

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

**Avaliação de Parâmetros Bioquímicos e
Cardiovasculares em ratos *wistar*
diabéticos e não diabéticos alimentados
com glutamato monossódico**

Orientador: Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

Aluna: Hellen Dea Barros Maluly

*Tese apresentada ao Departamento de Ciência
de Alimentos da Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de doutorado.*

Campinas

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M299a Maluly, Hellen Dea Barros
Avaliação de parâmetros bioquímicos e cardiovasculares em ratos
Wistar diabéticos e não diabéticos alimentados com glutamato
monossódico / Hellen Dea Barros Maluly. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Felix Guillermo Reyes Reyes
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Glutamato monossódico. 2. Diabetes. 3. Ratos Wistar. 4.
Eletrocardiograma. I. Reyes Reyes, Felix, Guillermo. II.
Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Evaluation of biochemical and cardiovascular parameters in diabetic and non
diabetic Wistar rats fed with monosodium glutamate.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Monosodium glutamate, Diabetis, Wistar rats
Electrocardiogram

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Felix Guillermo Reyes Reyes

Dora Maria Grassi Kassisse

Joel Faintuch

Ligia Ajaime Azzalis

Silvia de Oliveira Santos Cazenave

Data da defesa: 18/02/2011

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

Erratas:

Capítulo 1:

Citações

Página 28: Heywood et al, 1977 por Heywood et al, 1973.

Página 28: Stegink et al, 1979 por Stegink et al, 1975

Página 38: Olney (1969) por Olney (1970)

Página 39: retirar Smith, 2000.

Página 46: Tabela 5 (coluna 5, linha 30): Reynolds et al, 1971 por Reynolds et al, 1979.

Página 46: Tabela 5 (coluna 5, linha 31): Heywood et al, 1972 por Heywood et al, 1979.

Referências bibliográficas

Incluir:

Daabees TT, Finkelstein MW, Stegink LD, Applebaum AE. Correlation of glutamate plus aspartate dose, plasma amino acid concentration and neuronal necrosis in infant mice. Food Chem Toxicol. 1985; 23(10):887-93.

Hazelton Laboratories (1969) Addendum to report of 1966 dated 18 July 1969.

Industrial Bio-Test. Unpublished report submitted to W. Underwood Company, 1973.

Raiten DJ, Talbot JM, Fisher KD, editors. Analysis of adverse reactions to monosodium glutamate (MSG). Federation of American Societies for Experimental Biology Publisher, American Institute of Nutrition; 1995: 1-119.

Reeds PJ, Burrin DG, Stoll B, Jahoor F. Intestinal glutamate metabolism. J Nutr. 2000;130 (4S Suppl): 978S-82S.

Stellar E, McElroy WD. Does Glutamic Acid Have Any Effect on Learning? Science. 1948;108(2802):281-3.

Yang WH, Drouin MA, Herbert M, Mao Y, Karsh J. The monosodium glutamate symptom complex: assessment in a double-blind placebocontrolled, randomized study. J Allergy Clin Immunol 1997;99:757-62.

Retirar:

Chaudhari N, Pereira E, Roper SD. Taste receptors for umami: the case for multiple receptors. Am J Clin Nutr. 2009; 90(3):738S-742S.

Food and Drug Research Laboratories. Teratologic evaluation of FDA 71-69 (monosodium glutamate) in mice, rats and rabbits. NTIS, PB-234-865, 1974a.

Food and Drug Research Laboratories. Teratologic evaluation of FDA 73-58 (monopotassium glutamate) in mice and rats. Unpublished report, 27, 1974b.

Go G, Nakamura FH, Rhoads GG, Dickinson LE. Long-term health effects of dietary monosodium glutamate. Hawaii Medical J. 1973; 32: 13-17.

Gottschewski GHM. Kann die Traegersubstanz von Wirkstoffen in Dragees eine teratogene Wirkung haben? Arzneimittel-Forsch 1967.; 17, 1100-1103.

Khera, K.S., Whitta, L.L., & Nera, E.A., 1970. Unpublished results of Research Laboratories, Food and Drug Directorate, Ottawa, Canada. Submitted to WHO in 1970.

Olney JW, Sharpe LG, Fergin RD. Glutamate-induced brain damage in infant primates. J. Neuropath. Exp Neurol. 1972, 31, 464-488.

Pradhan SN, Lynch JF Jr. Behavioural changes in adult rats treated with monosodium glutamate in the neonatal stage. Arch. Int. Pharmacodyn Ther. 1972; 197, 301-304.

Reynolds WA, Lemkey-Johnston N, Filer LJ Jr, Pitkin R M. Monosodium glutamate: absence of hypothalamic lesions after ingestion by newborn primates. Science 1971; 172, 1342-1344.

Rodwell W, Kennelly PJ. Aminoácidos e peptídeos. In: Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P.; Rodwell, V. W. Haper: Bioquímica Ilustrada. 26 ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2006.

Stegink LD, Filer LJ Jr, Baker GL. Monosodium glutamate: effect on plasma and breast milk amino acid levels in lactating women. *Proc Soc Expt Biol Med*. 1972; 140, 836-841.

Stegink LD, Pitkin RM, Reynolds WA, Filer LJ Jr, Boaz DP, Brummel MC. Placental transfer of glutamate and its metabolites in the primate. *Am J Obstet Gynecol*. 1975; 122(1):70-8.

Tamano S, Tanaka H, Kawabe M, Asakawa E, Sano M, Shioya S, Shirai T, Fukushima S. No enhancing effects of calcium/magnesium salts of L-glutamate and L-ascorbate on tumor development in a rat medium-term multiorgan carcinogenesis bioassay. *J Toxicol Environ Health* 1993; 39(1), 43-58.

Erros de impressão

Página 35:

Tabela 4 (coluna 4, 2ª linha): Nenhum efeito foi verificado com relação ao crescimento, ciclo estrogênico, maturação sexual ou anormalidades em órgãos em nenhuma das gerações.

Tabela 4 (coluna 4, 5ª linha): Nenhum efeito adverso foi verificado com relação ao ganho de peso, consumo e ciclo sexual de fêmeas.

Capítulo 2:

Página 67

Figure 1: Oxidative enzymes evaluation.

Table 1: Oxidative stress parameters determined in the blood of the rats for a period of 13 weeks (P<0,05): non-diabetic group (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%), diabetic group (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%).

<i>Parameters</i>	C	C-MSG 1%	C-MSG2.5%	C-MSG5%	D	D-MSG 1%	D-MSG2.5%	D-MSG5%
<i>Catalase</i> (arbitrary units/ μ g protein.min)	0.025 $\pm$ 0.004	0.029 $\pm$ 0.004	0.026 $\pm$ 0.005	0.026 $\pm$ 0.06	0.022 $\pm$ 0.006	0.014 $\pm$ 0.002	0.014 $\pm$ 0.001	0.021 $\pm$ 0.006
<i>Superoxide dismutase</i> (arbitrary units / μ g protein)	71.22 $\pm$ 14.70	51.64 $\pm$ 23.71	58.64 $\pm$ 16.70	67.07 $\pm$ 11.21	18.76 $\pm$ 1.94	9.97 $\pm$ 2.30 ^a	8.17 $\pm$ 3.98 ^a	12.22 $\pm$ 1.45 ^a
<i>Glutathione</i> (nmol/ μ g protein.min)	1.41 $\pm$ 0.17	1.33 $\pm$ 0.28	1.53 $\pm$ 0.34	1.63 $\pm$ 0.36	1.62 $\pm$ 0.07	1.46 $\pm$ 0.16	1.69 $\pm$ 0.31	1.67 $\pm$ 0.48

^aSignificant difference from group D

Este exemplar correspondente à redação final da tese: Avaliação de Parâmetros Bioquímicos e Cardiovasculares em ratos wistar diabéticos e não diabéticos alimentados com glutamato monossódico, defendida em ___/___/___ por Hellen Dea Barros Maluly, aprovada pela comissão julgadora em ___/___/___

**Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes
(Orientador)**

Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassisse

Prof. Dr. Joel Faintuch

Profa. Dra. Ligia Ajaime Azzalis

Profa. Dra. Silvia de Oliveira Santos Cazenave

Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento

Prof. Dr. Miguel Aracanzo Areas

Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família e a todos que me incentivaram para esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Felix G. R. Reyes

Ao Departamento de Ciência de Alimentos da FEA – Unicamp

Ao Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica – IB – Unicamp –

Prof. Dr. Miguel A. Áreas e Profa. Dra. Maria Cristina Marcondes

Ao Laboratório de Ensaio Biológicos do DEPAN – FEA – Unicamp – Suzana Correa

Ao Laboratório CBO – Oneida Vieira

Ao Laboratório de Patologia Clínica do HC – Unicamp – Profa. Dra. Nelci Fenaldi Höehr

Laboratório de Hematologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP – Profa. Dra.

