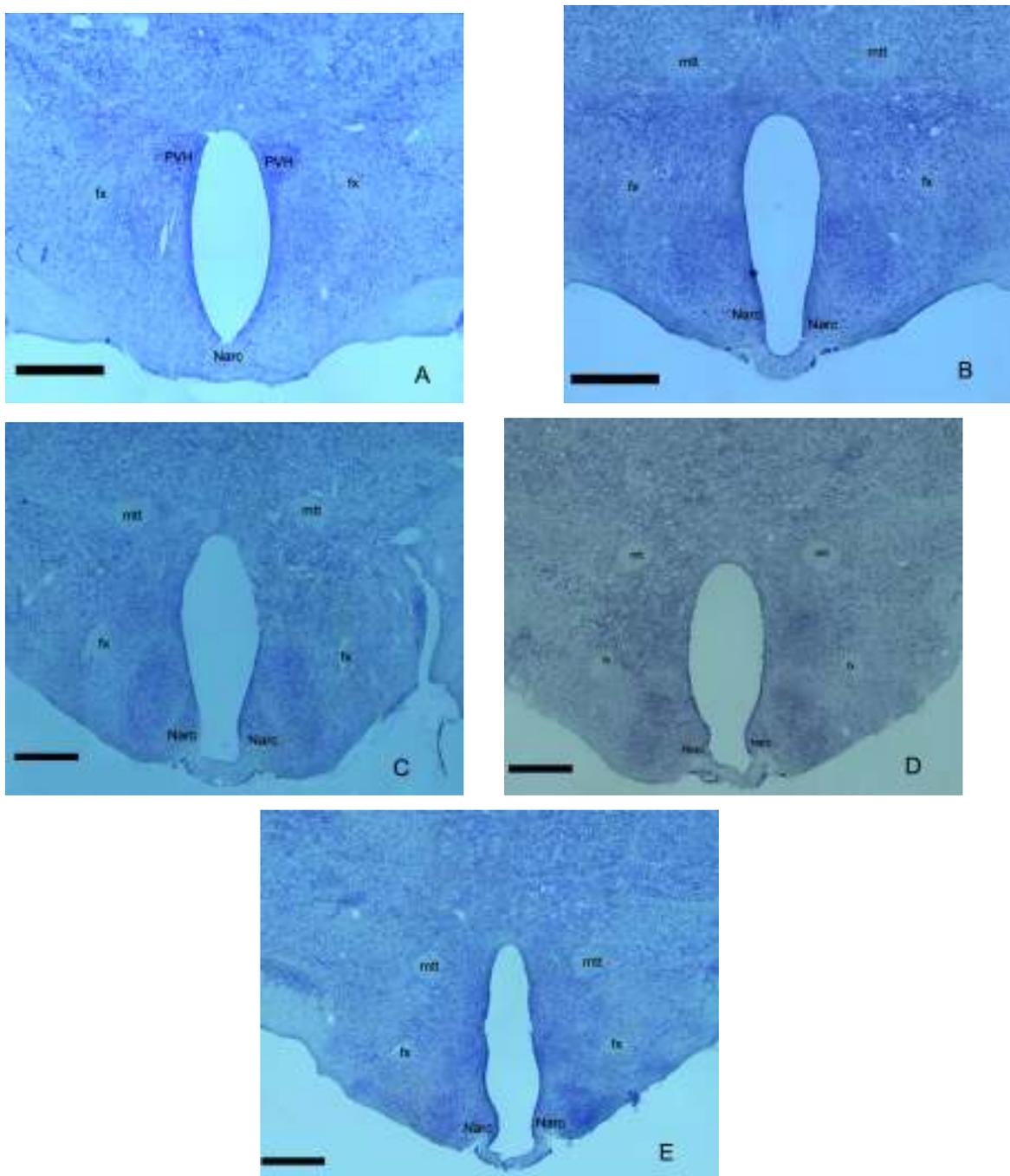


Figura 11 - Cortes coronais dos encéfalos dos ratos Wistar (grupo controle) com coloração de giemsa. A representa primeiro nível do NARC; B segundo nível; C terceiro; D quarto e E quinto nível. Aumento 80 vezes e barra de escala 300 micromêtros. **Legendas:** Narc = Núcleo Arqueado do Hipotálamo; mtt = Trato Mamilotalâmico; Fx= fórnix e PVH = núcleo paraventricular do hipotálamo.