Primavera Borelli

EPÍGRAFE

*“Toda verdade é simples.”- Não é isso uma dupla mentira?
Crepúsculo dos Ídolos, Friedrich Nietzsche (1844-1900)*

ÍNDICE

RESUMO GERAL	14
SUMMARY	15
INTRODUÇÃO GERAL	16
CAPÍTULO 1:Glutamato monossódico - Aspectos toxicológicos	21
Introdução	22
1. Estudos de metabolismo e farmacocinética.....	24
1.1. Comportamento do glutamato no trato gastrointestinal.	24
1.2. Metabolismo do glutamato no fígado.....	25
1.3. Estudos de farmacocinética	27
2. Estudos de toxicidade	29
2.1. Exposição aguda por via oral.....	29
2.2. Exposição subcrônica por via oral	30
2.3. Toxicidade crônica e carcinogenicidade.....	32
2.4. Estudos de reprodução e teratogenicidade.....	34
2.5. Mutagenicidade	38
2.6. Neurotoxicidade.....	38
3. O MSG e a Síndrome do Restaurante Chinês.....	48
Considerações finais	50
Referências bibliográficas	52
CAPÍTULO 2: Avaliação de parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos em ratos Wistar não diabéticos e diabéticos alimentados com glutamato monossódico....	61
Abstract.....	62
1. Introduction	63
2. Material and Methods	65
2.1. Biological assay	65
2.2. Biochemical analyses	66
2.3. Amino acid analysis.....	66
2.4. Hematological analyses	68
2.5. Oxidative enzymes evaluations	68
2.6. Morfological evalulation	68
2.7. Statistics.....	68
3. Results	69
4. Discussion.....	79
5. Conclusions	82
References	82

CAPÍTULO 3: Avaliação eletrocardiográfica de ratos Wistar diabéticos e não diabéticos alimentados com glutamato monossódico	88
Abstract.....	89
Introduction	90
Material and Methods	92
<i>Animals</i>	92
<i>Electrocardiogram</i>	94
<i>Morphological evaluation</i>	95
<i>Statistics</i>	95
Results and Discussion	95
Conclusions	103
References	103
CONCLUSÕES GERAIS	107
ANEXO I: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	108
ANEXO II: TRABALHOS APRESENTADOS NO XV CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Glutamato monossódico: Aspectos toxicológicos

Tabela 1: Valores de DL50 para MSG e ácido glutâmico, administrados por via oral, em várias espécies.....	30
Tabela 2: Efeitos adversos verificados após exposição subcrônica ao MSG, por via oral, em várias espécies.....	31
Tabela 3: Efeitos adversos verificados após exposição crônica, por via oral, ao MSG em várias espécies.....	33
Tabela 4: Estudos dos efeitos do MSG sobre a reprodução e teratogenicidade realizados em várias espécies.....	35
Tabela 5: Estudos de neurotoxicidade relacionados à ingestão de MSG realizados em várias espécies.....	40

CAPÍTULO 2: Avaliação de parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos em ratos Wistar não diabéticos e diabéticos alimentados com glutamato monossódico

Tabela 1: Oxidative stress parameters determined in the blood of the rats for a period of 13 weeks ($P < 0,05$): non-diabetic group (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%), diabetic group (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%).....	73
Tabela 2: Hematological parameters determined in the blood of the rats for a period of 13 weeks ($P < 0,05$): non-diabetic group (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%); diabetic group (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%).....	78

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: Glutamato monossódico: Aspectos toxicológicos

- Figura 1:** Estruturas moleculares do ácido glutâmico e do glutamato monossódico..... **22**
- Figura 2:** Rotas metabólicas do MSG no organismo (MSG: glutamato monossódico; GLU: ácido glutâmico; GDH: glutamato desidrogenase; CO₂: dióxido de carbono; ATP: adenosina trifosfato; NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo; NH₄⁺: amônio). **26**

CAPÍTULO 2: Avaliação de parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos em ratos Wistar não diabéticos e diabéticos alimentados com glutamato monossódico

- Figure 1:** The experimental protocol used in this study..... **67**
- Figure 2:** Body weight gain and diet consumption determined in the non-diabetic (C group) and diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%). diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%) and diabetic 5.0% MSG (D-MSG..... **69**
- Figure 3:** Free glutamate in serum determined in the non-diabetic (C group) and diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%), diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%) and diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%)..... **70**
- Figure 4:** Blood glycemia determined in the non-diabetic (C group) and diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%). diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%) and diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%)..... **71**

- Figure 5:** Triacylglycerol (I), total cholesterol (II), VLDL (III) and HDL (IV) determined in the non-diabetic (C group) and diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%), diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%) and diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%)..... **72**
- Figure 6:** Photomicrograph (X40) of liver cross sections from non-diabetic (C group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%) and non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%)], stained with HE. Observe the whole hepatocytes with one or two nuclei (a), normal cytoplasm with no granularity or K  pffer cells (b) located between the hepatocytes and sinusoids (c). Lymphocytic infiltration was not observed..... **74**
- Figure 7:** Photomicrograph (X40) of liver cross sections from diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%) and diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%)], stained with HE. Observe the whole hepatocytes with lipid inclusions in the cytoplasm (a). Lymphocytic infiltration was not observed. **75**
- Figure 8:** Photomicrograph (X40) of left kidney cross sections from non-diabetic (C group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%) and non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%)], stained with HE. Bowman’s capsule with the capillaries forming a whole glomerulus (a). Proximal convoluted tubules are more numerous with narrow lumens and an epithelium with a brush-like border (b). Fewer distal convoluted tubules with slightly larger lumen and an epithelium showing no apical differentiation (c). Presence of blood capillaries (d)..... **76**
- Figure 9:** Photomicrograph (X40) of left kidney cross sections from diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%), diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%), stained with HE. Bowman’s capsule with the capillaries forming a whole glomerulus (a). Proximal convoluted tubules are more numerous with narrow lumens and an epithelium with a brush-like border (b). Fewer distal convoluted tubules with slightly larger lumen and an epithelium showing no apical differentiation (c). Presence of blood capillaries (d)..... **77**

CAPÍTULO 3: Avaliação eletrocardiográfica de ratos Wistar diabéticos e não diabéticos alimentados com glutamato monossódico

Figure 1	The experimental protocol.....	94
Figure 2.	Body weight gain (I) and diet consumption (II) in the non-diabetic (C group) and diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: non-diabetic control ©, non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%), diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%) and diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%).....	96
Figure 3:	Heart rate (BPM) in the non-diabetic (C group) and diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%), diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%) and diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%).....	97
Figure 4:	P wave (I) and PR interval (II) amplitude in the non-diabetic (C group) and diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%), diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%) and diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%).....	98
Figure 5:	QRS complex (I), QT interval (II) and QTc interval (III) in the non-diabetic (C group) and diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%), diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%) and diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%).....	100

Figure 6: Photomicrograph of cross-sections of the left ventricle determined in the non-diabetic (C group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG. The hearts from non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%) and non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%) rats were stained with HE. Irregular nuclei in the cell center (a) and spaces between the cardiac fibers (b), both typical of a normal heart, were found in all groups. Nuclei located outside the cardiac fibers belong to endothelial cells and fibroblasts (c). Intercalated disks mark the junctions between the cardiomyocytes..... **101**

Figure 7: Photomicrograph of cross-sections of the left ventricle from diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: The hearts from diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%), and diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%) rats were stained with HE. Irregular nuclei in the cell center (a) and spaces between the cardiac fibers (b), both typical of a normal heart, were found in all groups. Nuclei located outside the cardiac fibers belong to endothelial cells and fibroblasts (c). Intercalated disks mark the junctions between the cardiomyocytes..... **102**

RESUMO GERAL

Tem sido relatado que a administração de glutamato monossódico (MSG) por via parenteral e oral possui um efeito lesivo sobre o núcleo arqueado do hipotálamo provocando alterações na regulação do apetite e, como consequência, obesidade e distúrbios relacionados à síndrome metabólica, que são caracterizados por alterações no metabolismo de carboidratos (resistência à glicose e insulina), dislipidemia e doença cardiovascular. Este estudo teve como objetivo avaliar possíveis alterações metabólicas e cardiovasculares quando da exposição oral ao MSG em níveis de até 5,0% na dieta. O estudo foi realizado com ratos diabéticos e não diabéticos. A utilização de animais diabéticos se justifica por serem susceptíveis a indução de possíveis distúrbios metabólicos. Foi avaliado o perfil metabólico característico da condição diabética, incluindo eletrocardiograma, testes bioquímicos, determinação de aminoácidos livres no soro dos animais e a possível alteração histológica de órgãos que são afetados pela condição diabética (fígado, rins e coração). Concluiu-se que o uso de MSG na concentração de até 5,0% na dieta, não alterou os parâmetros estudados, tanto nos animais não diabéticos, como nos diabéticos. As alterações observadas em animais diabéticos refletiram aos distúrbios característicos desta enfermidade, independente da adição de MSG na dieta.

SUMMARY

It has been reported that the parenteral or oral administration of monosodium glutamate (MSG) has a deleterious effect on the arcuate nucleus of the hypothalamus, inducing alterations in the control of appetite that can lead to obesity and disorders related to the metabolic syndrome, such as alterations in carbohydrate metabolism (glucose and insulin resistance), dyslipidemia and cardiovascular disease. This study aimed to evaluate possible metabolic and cardiovascular alterations as a consequence to oral exposure to MSG at levels up to 5.0% in the diet. The study was carried out using diabetic and non-diabetic rats, the use of diabetic animals being justified by their susceptibility to the induction of possible metabolic disorders. The metabolic profile characteristic of the diabetic condition was evaluated, including electrocardiogram, biochemical tests, determination of amino acids in the serum and the possible histological alteration in the organs that are affected by this condition (liver, kidneys and heart). In conclusion, the use of MSG at levels up to 5.0% in the diet did not change the parameters studied in both: non diabetic and diabetic animals. The alterations observed in the diabetic animals reflected the metabolic changes characteristic of this disease, regardless the addition of MSG to the diet.

INTRODUÇÃO GERAL

O ácido glutâmico é um aminoácido não essencial presente nos alimentos na forma livre ou ligado a proteínas e o glutamato monossódico (MSG), o sal deste aminoácido, é um aditivo alimentar adicionado a vários alimentos como, por exemplo, snack, sopas, molhos, entre outros, com a função de realçador de sabor (Garattini, 2000). A ingestão média de glutamato foi avaliada em diferentes regiões: nos países da União Européia é de 0,3-0,5 g/dia e nos países asiáticos é de 1,2-1,7 g/dia (Beyreuther et al, 2006).

Como resultado da avaliação toxicológica, o Comitê misto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares e Contaminantes (JECFA, 1988) e agências de regulamentação como o Comitê Científico para Alimentos da Comunidade Européia (SCF, 1995) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2001) consideram o MSG um aditivo alimentar de uso seguro, sendo que o Agência Regulatória para Alimentos, Medicamentos e Cosméticos dos Estados Unidos da América (US FDA, 2006) o considera como ingrediente, também de uso seguro.

Entretanto, recentemente, foi relatado que patologias como obesidade, voracidade e deficiência na produção de hormônio de crescimento poderiam estar associadas a ingestão de MSG através da dieta. Segundo os autores, o MSG poderia provocar hiperglutamatemia crônica (aumento da concentração de glutamato na corrente sangüínea). Sendo o glutamato um neurotransmissor excitatório, ativo em um terço das sinapses do SNC (Watkins & Evans, 1981), o excesso deste neurotransmissor no espaço sináptico do hipotálamo, poderia provocar neurodegeneração devido à hiperexcitação produzida pela elevada concentração extracelular de glutamato, levando a morte neuronal. Esta lesão poderia romper a sinalização da cascata hipotalâmica da ação da leptina, causando hiperfagia, obesidade, hiperleptinemia e déficit de hormônio de crescimento (GH) (Hermanussen & Tresguerres, 2003; Hermanussen et al 2006). A leptina é um componente do complexo sistema fisiológico que regula o armazenamento, o equilíbrio e o uso de energia pelo organismo. Uma disfunção na produção desta proteína pode acarretar ganho ou perda de peso (Flier, 1998). Além do prejuízo na ação da leptina, a destruição dos neurônios do núcleo arqueado também provoca a queda na produção de hormônio de crescimento (GH) e do fator de crescimento ligado à insulina (IGF-I), por alterações na expressão gênica desses hormônios (Kovacs et al, 1995; 2000). A deficiência de GH tem várias características que incluem

mudanças na composição corporal (obesidade com predomínio de gordura visceral e redução na massa magra), alterações no metabolismo lipídico (aumento de colesterol total e LDL, redução de HDL e hipertrigliceridemia), no metabolismo glicídico (resistência insulínica) e doenças cardiovasculares, entre outras (Conceição et al, 2001).

Diniz et al (2004; 2005) e Collison et al (2008) relataram stress oxidativo e desordens metabólicas quando o MSG era injetado intraperitonealmente em ratos ou administrado através da dieta, e a ingestão de MSG também foi mencionada por He et al (2008) como sendo a responsável pelo aumento da incidência de obesidade na população chinesa.

O aumento da prevalência do excesso de peso e doenças cardiovasculares tem aumentado rapidamente em países em desenvolvimento, sendo que 65% da população adulta possui sobrepeso ou é obesa, incluindo a população japonesa (Arai et al, 2006) e chinesa (Hsiao et al, 2009), das quais foi verificado um aumento significativo destas patologias em nível mundial devido a modificações no estilo de vida e hábitos alimentares (Flegal et al, 2000; McLellan, 2002). Estes sintomas (excesso de peso e doença cardiovascular) associadas ao diabetes tipo II e dislipidemias caracterizam a Síndrome Metabólica (Eckel et al, 2005; Després & Lemieux, 2006). O diabetes é uma desordem metabólica caracterizada pelo aumento da glicose sanguínea, resultante de alterações no metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos devido à diminuição de secreção ou resistência periférica da insulina. Estas alterações aumentam a propensão ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e neuropatias, que apresentam uma das maiores causas de morte de pacientes (Paulson, 1997; Balkau et al, 2004). Cabe mencionar que o aumento de peso e a obesidade dependem de vários fatores, incluindo aspectos genéticos, metabólicos, comportamentais e ambientais (Stein & Colditz, 2005).

Por outro lado, estudos crônicos com macacos que receberam dietas adicionadas de MSG em níveis de, até 2,0 a 4,0g/kg p.c. não apresentaram aumento da ingestão alimentar, nem indução de obesidade (Newman et al, 1973). Também, estudos com suínos jovens indicaram que o glutamato é extensivamente oxidado no intestino, mesmo quando os animais receberam doses três a quatro vezes maiores do que aquelas normalmente ingeridas quando o MSG é utilizado como aditivo alimentar (Janeczko et al, 2007). Além disso, a quantidade de MSG adicionada nos alimentos é auto-limitante (0,3-0,9%) pelo fato de que

o aumento da quantidade de MSG adicionado diminui a palatabilidade dos alimentos (Yamaguchi & Ninomiya, 2000; Beyreuther et al, 2006).

O propósito da presente pesquisa foi o de avaliar, através de um estudo de exposição subcrônica em ratos Wistar, os efeitos da administração de MSG, através da dieta, em parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos, além da condução elétrica do coração. Para tanto, o MSG foi adicionado na dieta em níveis de 1,0, 2,5 e 5,0%, sendo utilizados animais não diabéticos e diabéticos (diabetes induzida por streptozotocina).