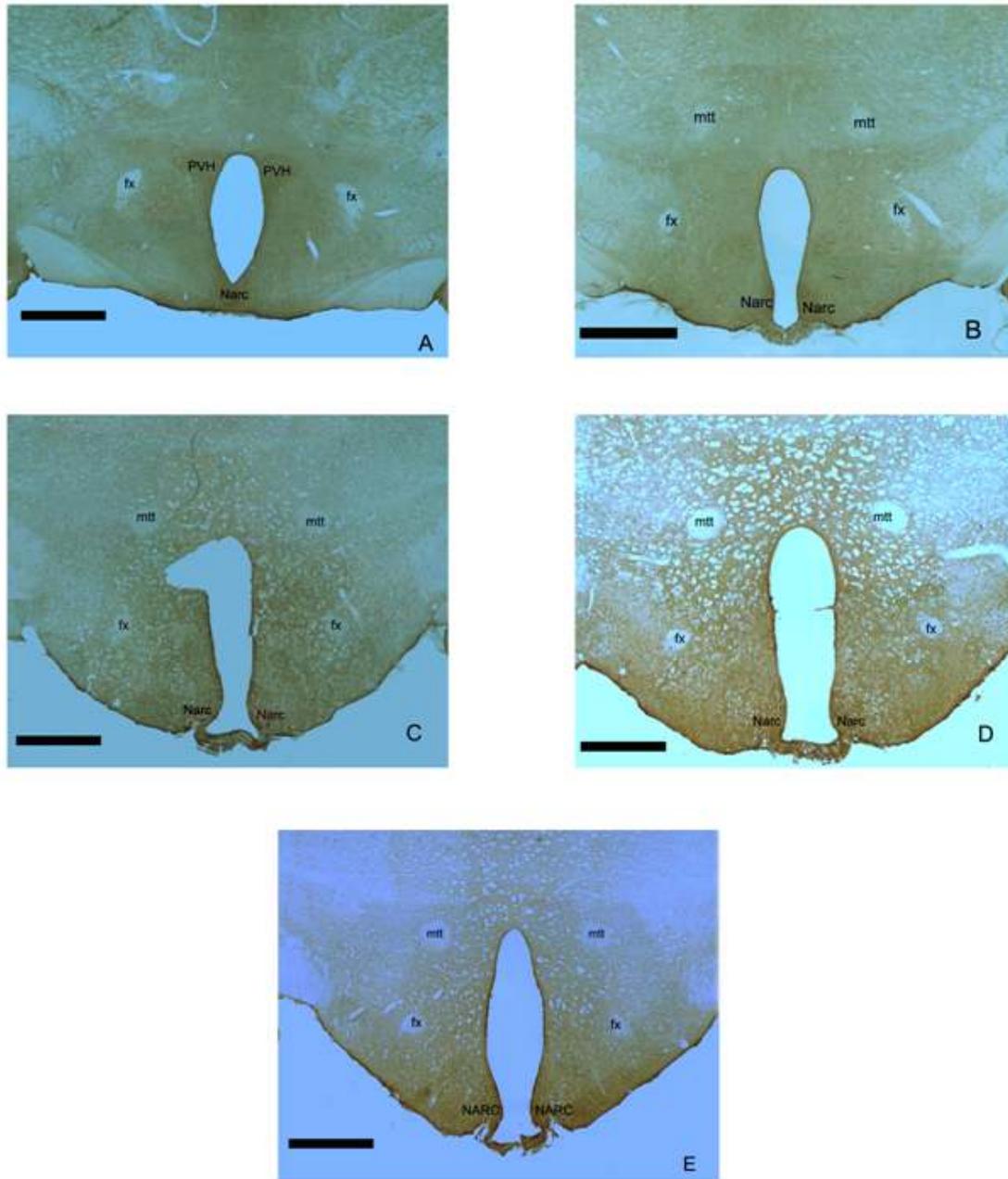


Figura 12 – Cortes coronais dos encéfalos de ratos Wistar alimentados, durante 90 dias, com dietas adicionadas de glutamato monossódico nas concentrações de 0% (controle), 1%, 2,5% e 5%, representando diferentes níveis do núcleo arqueado do hipotálamo com marcação imunopositiva para mGluR8. A = Corte de animal do grupo controle, 1º nível; B= Corte de animal do grupo controle, 2º nível; C= Corte de animal do grupo tratado com MSG 1%, 3º nível; D = Corte de animal do grupo tratado com MSG 5%, 4º nível; E = Corte de animal do grupo tratado com MSG 2,5%, 5º nível. Aumento 80 vezes e barra de escala 300 micrometros. **Legendas:** NARC = Núcleo Arqueado do Hipotálamo; mtt = trato mamilotálâmico; Fx= fórnix e PVH = núcleo paraventricular do hipotálamo.

indica que o tratamento com MSG não altera o número de células coradas no núcleo arqueado.

A utilização da técnica de imunohistoquímica possibilitou visualizar a presença do receptor mGluR8 em toda a extensão do núcleo arqueado, tanto no grupo controle quanto nos grupos dos animais expostos ao MSG através da dieta, na concentração de até 5%.

O resultado da análise estatística confirma que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos grupos tratados nas diferentes concentrações de MSG e o grupo controle. Esse resultado indica que não houve alteração no número de células contabilizadas nos grupos que foram tratados com MSG em relação ao grupo controle, podendo ser considerado que a adição de MSG, nas concentrações adicionadas a dieta, não influenciou na resposta celular.

Discussão

A utilização de MSG como aditivo alimentar é considerada segura pelo Comitê FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares e Contaminantes, o qual estabeleceu uma ingestão diária aceitável (IDA) “não especificada” (JECFA, 1988). O que significa que, em base aos dados disponíveis, a ingestão diária total da substância, que se deriva de seu uso para alcançar os efeitos desejados e de sua concentração natural nos alimentos, não representa um perigo para a saúde. Por esta razão, não se considera necessário o estabelecimento de uma IDA expressa em forma numérica. O US FDA considera o MSG como um ingrediente de consumo seguro (IGIS, 2011). A ANVISA adota a IDA “não especificada” estabelecida pelo JECFA e regulamenta o uso do MSG como produto BPF (quantum satis), que significa que o limite máximo de seu uso é baseado na quantidade suficiente para se alcançar o efeito tecnológico desejado.

Todavia, alguns autores têm relatado que a exposição oral ao MSG pode afetar a ingestão de alimentos, o ganho de peso e estatura, animais apresentaram hipersulinemia e hiperglicemia, os índices de reprodução não são afetados pela ingestão de MSG (CAMPOS et al, 2008; BOGDANOV et al, 1996; HIRATA et al, 1997; DINIZ et al, 2004; BLOCH et al 1984; HERMAUSSEN et al, 2005).

Entretanto, os resultados da presente pesquisa demonstram que ratos Wistar alimentados, durante 90 dias (exposição sub-crônica), com dietas adicionadas de MSG nas

concentrações de 1%, 2,5% e 5% tiveram ganho de peso semelhante ($p < 0,05$) entre si, assim como em relação ao grupo controle (dieta sem a adição de MSG). Consequentemente, a adição de MSG à dieta, na concentração de até 5%, não afetou o ganho de peso dos animais. Estes resultados estão de acordo com Monno et al., 1995 e Walker, 1999, em ambos estudos o aumento de peso não foi correlacionado a ingestão de MSG. Todavia, diferem daqueles obtidos por alguns autores que afirmam que o consumo de MSG acarreta aumento de peso corpóreo e, assim, obesidade (HIRATA et al, 1997; DINIZ et al, 2004; BLOCH et al 1984; HERMAUSSEN et al, 2005;).

Dessa maneira os achados anteriores em que efeitos adversos são elucidados, podem ter ocorrido em decorrência da via de administração, assim como pelo nível de exposição ao MSG. Nossos resultados não indicam alterações no ganho de peso dos ratos durante os 90 dias de ensaio biológico, mesmo nos animais alimentados com a maior concentração de MSG adicionada à dieta (5%).

Samuels, 1995, também não reportou nenhum efeito adverso decorrente do uso de MSG em indivíduos saudáveis. O autor afirmou, ainda, que o MSG é rapidamente metabolizado no intestino podendo ser uma fonte potencial de energia do órgão. Tal informação foi também observada por Blacher et al., 2009, os quais verificaram o papel do glutamato no intestino como fonte de energia em enterócitos e colonócitos.

O FDA considera que doses maiores que 3 gramas de MSG livre presentes no alimento em uma única refeição, podem causar alguns sintomas relacionados a síndrome do restaurante chinês: rubor, rigidez muscular, fraqueza, dor de cabeça, em uma pequena parte da população. O organismo não distingue se o glutamato é do consumo de MSG ou do aminoácido presente no alimento. Bodganov et al., 1996, indicaram que a rota de administração de MSG pode elevar ou não os níveis de GLU no plasma e no hipotálamo, preferencialmente no NARC. Doses de 2,3g/kg de MSG na dieta elevaram esses níveis, mas não foram suficientes para causar morte celular e que dessa forma o seu consumo na dieta pode não causar danos neurológicos.

Todos os danos causados pelo MSG podem ser devidos ao fato de que o núcleo arqueado do hipotálamo é um local em que a barreira hematoencefálica não é funcional, portanto, os neurônios dessa região sofrem com as alterações dos níveis plasmáticos de glutamato. Em humanos a BHE também não é funcional nessa área do encéfalo, dessa

maneira, não só o glutamato ou MSG podem desencadear morte neuronal, mas, outras substâncias como proteína vegetal hidrolisada ou cisteína, causam o efeito neurotóxico (OLNEY et al., 1969). A utilização de 4mg/g de MSG/ g de peso corpóreo em ratos recém-nascidos, promoveu obesidade (SOARES et.al. 2006), apesar dos animais terem sido normofágicos. Assim essa obesidade pode ter sido causada por morte neuronal em outras áreas do hipotálamo, diferentes do núcleo arqueado.

Ações fisiológicas benéficas podem ser observadas com o uso de MSG na dieta. Os achados de Kondoh et al., 2009, mostraram que o seu uso diminuiu o aumento de peso corpóreo e aumentou a concentração de leptina no plasma, reduzindo a deposição de gordura corpórea. Na concentração de 1% dissolvido em água, o MSG não alterou a pressão arterial, nem as concentrações de glicose, insulina, colesterol e glutamato no plasma, em relação aos animais controles. Porém tais fatos podem ter ocorrido devido à presença de receptores para glutamato no estômago e intestino que ativam respostas do nervo vago e, assim, desencadeiam vários sinais ao hipotálamo e área pré-óptica, importantes centros de controle de processos homeostáticos, induzindo a respostas benéficas pós-ingestão de glutamato.

Assim, suplementação da dieta com MSG pode auxiliar no tratamento de pessoas que tenham desordens alimentares como anorexia ou bulimia, idosos, pessoas hospitalizadas com perda de peso devido a doenças (YAMAMOTO, 2009).

A utilização da técnica de imunohistoquímica possibilitou evidenciar a presença da subunidade de receptor metabotrópico R8 no núcleo arqueado dos ratos controle e tratados com MSG durante os 90 dias de ensaio biológico. A coloração de giemsa utilizada como guia histológico para o estudo permitiu a visualização dos cinco níveis do núcleo arqueado e, como observado nos resultados, à concentração de MSG estabelecida não influenciou no número absoluto de células contabilizadas na área analisada, tanto para a coloração de giemsa como para a imunohistoquímica. Estes resultados estão de acordo com os achados de Monno et al., 1995, que através da técnica de Nissl evidenciaram que não houve perda celular na região do núcleo arqueado após exposição oral ao MSG de animais durante 21 dias.

Não há consenso na comunidade científica de que a subunidade R8 esteja presente no núcleo arqueado. A localização nos neurônios permite uma série de indagações sobre

seu papel metabólico no sistema nervoso central e sua influência sobre as diferentes projeções do NARC para a hipófise e outras áreas do hipotálamo e também produção dos hormônios pelo núcleo (SHIGEMOTO et al., 1997).

A ingestão do MSG nas concentrações estabelecidas, não alterou o número de receptores mGluR8, podendo não ter influenciado na função do núcleo arqueado. Entretanto, a localização de receptores mGluR8 em neurônios pré-sinápticos indica que no núcleo arqueado do hipotálamo pode haver transmissão sináptica glutamatérgica, além das conhecidas como gabaérgicas e dopaminérgicas.

A expressão dos receptores mGluR8 no hipocampo é altamente difundida, pois, participam ativamente nos mecanismos de memória e aprendizado (YUNG, 1998; CAMODECA et al., 1999). A localização em alguns núcleos subtalâmicos e gânglios da base demonstram seu papel na regulação da transmissão sináptica e associação com algumas doenças (AWAD-GRANKO & CONN, 2001). Participam das vias de dor na amígdala e medula espinhal e no controle da pressão e resposta cardiovasculares. Sua presença no NARC pode indicar um papel em funções neuroendócrinas e ainda respostas a estímulos externos que levam a morte neuronal, já que esse núcleo é um dos principais sítios de excitabilidade causada por GLU ou outras substâncias (BERNE&LEVY, 2000; CONN et al., 2005; SWANSON et al., 2005; CARUSO, et al., 2006).

Gerlai et al., 2002, elucidaram que receptores mGluR8 estão envolvidos no feedback negativo que media a produção, transporte, liberação e armazenagem de glutamato no encéfalo, e assim a falta desse receptor funcional, pode acarretar em processos que levam a uma modificação a resposta a diversos estímulos ou comportamentos.

A neurotoxicidade que ocorre por aminoácidos excitatórios pode ser modulada pela presença de receptores mGluRs pela inibição do neurotransmissor, tanto para glutamato quanto para GABA. mGluR4 é associado a essa liberação no sistema talamocortical (SNEAD et al., 2000).

Em ratos *knockout* para mGluR8 não apresentaram diferença significativa em relação a ratos normais, para o ganho de peso, temperatura corpórea e habituação em situações de stress. Os animais mutantes apresentaram déficits de aprendizagem e menor

sensibilidade à dor (GERLAI, 2002). A presença dos receptores mGluR8 na amígdala e outras áreas do hipotálamo justifica esse comportamento no animal mutante.

A diferença entre sexo e idade à resposta para diferentes estímulos para ansiedade e cognição com enfoque na função do receptor mGluR8, foi estudada por Duvoisin et al., 2010. Em camundongos machos e fêmeas de meia idade foi observado índice maior de ansiedade e déficit na aprendizagem do que em animais jovens. Em testes de campo aberto, fêmeas e machos mutantes sem o receptor mGluR8 mostraram aumento nos índices de ansiedade. Os resultados desse estudo sugerem que, exista uma profunda relação entre retenção de memória e cognição nos testes de nado forçado em ratos que são deficientes de mGluR8. Os efeitos terapêuticos de mGluR8 para modulação dos níveis de ansiedade devem ser considerados.

A utilização de agonistas específicos para o grupo III de mGluRs definiu uma grande afinidade desses receptores por GABA e glutamato. A liberação do neurotransmissor foi menor quando houve injeção do agonista específico para mGluR8, demonstrando que este participa dos eventos excitatórios e inibitórios e, também é um grande indicador do controle sobre a presença demasiada do glutamato em sinapses (PANATIER, et al., 2004). Essa propriedade de alta afinidade pelo GLU pode ajudar no controle da excitocidade causada pelo excesso do mesmo, como feedback negativo.