Referências

- Arai H, Yamamoto A, Matsuzawa Y, Saito Y, Yamada N, Oikawa S, Mabuchi H, Teramoto T, Sasaki J, Nakaya N, Itakura H, Ishikawa Y, Ouchi Y, Horibe H, Shirahashi N, Kita T. Prevalence of metabolic syndrome in the general Japanese population in 2000. *J. Atheroscler. Thromb.* 2006; 13(4), 202-208.
- Balkau B, Hu G, Qiao Q, Tuomilehto J, Borch-Johnsen K, Pyorala K. Prediction of the risk of cardiovascular mortality using a score that includes glucose as a risk factor. *Diabetologia* 2004; 47 (12): 2118-28.
- Beyreuther K, Biesalski HK, Fernstrom JD, Grimm P, Hammes WP, Heinemann U, Kempfski O, Stehle P, Steinhart H, Walker R. Consensus meeting: monosodium glutamate - an update. *Eur J Clin Nutr* 2007; 61(3): 304-13.
- BRASIL. Resolução - RDC n.1, de 2 de janeiro de 2001. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico que aprova o uso de aditivos com a função de realçadores de sabor, estabelecendo seus limites máximos para os alimentos. *Diário Oficial da União, Brasília*, 4 jan. 2001. Seção 1, p.21.
- Collison KS, Maqbool Z, Saleh SM, Inglis A, Makhoul NJ, Bakheet R, Al-Johi M, Al-Rabiah R, Zaidi MZ, Al-Mohanna FA. Effect of dietary monosodium glutamate on trans fat-induced nonalcoholic fatty liver disease. *J Lipid Res.* 2008: 11.
- Conceição FL, Bojensen A, Jorgensen JO, Christiansen JS. Growth hormone therapy in adults. *Frontiers in Neuroendocrinol.* 2001, 22:213-46.
- Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome, *Nature* 2006; 444 (7121), 881-887.

- Diniz YS, Faine LA, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GX, Burneiko RC, Cicogna AC, Novelli ELB. Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. *Nutrition* 2005; 21 (2005) 749–755
- Diniz YS, Fernandes AAH, Campos KE, Mani F, Ribas BO, Novelli ELB.. Toxicity of hypercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. *Food Chem. Toxicol.* 2004; 42, 313–319,
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365 (9468): 1415-28.
- European Parliament And Council. Directive n° 95/2/EC of 20 February 1995 on food additives other than colours and sweeteners. *Official Journal of the European Union.*
- FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. L-glutamotamic acid and its ammonium, calcium, monosodium and potassium salts. In *Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants*. New York, Cambridge University Press, 1988: 97-161.
- FDA (Food and Drug Administration) Database of Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Reviews, 2006.
- Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among U.S. adults, 1999–2000. *JAMA* 2002; 288: 1723–1727.
- Flier JS. What's in a name? In search of leptin's physiologic role. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1998; 83:1407-13.
- Garattini S. Glutamic acid, twenty years later. *J Nutr* 2000; 130(4S): 901S-9S.
- Hermanussen M, García AP, Sunder M, Voigt M, Salazar V, Tresguerres JAF.. Obesity, voracity, and short stature: the impact of glutamatotamate on the regulation of appetite. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60, 25–31.
- Hermanussen M, Tresguerres JAF. Does high glutamatotamate intake cause obesity? *J Pediatr Endocrinol Metab* 2003; 16, 965-968.
- Hsiao FC, Wu CZ, Hsieh CH, He CT, Hung YJ, Pei D. Chinese Metabolic Syndrome Risk Score *South Med J.* 2009; 9.
- Janeczko, M. J., Stoll, B., Chang, X., Guan, X., Burrin, D. G. Extensive gut metabolism limits the intestinal absorption of excessive supplemental dietary glutamatotamate loads in infant pigs. *J Nutr.* 2007; 137(11), 2384-90.

- Kovacs M, Fancsik A, Hrabovsky E, Mezo I, Teplan I, Flerko B. Effects to continuous and repetitive administration of a potent analog of GH-RH and GHS-R mRNA levels. (1–30)-NH₂ on the GH release in rats treated with monosodium glutamate. *Journal of Neuroendocrinol* 1995; 7: 703–712.
- Kovacs M, Kineman RD, Schally AV, Flerko B, Frohman LA. Increase in mRNA Concentrations of Pituitary Receptors for Growth Hormone-Releasing Hormone and Growth Hormone Secretagogues After Neonatal Monosodium Glutamate Treatment. *Journal of Neuroendocrinol* 2000; 12, 335–341.
- McLellan F. Obesity rising to alarming levels around the world. *Lancet* 2002; 359: 1412.
- Newman AJ, Heywood R, Palmer AK, Barry DH, Edwards FP, Worden AN. The administration of monosodium L-glutamate to neonatal and pregnant rhesus monkeys. *Toxicology*. 1973; 1(3):197-204.
- Paulson D. The diabetic heart is more sensitive to ischemic injury. *Cardiovasc Res* 1997; 34: 104-12.
- Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 89, 2522–2525.
- Watkins JC, Evans RH. Excitatory amino-acid transmitters. *Annual Rev Pharmacol Toxicol*. 1981; 21: 165-204.
- Yamaguchi S, Ninomiya K. Umami and food palatability. *J Nutr*. 2000; 130(4S Suppl): 921S-6S.

Capítulo 1

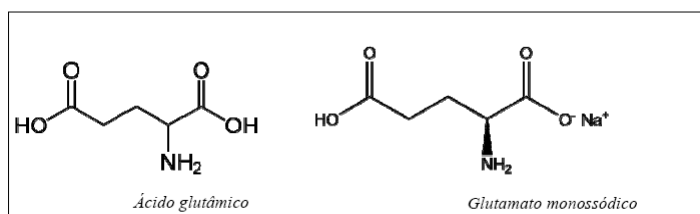
Glutamato monossódico:

Aspectos toxicológicos

Este capítulo será publicado no Livro: Glutamato monossódico – Aspectos químicos, biológicos e tecnológicos.

Introdução

O glutamato monossódico (MSG) é o sal sódico do aminoácido ácido glutâmico, cujas estruturas estão apresentadas na Figura 1.



Fonte: Wikimedia commons

Figura 1: Estruturas moleculares do ácido glutâmico e do glutamato monossódico.

O ácido glutâmico (ou glutamato na sua forma dissociada) é o principal composto responsável pelo chamado quinto gosto básico ou gosto *umami*, que em japonês quer dizer “delicioso”. Além do glutamato, outras moléculas podem induzir o gosto *umami*, como os nucleotídeos¹.

O glutamato livre, que não faz parte da estrutura de proteínas, pode estar presente nos alimentos naturalmente na sua composição, como nos queijos curados, tomate, peixes, molho de soja, ou ter sido adicionado como aditivo alimentar em alimentos processados na forma de MSG, em sopas prontas, molhos para salada, snacks, entre outros.

O MSG tem sido alvo de pesquisas científicas em diversas áreas, tanto nas relacionadas à tecnologia de alimentos quanto as que envolvem a saúde humana. Esse composto tem um uso amplamente disseminado na indústria de alimentos, assim como desempenha muitas funções fisiológicas no corpo humano. Além disso, é importante mencionar que foi confirmada a presença de receptores específicos para o glutamato na língua, estômago e intestino (Chaudhari et al, 1996 e 2001; Maruyama et al, 2006; Nijima, 2000).

Entretanto, a segurança do uso do MSG se tornou controversa a partir de publicações que o implicavam em efeitos adversos à saúde humana relacionados à sua utilização como aditivo alimentar, das quais podemos citar o “Complexo de Sintomas

¹ inosina-5'-monofosfato e guanosina-5'-monofosfato

Relacionados à Ingestão de Glutamato Monossódico” (conhecido como “Síndrome do Restaurante Chinês”) e “Obesidade Hipotalâmica” (Kwok, 1968; Monno *et al*, 1995; Hermanunssen *et al*, 2003). Como resultado, a utilização do MSG como aditivo alimentar tem sido objeto de avaliações quanto a sua segurança de uso por parte de diferentes Comitês Científicos e/ ou Agências de Regulamentação, como o Comitê misto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA²), o Comitê Científico para Alimentos da Comunidade Européia (SCF³), a Agência Regulatória para Alimentos, Medicamentos e Cosméticos dos Estados Unidos da América (US FDA⁴) e a Federação das Sociedades Americanas para Biologia Experimental (FASEB⁵).