Os hormônios como: liberador do hormônio de crescimento (GHRH), estimulante da tireóide (TSH), liberador de corticotrofina (CRH) e adenocorticotrófico (ACTH), atuam por receptores acoplados a proteína Gi e Gs, com aumento de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). Esses mecanismos fisiológicos são os mesmo que os exercidos pelos receptores metabotrópicos. A somastatina atua via receptores ligados a proteína Gi com diminuição de AMPc (ZIGMOND, et al., 1999), característica do receptor mGluR8. Podemos especular que a presença do receptor no NARC esteja envolvida no processo de liberação desse hormônio, ou que a presença de receptores metabotrópicos para glutamato esteja envolvida na liberação desses hormônios.

Em 2005 Duvoisin e colaboradores demonstraram que ratos deficientes de mGluR8 são maiores do que seus controles, durante a mesma idade. Observaram ainda que, essa diferença não ocorre por ingestão demasiada de alimentos ou pela quantidade de dieta rica em gordura. Os animais sem mGluR8 apresentaram pequena resistência a insulina que, foi

atribuída ao sobrepeso. Não houve conclusão se as diferenças fenotípicas entre os animais ocorreu por uma causa neural, ou se são conseqüências de variadas alterações no desenvolvimento da transmissão sináptica que envolve mGluR8. A resistência a insulina pode indicar, que em animais sem o receptor mGluR8, a produção desse hormônio e leptina pode ser diminuída. Levando-se a acreditar que o receptor possa desenvolver alguma ação fisiológica no NARC. Núcleo esse, que é influenciado, pelas concentrações de leptina e dessa forma a produção de neuropeptídeos importantes para a regulação da ingestão alimentar e controle de peso corpóreo.

A literatura sobre a localização exata, fisiologia e implicações em tratamentos contra doenças no sistema nervoso central do mGluR8 é escassa. Dessa maneira esta pesquisa fornece mais um dado morfológico da localização do receptor em uma área pouco estudada. O enfoque da maioria dos trabalhos que envolvem o receptor mGluR8 é o seu papel nas células da retina, muitas vezes as vias de dor e medo na amígdala e participação nos eventos de memória no hipocampo.

A técnica utilizada permite a visualização de um dado morfológico, sendo assim, serão necessários estudos mais aprofundados para verificar o real comportamento do receptor no NARC sob influência da dieta estabelecida. Para demonstrar com clareza o papel fisiológico dos receptores metabotrópicos para glutamato no núcleo arqueado é necessário uma extensa revisão bibliográfica sobre sua fisiologia, utilização de técnicas de biologia molecular como *western blotting* que quantifica a proteína na área estudada, microscopia eletrônica para localização do receptor nos neurônios pré e pós sinápticos, assim como, um estudo mais aprofundado da identificação de todos os receptores metabotrópicos e ionotrópicos no núcleo arqueado por meio da técnica de imunohistoquímica.

Conclusões

Pelo uso da técnica de imunohistoquímica foi evidenciada a presença do receptor mGluR8 em todos os níveis do núcleo arqueado do hipotálamo (NARC) de ratos Wistar, sendo que a ingestão de dietas adicionadas de MSG (1%, 2,5% e 5%) não modificou o número de células reativas ao mGluR8, nem induziu variações no ganho de peso corpóreo dos animais, decorrente da ingestão oral de MSG.

Referências Bibliográficas

- AWAD-GRANKO, H.;CONN, P.J..Activation of groups I or III metabotropic glutamate receptors inhibits excitatory transmission in the rat subthalamic nucleus. **Neuropharmacology**, 41: 32-41, 2001.
- BERNE, R. M.; LEVY M.N. **Fisiologia**, 4ª. ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.
- BLACHER, F.; BOUTRY,C.; BOS. C.; TOMÉ, D.. Metabolism and functions of l- glutamate in the epithelial cells of the small and large intestines. **Am. J. Clin. Nutr.**, 90 (suppl): 814S-821S, 2009
- BLOCH, B.; LING, N.; BENOIT, R.;WEHREBERG, WB.; GUILLEMEN, R.. Specific depletion of immunoreactive growth hormone-releasing factor by monosodium glutamate in rat median eminence. **Nature**, 307: 272-273, 1984.
- BODGANOV, M.B.; TJURMINA, O.A.; WURTMAN, R. J.. Consumption of a high dietary dose of monosodium glutamate fails to affect extracellular glutamate levels in the hypothalamic arcuate nucleus of adult rats. **Brain Research**, 736: 76-81, 1996.
- CAMODECA, N.; BREAKWELL,N.A.; ROWAN, M.J.; ANWYL, R.. Induction of LTD by activation of group I mGluR in the dentate gyrus in vitro. **Neuropharmacology**, 38:1597-1606,1999.
- CAMPOS, K.E.; VOLPATO, G.T.; CALDERON, M.V.C.; DAMASCENO, R.; DAMASCENO, D.C.. Effect of obesity on rat reproduction and the development of their adult offspring. **Brazilian Journal of Medical and Biol. Research**, 41: 122-125, 2008.
- CARUSO, C.; DURAND, D; WATANOBE, H.; LASAGA, M.. NMDA and group I metabotropic glutamate receptors activation modulates substance P release from the arcuate nucleus and median eminence. **Neuroscience Letters** 303: 60-64, 2006.
- CINGOLANI, H.E.; HOUSSAY, A. B.. **Fisiologia Humana de Houssay**. 7ªedição. Editora Artmed, Porto Alegre, 2004.

- CONN, P. J. & PINN, JEAN-PHILLIPE. Pharmacology and Functions of metabotropic glutamate receptors. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 37: 205-37, 1997.
- CONN, P.J.; BATTAGLIA. G.; MARINO. M.J.; NICOLETTI, F.. Metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit. **Nature reviews**, 6: 787-798, 2005.
- DAIKHIN, Y.; YUDKOFF, M.. Compartmentation of Brain Glutamate Metabolism in Neurons and glia. **Journal of Nutrition**; 130: 1026-1031, 2000.
- DINIZ, Y.S.; FERNANDES, A.A.H.; CAMPOS, K.C.; MANI, F.; RIBAS, B.; NOVELLI, E.L.B.. Toxicity of hipercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting hepatic tissue. **Food and Chemical Toxicology**, 42: 313-319, 2004.
- DUVOISIN, R.M.; ZHANG, C.; RAMONELL, K.. A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bul. **Journal of Neuroscience**, 15:3075-3083,1995.
- DUVOISIN, R.M.; ZHANG, C.; PFANKUCH, T.; O'CONNOR, H.; GAYET-PRIMO, J.; QURASHI, S.; RABER, J.. Increased measures of anxiety and weight gain in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR8. **Eur. J. Neurosci.**, 22(2): 425-436, 2005.
- DUVOISIN, R.M.; VILLASANA, L.; PFANKUCH, T.; RABER, J.. Sex-dependent cognitive phenotype of mice lacking mGluR8. **Behavioural Brain Research**, 209(1): 21-26, 2010.
- FERNANDEZ-TRESGUERRES HERNANDEZ, J.A.. Effect of monosodium glutamate given orally on appetite control (a new theory for the obesity epidemic). **An. R. Acad. Nac. (Madrid)**, 122(2): 341-355, 2005.
- FERRAGUTTI, F.; SHIGEMOTTO, R.. Metabotropic glutamate receptors. **Cell Tissue Res**, 326: 483–504, 2006.
- GERLAI, R.; ADAMS, B.; FITCH, T.; CHANCY, S.; BAEZ, M.. Performance deficits of mGluR8 knockout mice in learning tasks: the effects of null mutation and the background genotype. **Neuropharmacology**, 43: 235-249, 2002.

- HAAK, L.L.; ALBERS, H.E.; MINTZ, E.M.. Modulation of photic response by the metabotropic glutamate receptor agonist t-ACPD. **Brain Research Bulletin**, 71:97-100, 2006.
- HAWKINS, R. A.. The blood-brain barrier and glutamate. **Am. J. Clin. Nutr.**, 90(supp): 867S-874S, 2009.
- HERMAUSSEM, M.; GARCÍA, AP.; SUNDER, M.; VOIGT, M.; SALAZAR, V.; TRESGUERRES, JAF.. Obesity, voracity, and short stature: the impact of glutamate on the regulation of appetite. **European Journal of Clinical Nutrition**, 1-7, 2005.
- 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 Biol. Research**, 30: 671-674, 1997.
- IGLESIAS, I.; LÉON, D.; RUIZ, M.A.; ALBASANZ, J.L.; MARTÍN, M.. Chronic intake of caffeine during gestation down regulates metabotropic glutamate receptors in maternal fetal rat heart. **Amino Acids**, 30: 257-266, 2006.
- IGIS. International Glutamate Information Service – Glutamate and Taste. **In**: <<http://www.glutamate.org>>. Acesso em: 12 de janeiro de 2011.
- IWASE, M.; ICHIKAWA, K.; TASHIRO, K.; IINO, K.; SHINOHARA, N.; IBAYASHI, S.; YOSHINARI, M.; FUJISHIMA, M.. Effects of monosodium glutamate-induced obesity in spontaneously hypertensive rats vs. Wistar Kyoto rats: Serum leptin and blood flow to brown adipose tissue. **Hypertens. Res.**, 23: 503-510, 2000.
- JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. L-glutamic acid and its ammonium, calcium, monosodium and potassium salts. **In** Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. New York, Cambridge University Press, 1988: p.97-161.
- KONDOH, T.; MALLICK, H. N.; TORRI, K.. Activation of the gut-brain axis by dietary glutamate and physiologic significance in energy homeostasis. **Am. J. Clin. Nutr.**, 90 (supp): 832S-837S, 2009.

- KÖHR, G.. NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. **Cell Tissues Res.**, 326: 439-446, 2006.
- KOULEN, P.; BRANDSTATTER, J.H.. Pre-and postsynaptic sites of action of mGluR8a in the mammalian retina. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, 43: 1933-1940, 2002.
- LARZABAL, A.; LOSADA, J.; MATEOS, J. M.; BENITEZ, R.; GARMELLA, I.J.; KUNH, R.; GRANDES,P.; SARRIA,R.. Distribution of the group II metabotropic glutamate receptors (mGluR2/3) in the enteric nervous system of the rat. **Neuroscience Letters**, 276: 91-94, 1999.
- LUNDY-EKMAN, L.. **Neurociência Fundamentos para a reabilitação**. 2ª edição. Eslevier, Rio de Janeiro. 2004.
- MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional**. 2ª edição, Atheneu, São Paulo, 2005.
- MELCHIORRI, D.; CAPPUCIO, I.; CICERONI C.; SPENSANTT, D.; MOSILLO, P.; SARICHELOU, I.; SALE, P.; NICOLETTI, F..Metabotropic glutamate receptors in stem cell/progenitors cells. **Neuropharmacology**, 57: 473-480, 2007.
- MICHAELIS, E.K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. **Prog. Neurobiol.**, 54: 369-415, 1998.
- MOGHADDAM, B.; Targeting metabotropic glutamate receptors for treatment of the cognitive symptoms of schizophrenia. **Psychopharmacology**, 174: 39-44, 2004
- 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**, 193: 45-48, 1995.
- NAIE, K.; TSANOV, M.; MANAHAN-VAUGHAN, D.. Group I metabotropic glutamate receptors enable two distinct forms of long-term depression in the rat dentate gyrus *in vivo*. **European Journal of Neuroscience**, 25: 3264-3275, 2007.

- NEALE, S.A.; GARTHWAITE, J.; BATCHELOR, A.M.. Metabotropic glutamate receptor subtypes modulating neurotransmission at parallel fiber–Purkinje cell synapses in rat cerebellum. **Neuropharmacology**, 41: 42-49, 2001.
- NICHOLLS, D. G.. **Proteins, Transmitters and Synapses**. Blackwelle, Oxford. 1994.
- OHNO, M.; WATANABE, S.. Concurrent blockade of hippocampal metabotropic glutamate and N-methyl-D-Aspartate receptors disrupts working memory in the rat. **Neuroscience**, (70)2: 303-311, 1996.
- OLIVEIRA, F.L.; BENUCCI, M.P.; SILVA, E.R.; PALDINO, B. BP.; GOUVEIA, E.M.. A lesão do núcleo arqueado anterior do hipotálamo pelo glutamato monossódico atrasa a puberdade, impede a ritmicidade do ciclo estral e induz obesidade na rata. **Federação das Sociedades de Biologia Experimental**, 2004.
- OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate.. **Science**. 164: 719-721, 1969.
- PANATIER, A.; POULAIN, D.A.; OLIET, S. H. R.. Regulation of transmitter release by high-affinity group III mGluRs in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus. **Neuropharmacology**, 47(3): 333-341, 2004.
- PARK, C.H.; CHOI, S.H.; PIAO, Y.; KIM, SEONG-HUN; LEE, YOUNG-JAE; KIM; HYE-SUN; JEONG, SUNG-JIN; RAH, JONG-CHEOL; SEO, JI-HEUI; LEE, JUN-HO; CHANG, KEUN-A; JUNG, YOUNG –JA; SUH, YOO-HUN. Glutamate and aspartate impair memory retention and damage hypothalamic neurons in adult mice. **Toxicology Letters** 115: 117–125, 2000.
- PENISI, P.; ROIS, J.L.; MENÉNDEZ, L.; VIDAL,S.. The neonatal treatment of rats with monosodium glutamate induces morphological changes in the subfornical organ. **Anat. Hist. Embryol.**, 33: 273-277, 2004.
- RACOTTA, R.; HERNADEZ-GARCIA, A.. Gender differences between the effects of monosodium glutamate on food intake in rats. **Physiol-Behav.**,46(2): 331-332,1989.
- SCANZIANI, M.; SALIN, P.A.; VOGT, K.E.; MALENKA. R.C.; NICOLL, R.A.. Use dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors. **Nature**, 385: 630-634, 1997.