Em 1970, na 14ª reunião, o JECFA avaliou diferentes sais do ácido glutâmico. O Comitê estabeleceu uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) de 0-120 mg/Kg de peso corpóreo (expressos como ácido L- glutâmico), concluindo ainda que essa IDA não se aplicava a crianças menores de 12 semanas de idade (FAO/WHO, 1971). Entretanto, em 1973, na 17ª reunião, a restrição de uso para os alimentos infantis foi retirada, após a verificação de que os efeitos adversos não eram observados em animais neonatos nos níveis recomendados para o uso de sais do ácido glutâmico como aditivo alimentar, mantendo-se o valor de IDA (FAO/WHO, 1974). No entanto, em avaliação posterior realizada em 1987, o Comitê estabeleceu para o MSG uma IDA “não especificada”. A denominação IDA “não especificada” significa que, tomando como base os dados disponíveis (químicos, bioquímicos, toxicológicos, etc.), 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, e pelas enunciadas em cada uma das avaliações, não se considera necessário o estabelecimento de uma IDA expressa em forma numérica. Desta forma, o MSG não apresenta risco à saúde, quando usado como aditivo alimentar (FAO/WHO, 1988).

Já nos Estados Unidos da América, em 1958, o FDA classificou o MSG como ingrediente Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS⁶). Essa classificação foi mantida em reavaliação dos dados disponíveis sobre MSG realizada em 1978 (FDA, 2006).

² - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

³ Scientific Committee for Food of the Commission of the European Communities

⁴ Food and Drug Administration

⁵ Federation of American Societies for Experimental Biology

⁶ Generally Recognized as Safe

Na década de 80, trabalhos publicados indicaram a indução de efeitos adversos relacionados ao MSG como aditivo alimentar, principalmente em alimentos infantis (Airoldi *et al*, 1980; Arbogast & Voogt, 1990). Consequentemente, o FDA recomendou que estudos adicionais fossem realizados para identificar a relação entre os efeitos adversos e o uso do MSG na alimentação de recém-nascidos e crianças (Anderson & Raiten, 1992).

A FASEB é um grupo de cientistas independentes que em 1992, após uma solicitação da FDA, realizou uma revisão completa sobre os dados científicos relacionados à segurança do MSG (FASEB, 1995). Em 1995, a FASEB concluiu que o MSG é seguro quando consumido como aditivo alimentar nos níveis tecnológicos recomendados (0,1-0,8 % no alimento) (FASEB, 1995; Beyreuther *et all*, 2007).

A SCF publicou em 1995 uma diretiva que estabeleceu um limite de uso para o MSG de 10g de MSG/kg de alimento, ou seja, 1,0%, quando utilizado individualmente (SCF, 1995). A última regulamentação publicada foi em 2008 e manteve as recomendações da diretiva (SCF, 2008).

De forma similar ao JECFA, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil) também estabelece uma IDA “não especificada” para o MSG.

Este capítulo apresenta uma revisão dos dados biológicos, aspectos bioquímicos relacionados ao metabolismo e farmacocinética, assim como estudos especiais (transporte transplacentário, barreira hematoencefálica) e de toxicidade (toxicidade aguda, subcrônica, crônica, teratogenicidade e carcinogenicidade) utilizados pelos diferentes Comitês e/ou Agências de Regulamentação para estabelecer o uso seguro do MSG como aditivo alimentar.

1. Estudos de metabolismo e farmacocinética

1.1. Comportamento do glutamato no trato gastrointestinal.

O glutamato é extensivamente metabolizado no trato gastrointestinal (Figura 2). Estudos indicam que no intestino de suínos (lactentes/até 20Kg e jovens/de 20 a 60Kg em fase de crescimento), assim como em humanos adultos, o MSG ou glutamato da dieta é metabolizado em até 95 % pelo efeito de primeira passagem (Reeds *et al*, 2000). Segundo estudo realizado por Janeczko (2007), que comparou a absorção do glutamato marcado com

carbono 13 (^{13}C -glutamato), a absorção do glutamato no estômago é maior do que no intestino.

A metabolização do glutamato começa pelo seu transporte por parte das células do estômago e do intestino, através do transportador de glutamato-aspartato 1 (GLAST-1), do transportador do glutamato (GLT-1), dos carregadores de aminoácidos excitatórios 1 (EAAC-1) e dos transportadores de aminoácidos excitatórios 4 e 5. Os EAAC-1 são os transportadores mais abundantes de glutamato no intestino delgado, mas não no estômago e intestino grosso. Já o GLAST-1 e o GLT-1 são expressos, na sua maior parte, no estômago. Quando o glutamato é absorvido pelas células do trato gastrointestinal, começa a ser catabolizado no citossol e na mitocôndria pela reação de transaminação, com atividade das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, aminotransferases de cadeia ramificada e glutamato desidrogenase (GDH), presentes no estômago, intestino e colo. O glutamato é metabolizado a α -cetoglutarato, o qual pode entrar no ciclo do ácido tricarboxílico com liberação de energia (ATP) e dióxido de carbono.

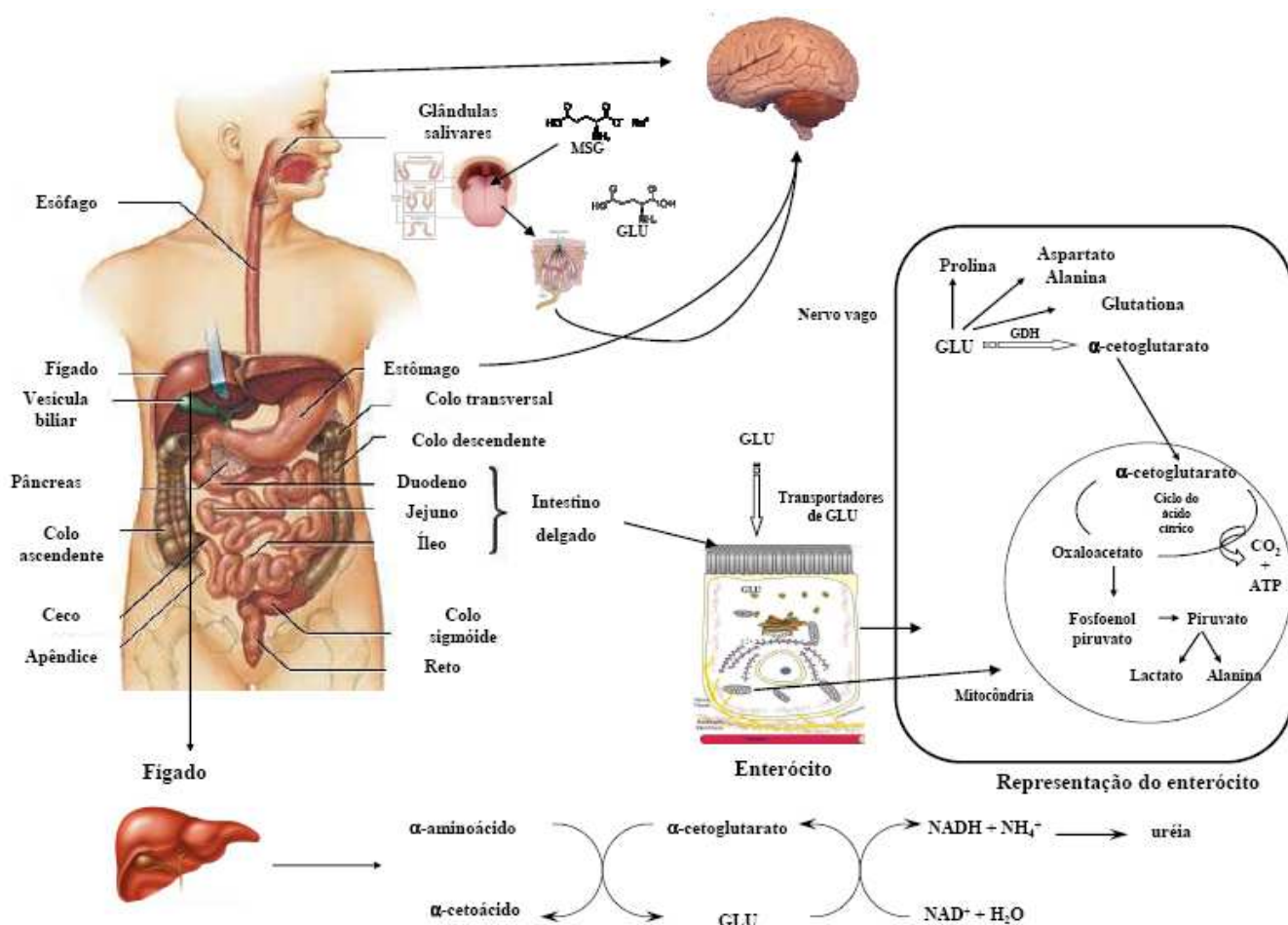
Os átomos de carbono do glutamato que não sofreram oxidação até a formação de dióxido de carbono são convertidos em lactato, alanina, prolina, citrulina, ornitina e arginina, que então entram na circulação portal. O nitrogênio derivado do metabolismo do glutamato é transformado em amônio e em outros aminoácidos, incluindo a citrulina, ornitina, prolina e arginina. Grande parte do nitrogênio destes compostos é convertido em ureia pelas células hepáticas, a qual é eliminada pela urina (Burrin & Stoll, 2009).