- SAMUELS, A.. Monosodium l-glutamate : a Double-blind study and review. **Fd. Chem.. Toxic.**, 33(1): 69-62, 1995.
- SAMPAIO, L.F.S.; PAES DE CARVALHO, E.. Developmental regulation of group III metabotropic glutamate receptors modulating adenylate cyclase activity in the avian retina. **Neurochem. Int.**, 33: 367-374, 1998.
- SAN GABRIEL, A.M.; MAEKAWA, T.; UNEYAMA, H.; YOSIE, S.; TORII, K.. mGluR1 in the fundic glands of rat stomach. **FEBS Letters**, 581: 1119-1123, 2007.
- SANTANA, R.F.. **Expressão de subunidades do receptor de glutamato tipo ampa e de proteínas ligantes de cálcio nos núcleos da base durante o desenvolvimento pós-natal de pombos.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2007.
- SAUGAST, J.A.; KINZIE, J.M.; SHINOHARA, M.M.; SEGERSON, T.P.; WESTBROOK, G.L.. Cloning and expression of rat metabotropic glutamate receptor 8 reveals a distinct pharmacological profile. **Molecular Pharmacology**, 51: 199-125, 1997.
- SEGOVIA, G.; MOR, F.. Effects of the metabotropic glutamate receptor agonist, ACPD, on the extracellular concentrations of GABA and acetylcholine in the frontal cortex of the rat during the normal process of aging. **Brain Research Bulletin**, 65: 11-16, 2004.
- SHIGEMOTO, R.; KINOSHITA, A.; WADA, E.; NOMURA, S.; ONISHI, H.; TAKADA, M.. Differential Presynaptic Localization of Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes in the Rat Hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, 17(19): 7503–7522, 1997.
- SILVA, N.F.; PIRES, J.G.P.; CAMPOS, R.R.; FUTURO NETO, H.A.. Cardiovascular and respiratory responses to microinjection of L-glutamate into the caudal pressor area in conscious and anesthetized rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 34: 1603-1606, 2001.
- SMITH, Q.R.. Transport and other amino acids at the Blood-Brain Barrier. **J.Nutr.**, 130: 1016S-1022S, 2000.

- SNEAD, O.C.; BANERJEE, P.K.; BURNHAM, M.; HAMPSON, D.. Modulation of absence seizures by the GABA(A) receptor: a critical role for metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4). **Journal of Neuroscience**, 20: 6218-6224, 2000.
- SOARES, A.; SHOFFEN, J.P.F.; GOUVEIA, E.M.; NATAL, M.R.M.. Effects of the neonatal treatment with monosodium glutamate on myenteric neurons the intestine wall in the ileum of rats. **J. Gastroenterol.**, 41: 6674-680, 2006.
- SOUZA, F.; MARCHESINI, J.B.; CAMPOS, A.C.L.; MALAFAIA, O.; MONTEIRO, O.G.; RIBEIRO, F.B.; ALVES, H.F.P.; SIROTI, F.J.; MEISTER, H.; MATHIAS, P.C.F.. Efeito da vagatomia troncular em ratos injetados na fase neonatal com glutamato monossódico: estudo biométrico. **Acta. Cir. Bras.**, 16(1), jan/fev/mar., 2001.
- SWANSON, L.W.. **Brain maps: structure of the rat brain**. Elsevier, 2ºEd.1998.
- SWANSON, C. J.; BURES, M.;JOHNSON, M.P.; LINDEN, ANNI-MAIJA.;MONN, J.A.; DARRYLE, D.. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. **Natures Reviews**, 4: 131-144, 2005.
- TSUCHIHASHI, T.; LIU, Y.; KAGIYAMA, S.; MATSUMARA, K.; ABE, I.; FUJISHIMA, M.. Metabotropic glutamate receptor subtypes involved in cardiovascular regulation in the rostras ventrolateral medulla of rats. **Brain Research Bulletin**, 52(4): 279 – 283, 2000.
- WALKER, R. The significance of excursions above the ADI – case study: monosodium glutamate. **Regul.Toxicol. Pharmacol.**,30: S119-S121, 1999.
- YAMAMOTO, S.; TOMOE, M.; KAWAI, M.; UN EYAMA, H.. Can dietary supplementation of monosodium glutamate improve the health of the elderly? **Am. J. Clin. Nutr.**, 90(suppl): 844S-849S, 2009.
- YUNG, K.K.L.. Localization of ionotropic and metabotropic glutamate receptors in distinct neuronal elements of the rat substantia nigra. **Neurochem. Inter.**, 33: 313-326, 1998.
- ZIGMOND, M.J.; BLOOM, F.E.; LANDIS, S.C.; ROBERTS, J.L.; SQUIRE, L.R.. **Fundamental Neuroscience**, Academic Press, 1999.

CONCLUSÕES GERAIS

O aditivo alimentar glutamato monossódico (MSG) é objeto de diversos estudos, desde a sua fisiologia no metabolismo humano até suas reações adversas em cobaias de diferentes gêneros. A necessidade de esclarecimentos sobre o papel metabólico do MSG no organismo, bem como sua inocuidade, é muito discutida na comunidade científica. As divergências são grandes, porém, atualmente o seu consumo é considerado seguro pelos órgãos competentes (Food and Drug Administration e Organização Mundial da Saúde).

A utilização da técnica de imunohistoquímica possibilitou evidenciar a localização do receptor metabotrópico mGluR8 no núcleo arqueado do hipotálamo de ratos. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) do número de células contabilizadas da técnica de giemsa, nem na imunohistoquímica para mGluR8, entre os animais que receberam dieta acrescida de MSG nas concentrações 1%, 2,5% e 5% e os animais controle.

ANEXO I

**Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal
UNICAMP.**



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

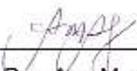
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1597-1, sobre "Imunodeteccção de receptores de glutamato no hipotálamo de ratos Wistar diabéticos e não diabéticos alimentados com glutamato monossódico", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Felix Guilherme Reyes Reyes / Thaís Fernanda Pinto de Almeida Freitas, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 15 de setembro de 2008.