Essa é a rota pela qual ocorre a metabolização do glutamato consumido normalmente pela população, incluindo o MSG utilizado como aditivo alimentar. Ainda, num estudo recente realizado em suínos lactentes foi verificado que mesmo em doses de MSG quatro vezes maiores daquelas normalmente utilizadas como aditivo alimentar (até 0,8 %), o glutamato livre não é detectado no plasma (Haÿs *et al*, 2007).

1.2. Metabolismo do glutamato no fígado.

As rotas metabólicas do glutamato são complexas (Figura 2). Conforme mencionado anteriormente, o glutamato é extensivamente metabolizado no trato

gastrointestinal em dióxido de carbono, lactato, glutatona, glutamina, alanina e vários outros tipos de aminoácidos. O glutamato ingerido que não é metabolizado no trato gastrointestinal entra na circulação porta-hepática sendo, então, metabolizado no fígado. O esqueleto carbônico do glutamato pode ser oxidado através do ciclo de Krebs para gerar energia, e seu nitrogênio pode ser convertido em uréia, que é excretada na urina (Brosnan, 2000).



Fonte: figuras retiradas do site Google imagens [homepage da Internet]

Figura 2: Rotas metabólicas do MSG no organismo (MSG: glutamato monossódico; GLU: ácido glutâmico; GDH: glutamato desidrogenase; CO₂: dióxido de carbono; ATP: adenosina trifosfato; NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo; NH₄⁺: amônio).

Sempre que o metabolismo dos aminoácidos é discutido, deve-se separar o metabolismo do nitrogênio do metabolismo de esqueletos carbônicos. O metabolismo do nitrogênio é comum para muitos aminoácidos, porém para o esqueleto carbônico geralmente é distinto. O fato mais importante do metabolismo do nitrogênio é a detoxificação da uréia. O metabolismo de quase todos os aminoácidos é iniciado por aminotransferases, onde o glutamato e o α -cetoglutarato fazem parte de reação. Neste caso, a desaminação do glutamato promove a formação de α -cetoglutarato e amônio, pela enzima glutamato desidrogenase. O amônio produzido fornece um dos dois nitrogênios da uréia, pela carbamil fosfato sintetase 1. A aspartato aminotransferase transfere o grupo amino do glutamato para oxaloacetato para produzir ácido aspártico, que pode então introduzir o segundo nitrogênio no ciclo da uréia pela argininosuccinato sintetase. Um dos aspectos deste processo é que as enzimas aminotransferase e glutamato desidrogenase (GDH) são reversíveis, o que permite que o fígado ajuste a produção de amônio e ácido aspártico de acordo com as necessidades do ciclo da uréia. Assim, o glutamato além de produzir energia pela formação de α -cetoglutarato, com posterior entrada no ciclo de Krebs, também possui um papel importante na regulação do ciclo da ureia (Brosnan & Brosnan, 2009).

1.3. Estudos de farmacocinética

As etapas da farmacocinética do glutamato dependem da forma como ele se encontra no organismo (se na forma livre ou incorporado a proteínas) e como são influenciadas pelos componentes da dieta. Em consequência do rápido metabolismo do glutamato nas células da mucosa intestinal e no fígado, os seus níveis plasmáticos sistêmicos são baixos, mesmo após a ingestão de elevadas quantidades de proteína na dieta. Todavia, a administração oral de doses farmacologicamente elevadas de glutamato livre pode resultar na sua elevação nos níveis plasmáticos. Assim, o pico de concentração plasmática de glutamato irá depender da quantidade ingerida (Stegink et al, 1979).

A administração, por gavagem, de uma dose de MSG de 1,0 g/Kg p.c., em solução aquosa, resultou em um aumento significativo do glutamato plasmático em várias espécies estudadas. Os picos plasmáticos máximos de glutamato foram menores em macacos adultos e maiores em camundongos. Diferenças relacionadas à idade entre neonatos e adultos

foram verificadas em camundongos e ratos, sendo que os picos plasmáticos e a área sob a curva foram maiores nos animais recém-nascidos do que nos adultos, enquanto em cobaias foi observado o contrário (Stegink et al, 1975; Airoidi et al, 1979; Ohara & Naim, 1977).

Estudos sobre os efeitos dos componentes da dieta na absorção do glutamato têm sido realizados em animais de experimentação. Quando camundongos jovens receberam o MSG adicionado a fórmulas (alimentos) infantis, ou quando os humanos adultos receberam MSG com “consomé” através de intubação gástrica, os níveis máximos de glutamato no plasma foram significativamente menores, e o tempo para atingir o pico plasmático foi maior do que quando a mesma dose foi administrada com água (Ohara & Naim, 1977; Stegink et al, 1985). De forma semelhante, a administração de MSG a camundongos, por intubação gástrica e alimentação *ad libitum* de dieta contendo MSG, origina apenas ligeira elevação plasmática de glutamato acima dos níveis basais (Heywood et al, 1973).

Resultados similares da absorção de glutamato e dos níveis plasmáticos também foram verificados em humanos. Verificou-se apenas um leve aumento nos níveis plasmáticos de MSG quando uma dose de 0,150 g/Kg p.c. foi ingerida com as refeições (Tung & Tung, 1980). Como verificado acima, a ingestão de doses elevadas de MSG junto com as refeições, provocou níveis plasmáticos de glutamato menores quando em comparação com água. Em geral, os alimentos que fornecem carboidratos metabolizáveis aumentam o metabolismo do glutamato, levando à redução dos seus níveis plasmáticos. Os carboidratos fornecem piruvato como substrato para transaminação com o glutamato nas células da mucosa, de modo que mais alanina é formada e menos glutamato atinge a circulação portal (Stegink et al, 1983). Cabe mencionar, ainda, que crianças, inclusive bebês prematuros, têm a mesma capacidade de metabolizar doses semelhantes de MSG administradas em fórmula infantil (Tung & Tung, 1980).

A FASEB (1995) revisou trinta e cinco estudos realizados em roedores, onde o MSG foi administrado por via enteral, sendo que em quatorze o MSG foi administrado por gavagem ou intubação intragástrica, treze na dieta ou água, quatro por ambos os métodos e em três não foi especificada a rota de administração. Em nove estudos as concentrações de ácido glutâmico no plasma foram determinadas e em cinco foram verificados os pico de concentração plasmática (dois em ratos e três em camundongos). Concluíram que as lesões produzidas no núcleo arqueado do hipotálamo, quando o MSG era administrado por via

enteral, foram realizados em animais jovens, cuja barreira hematoencefálica está em formação, e com doses elevadas. A menor dose onde observaram algum tipo de lesão foi de 0,5 g/kg p.c. e, animais com oito dias de idade (Daabees et al, 1985).