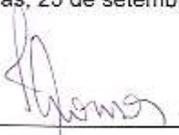
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1597-1, entitled "Evaluation receptors of glutamate in the rat hypothalamus diabetic and not diabetic fed with monossodium glutamate", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on September 15, 2008.

Campinas, 25 de setembro de 2008.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

ANEXO II

TRABALHO APRESENTADO EM EVENTO CIENTÍFICO

XXIV Reunião da Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE, 2009). Águas de Lindóia, 19 a 22 de agosto de 2009.

AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE RAÇÃO E GANHO DE PESO EM RATOS NÃO
DIABÉTICOS E DIABÉTICOS ALIMENTADOS COM GLUTAMATO
MONOSSÓDICO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.

¹FREITAS, T.F.P.A.; ¹MALULY, H.D.B.; ¹REYES, F.G.R.; ²AREAS, M.A.; ³TOLEDO, C.A.B.,
¹Departamento de Ciências de Alimentos, UNICAMP, ²Departamento de Fisiologia e
Biofísica, UNICAMP, Campinas/SP, ³Núcleo de Pesquisa em Neurociência, UNICID, São
Paulo/SP.

Objetivo: Existem relatos de que a administração de glutamato monossódico (MSG), por via oral ou intraperitoneal, pode causar danos no sistema nervoso central, especialmente em algumas áreas do hipotálamo, desencadeando desordens que afetam a regulação do apetite, parâmetros bioquímicos, entre outros. Os estudos que descrevem esses resultados utilizam doses muito altas de MSG, o que não reproduz o consumo normal na dieta do ser humano. Dessa maneira, os objetivos deste trabalho foram avaliar estatisticamente se há diferença no ganho de peso e o consumo de dieta em ratos alimentados com ração acrescida de MSG em diferentes concentrações.

Métodos e Resultados: Foram utilizados ratos *Wistar* machos, de 21 dias que foram divididos em grupos que receberam dieta comercial (n=12) e dieta contendo MSG nas seguintes concentrações: 1% (n=18), 2,5% (n=12) e 5% (n=12), com aproximadamente 70 dias, a diabetes foi induzida com estreptozotocina (50mg/Kg p.c.) e permaneceram mais 22 dias diabéticos até o sacrifício. Durante todo o período do experimento, os animais foram mantidos em gaiolas individuais com ração e água *ad libitum*. Os animais foram pesados semanalmente e para a análise estatística, foi utilizado o método ANOVA com nível de significância de $\alpha=5\%$. As médias em quilogramas de consumo de ração e desvio padrão durante todo o experimento para os grupos não diabéticos e diabéticos foram respectivamente $CND = 1,74/0,11$; $5\%ND=1,64/0,4$; $2,5\%ND=1,53/0,4$ e $1\%ND=1,27/0,46$ e $CD=1,21/0,47$; $5\%D=1,49/0,30$; $2,5\%D=1,40/0,75$ e $1\%D=1,08/0,17$ e as médias de peso foram de $CND=2,82/1,14$; $5\%ND=2,82/1,23$; $2,5\%ND=2,54/1,01$ e $1\%ND=2,45/0,94$, e $CD=2,89/1,19$; $5\%D=2,69/1,11$; $2,5\%D=2,73/1,01$ e $1\%D=2,46/1$.

Conclusão: Diante da análise estatística, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos tratados com MSG e os tratados com ração comercial, tanto para os animais diabéticos quanto para os não diabéticos. Dessa maneira, este trabalho mostrou que o consumo de MSG nas concentrações estabelecidas, não influenciou o consumo de dieta e ganho de peso dos animais.

¹FREITAS, T.F.P.A.; ¹MALULY, H.D.B.; ³TOLEDO, C.A.B.; ²AREAS, M.A.; ¹REYES, F.G.R.;

¹ Departamento de Ciências de Alimentos, UNICAMP, ² Departamento de Fisiologia e Biofísica, UNICAMP, Campinas/SP, ³ Núcleo de Pesquisa em Neurociência, UNICID, São Paulo/SP.

Introdução e Objetivos

Existem relatos de que a administração de glutamato monossódico (MSG), por via oral, pode causar danos no sistema nervoso central, especialmente em algumas áreas do hipotálamo, desencadeando desordens que afetam comportamentos relacionados com a ingestão alimentar, como regulação do apetite e parâmetros bioquímicos corpóreos (índices séricos de glicose, triglicérides, colesterol, hormônios, entre outros). Entretanto, os estudos que descrevem esses resultados utilizaram doses muito altas de MSG, o que não reproduz o consumo normal na dieta do ser humano. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram avaliar o consumo de ração e o ganho de peso em ratos diabéticos (D) e não diabéticos (ND) alimentados com dietas adicionadas de MSG em diferentes concentrações (0, 1%, 2,5% e 5%).

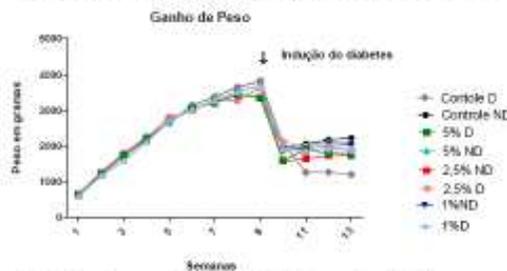


Fig. 1- Ganho de peso pelos animais diabéticos e não diabéticos, durante as 13 semanas de experimento. Controle ND (dieta comercial sem adição de MSG/não diabéticos); 1% ND (dieta acrescida de 1% de MSG/não diabéticos); 2,5% ND (dieta acrescida de 2,5% de MSG/não diabéticos); 5% ND (dieta acrescida de 5% de MSG/não diabéticos); Controle D (dieta comercial sem adição de MSG/animais diabéticos); 1% D (dieta acrescida de 1% de MSG/animais diabéticos); 2,5% D (dieta acrescida de 2,5% de MSG/animais diabéticos); 5% D (dieta acrescida de 5% de MSG/animais diabéticos).

Resultados e Conclusão

Na Figura 1 está apresentado o ganho de peso dos diferentes grupos de animais não diabéticos e diabéticos que consumiram dietas com diferentes níveis de MSG adicionado. Na Figura 2 apresenta-se o consumo de ração pelos mesmos grupos de animais, ao longo das 13 semanas de experimento. Não foi verificada diferença ($p < 0,05$) entre os grupos, tanto para o ganho de peso como para o consumo de ração. Assim, a adição de MSG as dietas oferecidas aos animais, em nível de até 5%, não influenciou o ganho de peso nem o consumo da ração, tanto nos ratos não diabéticos como nos diabéticos.

Agradecimentos:

Os autores agradecem o apoio recebido da CAPES, CNPq e do International Glutamate Technical Committee (IGTC).

Materiais e Métodos

Foram utilizados ratos Wistar machos, de 21 dias de idade, os quais foram divididos em grupos que receberam dieta comercial (n=12) e dieta acrescida de MSG nas seguintes concentrações: 1% (n=12), 2,5% (n=12) e 5% (n=12). Com aproximadamente 70 dias o diabetes foi induzido com estreptozotocina (50 mg/Kg p.c.) em metade dos animais de cada grupo e permaneceram mais 22 dias diabéticos até o sacrifício por perfusão intracardiaca sob anestesia. Durante todo o período do experimento, os animais foram mantidos em gaiolas individuais com ração e água *ad libitum*. Os animais foram pesados semanalmente para controle de peso, e o consumo da dieta foi calculado pela diferença do peso da ração oferecida por desperdício na bandeja.

Consumo de ração

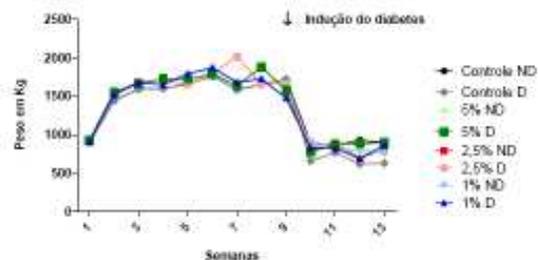


Fig. 2 - Consumo de dieta pelos animais diabéticos e não diabéticos, durante as 13 semanas de experimento. Controle ND (dieta comercial sem adição de MSG/não diabéticos); 1% ND (dieta acrescida de 1% de MSG/não diabéticos); 2,5% ND (dieta acrescida de 2,5% de MSG/não diabéticos); 5% ND (dieta acrescida de 5% de MSG/não diabéticos); Controle D (dieta comercial sem adição de MSG/animais diabéticos); 1% D (dieta acrescida de 1% de MSG/animais diabéticos); 2,5% D (animais diabéticos e dieta com 2,5% de MSG); 5% D (dieta acrescida de 5% de MSG/animais diabéticos).

Abstract

Some reports from the literature indicate that the oral administration of monosodium glutamate (MSG) can induce damages to the central nervous system, especially in some areas of the hypothalamus, causing disorders that affect the regulation of appetite and biochemical parameters, among others effects. The studies that describe those results use high doses of MSG, which does not reproduce the normal consumption of MSG, when it is used as a food additive in the human diet. Thus, the purpose of this study was to evaluate the food intake and weight gain by non-diabetic and diabetic rats fed with diets containing different levels of MSG (0, 1%, 2.5% and 5%). The results showed that the presence of MSG in the diets, at a level up to 5%, did not alter the diet consumption or the weight gain of the animals (non-diabetic and diabetic).

ANEXO III

TABELAS DE GANHO DE PESO E CONTAGEM CELULAR

Tabela 1. Média da evolução do ganho de peso de ratos Wistar alimentados, durante 90 dias, com dietas adicionadas de glutamato monossódico (MSG) nas concentrações de 0% (grupo controle), 1%, 2,5% e 5%; diferenças estatísticas para $p < 0,05$ (n=8).

Semanas	Controle		MSG 1%		MSG 2,5%		MSG 5%	
	Média (g)	DP						
1	71,3	11,6	59,4	10,2	68,8	10,9	55,0	8,5
2	115,6	15,7	100,6	12,7	108,8	13,6	96,3	11,9
3	156,3	15,8	138,1	12,8	145,6	14,3	134,4	14,7
4	199,4	15,9	180,0	11,0	176,9	16,5	176,3	18,3
5	237,5	17,9	211,9	15,8	216,9	17,1	218,8	15,5
6	256,3	19,4	234,4	15,9	238,8	23,4	246,9	17,3
7	279,4	22,9	272,5	17,1	258,8	19,8	288,8	18,7
8	317,5	20,0	312,5	17,1	296,9	19,8	321,3	22,6
9	334,4	26,4	300,6	14,3	322,5	17,7	330,0	22,0
10	341,9	32,9	310,0	17,7	328,8	36,3	340,6	15,0
11	361,9	34,2	333,8	22,6	354,4	38,7	364,4	17,8
12	365,6	35,1	349,4	22,1	367,5	38,4	375,6	20,3
13	390,6	35,8	365,6	23,8	376,9	46,1	390,0	18,9

Tabela 2. Média do ganho de peso total de ratos Wistar alimentados, durante 90 dias, com dietas adicionadas de glutamato monossódico (MSG) nas concentrações de 0% (grupo controle), 1%, 2,5% e 5%; diferenças estatísticas para $p < 0,05$ ($n=8$).

	Média Ganho de peso (g)	DP
Controle	319,4	31
MSG 1%	306,3	26,4
MSG 2,5%	308,1	44,1
MSG 5%	335	14,1

Tabela 3. Média e desvio padrão (DP) de células coradas com a técnica de giemsa nos cinco níveis do núcleo arqueado do hipotálamo (NARC) de ratos Wistar alimentados, durante 90 dias, com dietas adicionadas de glutamato monossódico (MSG) nas concentrações de 0% (grupo controle), 1%, 2,5% e 5%; diferenças estatísticas para $p < 0,05$ ($n=3$).

NARC	Controle		MSG 1%		MSG 2,5%		MSG 5%	
	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD
Nível 1	159,7	42,5	143,3	48,6	234,7	52,3	230,7	64,9
Nível 2	674,7	146,9	398,0	43,9	441,7	123,1	554,7	55,6
Nível 3	669,7	327,2	543,3	47,6	515,3	59,5	577,0	94,7
Nível 4	695,7	36,8	506,7	109,7	583,7	180,0	757,0	101,0
Nível 5	820,0	181,5	505,3	109,9	565,7	183,7	748,0	41,0

Tabela 4. Média e desvio padrão (DP) das células imunopositivas para mGluR8 nos cinco níveis do núcleo arqueado do hipotálamo (NARC) de ratos Wistar alimentados, durante 90 dias, com dietas adicionadas de glutamato monossódico (MSG) nas concentrações de 0% (grupo controle), 1%, 2,5% e 5%; diferenças estatísticas para $p < 0,05$ ($n=3$).

NARC	Controle		MSG 1%		MSG 2,5%		MSG 5%	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Nível 1	125,3	16,2	122,7	16,2	115,7	55,2	133,7	26,1
Nível 2	334,0	121,1	240,0	28,2	255,0	101,4	234,0	42,4
Nível 3	353,3	87,1	272,3	64,6	287,3	77,8	333,3	31,5
Nível 4	325,7	28,1	251,0	60,7	309,3	108,0	336,7	7,6
Nível 5	357,7	38,9	220,3	5,5	320,0	90,1	294,0	8,0