2. Estudos de toxicidade

2.1. Exposição aguda por via oral

Os ensaios de toxicidade aguda são realizados em animais de experimentação e visam demonstrar a ocorrência de efeito adverso em curto período de tempo. Geralmente, os ensaios tratam da administração de uma dose única ou exposições múltiplas em 24 horas. Considera-se também, o aparecimento de um efeito num período de até 14 dias, após a administração da substância estudada (Paine, 1993).

Estudos para a determinação do valor da DL_{50} ⁷ nos quais o MSG foi administrado por via oral foram realizados em várias espécies. Esses estudos foram publicados na sua maioria nas décadas de 60 e 70 (Tabela 1). Verificou-se que o valor da DL_{50} era elevado, indicando que o MSG possui baixo potencial de toxicidade aguda.

Os efeitos tóxicos, tais como, lesão no núcleo arqueado do hipotálamo e alterações hipotalâmicas com consequências neuroendócrinas em roedores neonatos, têm sido associados à exposição aguda ao MSG (Olney, 1970; Dawson, 1983; Hermanussen & Tresguerres, 2003). Esses efeitos foram verificados após administração de doses elevadas por via parenteral. Também foram observados alguns efeitos neuronais, após algumas horas, quando o MSG foi administrado por via oral, em altas doses, em camundongos neonatos, sem a presença de alimentos. No entanto, em outras espécies, nenhum efeito foi observado⁸.

⁷ Dose letal que mata 50% da população estudada.

⁸ Verificar tabela 5 (estudos de neurotoxicidade)

Tabela 1: Valores de DL50 para MSG e ácido glutâmico, administrados por via oral, em várias espécies

Espécies	DL ₅₀ (g/kg p.c.)	Referência
Camundongos	13,0	Izeki, 1964
	16,2 (14,2-18,4)	Ichimura & Kirimura, 1968
	19,2 (16,1-22,8)	Pinto-Scognamiglio <i>et al</i> , 1972
Ratos	19,9 (L-MSG)	International Min. & Chem Corp., 1969
	10,0 (D,L MSG)	International Min. & Chem Corp., 1969
	16,6 (14,5-18,9)	Pinto-Scognamiglio <i>et al</i> , 1972
Coelho	> 2,3 (L-ácido glutâmico)	International Min. & Chem Corp., 1969

Adaptado do FAO/WHO, 1988.

DL₅₀: dose letal que mata 50% dos animais estudados; L-MSG: L-glutamato monossódico; D,L-MSG: D,L-glutamato monossódico

2.2. Exposição subcrônica por via oral

A toxicidade subcrônica geralmente envolve o estudo de efeitos adversos decorrentes da exposição a múltiplas doses do agente tóxico durante períodos que não excedem 10 % da vida média do animal (Ballantyne & Sullivan, 1997).

As doses elevadas de MSG, administrado por via enteral, podem desenvolver lesões em duas áreas do cérebro particularmente suscetíveis a neurotoxicidade induzida pelo glutamato, o hipotálamo e o hipocampo. Então, Monno *et al* (1995) avaliaram em ratos adultos o efeito nos níveis extracelulares de glutamato sobre estas áreas, após administração oral de doses relativamente elevadas de MSG (4,0 g/kg p.c.). Para tanto, foi avaliada a ingestão única de MSG por gavagem e doses repetidas (21 dias) nas quais o MSG foi administrado na dieta. Os níveis de glutamato no plasma e no cérebro também foram

avaliados. A avaliação histológica de tecidos do cérebro foi realizada para avaliar a ocorrência de possíveis alterações neuropatológicas. Neste estudo de ingestão aguda foi verificado aumento significativo de glutamato no plasma e nos níveis extracelulares no hipocampo e no hipotálamo, em comparação aos ratos controle. Entretanto, nenhuma alteração nos níveis de glutamato foi verificada em estudo de 21 dias em comparação aos ratos que receberam dieta controle. A avaliação histológica não revelou nenhuma alteração associada à administração do MSG, tanto aguda como sub-crônica. Outros resultados obtidos em ensaios de toxicidade subcrônica, quando o MSG foi administrado por via oral estão mencionados na tabela 2.

Tabela 2: Efeitos adversos verificados após exposição subcrônica ao MSG, por via oral, em várias espécies

Espécies	Tempo de exposição	Dose(s) de MSG	Efeitos	Referência
Rato	90 dias	0,02; 0,2 e 2,0 g/kg p.c.	Nenhuma alteração morfológica foi verificada com relação o cérebro, cerebelo, coração, estômago, fígado, rim e baço. Também não foi verificado ganho de peso.	Hara <i>et al</i> , 1962
	35 dias	0,2g por rato	Nenhuma alteração foi notada.	Stellar & McElroy, 1948
Macacos	63 dias	0%; 4,8%; 9,1% e 17% na dieta	Um animal que recebeu 17% de MSG na dieta sofreu convulsão, mas os outros não foram afetados. Nenhuma evidência com relação ao comportamento, ganho de peso, lesões hipotalâmicas e oculares foi observada.	Wen et al., 1973

2.3. Toxicidade crônica e carcinogenicidade

Os estudos de toxicidade crônica são realizados num período correspondente a vida do animal (Ballantyne & Sullivan, 1997). Nenhum efeito adverso foi verificado nos estudos crônicos realizados em roedores que foram alimentados com diferentes doses de MSG (Tabela 3).

Owen et al (1978a) relataram que a ingestão de MSG causava hiperplasia da bexiga e pélvis renal em ratos. Posteriormente foi verificado que esse efeito não era provocado pela ingestão de MSG e sim devido à presença de KHCO_3 na dieta administrada aos animais, o qual tinha um efeito alcalinizante na urina (pH aumentava até 8), durante o período de maior consumo de alimento (Groot et al., 1988).

Shibata et al (1995) realizou ensaio no qual administrou doses de 0, 0,6, 1,25, 2,5 e 5,0 % de MSG em ratos, por um período de dois anos. Os animais que receberam dieta com 5,0 % de MSG tendiam ao retardo do crescimento. Ocorreu aumento do pH e sódio urinário e diminuição de potássio em ratos de ambos os sexos que receberam dieta com 2,5 e 5,0 %. Todavia, nenhum desenvolvimento de lesão proliferativa ou neoplásica foi observado no trato urinário.

Tabela 3: Efeitos adversos verificados após exposição crônica, por via oral, ao MSG em várias espécies.

Espécies	Tempo de exposição	Dose (s) de MSG	Efeitos	Referência
Camundongos	2 anos	1-4% de MSG na dieta.	Não houve ganho de peso, qualquer tipo de doença ou aparecimento de tumor em 715 dias de ensaio.	Ebert, 1979a
	2 anos	0,4-4% de MSG na dieta.	Nenhum efeito adverso foi notado com relação ao comportamento, ganho de peso, consumo de dieta, atividade motora, observação clínica, alterações hematológicas ou incidência de tumor.. A fertilidade também não foi afetada.	Ebert, 1979b
	2 anos	1-4% de MSG na dieta.	O consumo de água, o volume urinário e a excreção de sódio estavam aumentados nos animais que receberam 4% de MSG na dieta e depósitos de basófilos foram observados na pélvis renal.	Owen et al, 1978a
Cachorros	2 anos	2.5-10% de MSG na dieta.	Não foram notadas alterações no ganho de peso, consumo de alimento, comportamento, ECG, danos oftalmológicos, hematológicos, bioquímicos ou diferenças nos pesos dos órgãos.	Owen et al, 1978b

2.4. Estudos de reprodução e teratogenicidade

Nos estudos de reprodução e teratogênese são avaliados os efeitos adversos da substância no sistema de reprodução de animais de experimentação e as possíveis consequências na sua prole (Ballantyne & Sullivan, 1997).

Estudos verificaram a administração de doses de MSG (2.5 e 4.0 g/Kg p.c.), por via parenteral, em camundongos na fase final de gestação. Foi avaliado o comportamento da mãe e da prole. O acasalamento dos machos tratados com as fêmeas tratadas resultou em gestações e filhos normais, indicando que a administração oral de MSG não afeta a capacidade reprodutiva da prole numa fase tardia da gravidez (Yu et al, 1997).

Estudos de reprodução e teratologia com administração de MSG por via oral foram avaliados pelo JECFA (Tabela 4). Foi verificado que os animais expostos não apresentaram efeitos adversos, nem mesmo quando as fêmeas eram alimentadas com altas doses de glutamato, indicando que o feto e o neonato (lactentes) não foram expostos aos níveis tóxicos da dieta materna por transferência transplacentária ou pelo leite das lactantes. Esse fato está de acordo com os relatos de que os níveis de glutamato no sangue fetal não aumentam paralelamente com o aumento dos níveis do sangue maternos. Por exemplo, nas ratas, que receberam doses orais de 8,0g/Kg p.c no final do período de gestação, tiveram aumento dos níveis plasmáticos de 100 para 1650 nmol/mL, porém não houve aumento significativo nos níveis plasmáticos dos fetos. Do mesmo modo, em fêmeas de macacos Rhesus prenhas, a infusão de 1,0g de MSG/h levou a um aumento de 10 a 20 vezes nos níveis de glutamato no plasma materno, mas não ocorreu nenhuma mudança nos níveis plasmáticos dos fetos. Também em ratos e macacos, a ingestão oral de grandes doses de MSG não levou à detecção de qualquer aumento nos níveis do ácido glutâmico no leite materno.

Estudos avaliaram a passagem de diferentes aminoácidos através da placenta de ovinos e concluíram que o glutamato é o aminoácido que possui menor passagem para circulação uterina, pois é metabolizado em α -cetoglutarato na própria parede uterina (Cetim, 2001; Holzman et al, 1979).

Tabela 4: Estudos dos efeitos do MSG sobre a reprodução e teratogenicidade realizados em várias espécies.

Espécies	Tempo de exposição	Dose (s) de MSG	Efeitos	Referência
Camundongo	1ª geração: dieta de quatro semanas para machos e fêmeas; 2ª geração: F1 se alimentou com a mesma dieta por cento e trinta dias. 3ª geração: F2 se alimentou com a mesma dieta por vinte dias.	0,0 - 8,0g/kg p.c.	Nenhum efeito foi verificado com relação ao crescimento, ciclo estrogênico, maturação sexual ou anormalidades em órgãos em nenhuma das gerações.	Yonetani et al, 1970
	F1 e F2 foram observados em todo o período de crescimento e acasalamento.	1,0 - 2,0% MSG na dieta.	Os animais apresentaram aumento de peso após o desmame, melhor taxa de sobrevivência. Nenhum efeito no cérebro em F1 e F2 foi verificado.	Semprini et al, 1974
	1ª geração: dieta de cem dias para machos e fêmeas; 2ª geração: F1 se alimentou com a mesma dieta por noventa dias. 3ª geração: F2 se alimentou com a mesma dieta por vinte dias.	2,0 – 4,0 % MSG na dieta.	Nenhuma anormalidade foi observada com relação ao peso, consumo de alimento, ciclo estrogênico, maturação sexual, peso e alteração histológica dos órgãos.	Yonetani et al, 1979

Espécies	Tempo de exposição	Dose (s) de MSG	Efeitos	Referência
Camundongo	1ª geração: dieta até o acasalamento; F1 e F2 se alimentou com a mesma dieta por trinta e seis semanas.	1-4% MSG na dieta.	Nenhum efeito adverso foi relatado com relação a fertilidade, gestação, viabilidade ou índice de lactação e histopatologia do cérebro.	Anantharaman, 1979
Ratos	1ª geração: recebeu a dieta do quinto ao décimo nono dia no primeiro mês, do vigésimo ao trigésimo primeiro dia no mês seguinte e do primeiro ao décimo dia do terceiro mês.	0,025 – 0,125 g/kg p.c. por via intragástrica	Nenhum efeito adverso foi verificado com relação ao ganho de peso, consumo e ciclo sexual de fêmeas.	Furuya, 1967
	1ª geração: machos e fêmeas foram mantidos com a dieta durante o período reprodutivo; 2ª geração: F1 se alimentou com a mesma dieta até o período reprodutivo.	0.5 – 2,0 % de MSG na dieta.	A dieta com 2,0% aumentou a fertilidade de F1 e a taxa de sobrevivência de F2 durante a amamentação, mas nenhuma alteração com relação à fertilidade foi verificada.	Semprini <i>et al</i> , 1971

Espécies	Tempo de exposição	Dose (s) de MSG	Efeitos	Referência
Ratos	1ª geração: machos e fêmeas foram mantidos com a dieta durante o período reprodutivo; 2ª geração: F1 se alimentou com a mesma dieta por cem dias. 3ª geração: F2 se alimentou com a mesma dieta por até vinte e um dias.	1,0 - 10% de MSG na dieta	Nenhuma alteração com relação à reprodução foi observado. O glutamato no cérebro e fígado, o aspartato, a proteína, DNA, RNA e a atividade da ácido glutâmico descarboxilase não foram afetadas pelo tratamento.	Prosky & O'Dell, 1972
Coelhos	1ª geração: machos e fêmeas foram mantidos com a dieta durante o período reprodutivo; A eutanásia foi realizada após trinta dias de gestação.	0,1 – 8,25% de MSG na dieta.	Não houve efeito significativo sobre o ganho de peso, consumo de dieta, aparência geral, ou de comportamento. Exames histopatológicos não revelaram efeitos tóxicos sobre os embriões.	Hazelton Laboratories, 1969.
	Coelhas prenhas receberam a dieta por quinze dias após a gestação	0,025 g/kg p.c.	Nenhuma diferença foi verificada entre os grupos tratados e não tratados com relação ao peso dos testículos, ovários, glândulas supra-renais.	Yonetani, 1967

2.5. Mutagenicidade

Para avaliar os efeitos tóxicos mutagênicos e carcinogênicos genotóxicos, assume-se que há probabilidade de ocorrência de danos em qualquer nível de exposição, ou seja, não há limiar de tolerância (Ballantyne & Sullivan, 1997).

Na década de 70 foram realizados estudos para avaliar a mutagenicidade. Células de tecidos de ratos foram expostas a uma dose de 0,1% de MSG em solução e observadas durante 72 horas. Nenhum efeito tóxico foi verificado (US FDA, 1969). Outro estudo utilizou camundongos machos e administrou MSG por gavagem em diferentes níveis (0; 2,7 e 5,4 g/kg p.c.). Os animais tratados acasalaram com fêmeas não tratadas a cada seis semanas consecutivas. As fêmeas foram sacrificadas na metade da gravidez e o útero foi examinado para verificar sinais de morte embrionária precoce e efeitos mutagênicos. Não foram verificadas diferenças com relação à implantação, reabsorção e deficiência embrionária, entre as fêmeas que acasalaram com animais tratados e não tratados (Industrial Bio-Test, 1973).

2.6. Neurotoxicidade

Efeitos neurotóxicos associados à exposição ao MSG foram inicialmente relatados nas décadas de 60 e 70 (Tabela 5). Os principais relatos sobre as lesões neuronais relacionadas à administração de MSG foram constatados por Olney (1971), que administrou doses de 0,5-4,0 g/kg p.c. de MSG, por via parenteral, em camundongos com 2 a 9 dias de idade. Os animais foram mortos após 30 minutos ou 48 horas após a administração. Foram observadas lesões no núcleo arqueado do hipotálamo. As mesmas lesões também foram detectadas após a administração de 5,0-7,0 g/kg p.c. em camundongos adultos.

Outros pesquisadores utilizam como modelo o animal tratado com doses elevadas de MSG, administradas por via parenteral e oral. Os tratamentos indicaram que a elevação dos níveis de glutamato no plasma pode aumentar a circulação de glutamato no cérebro e provocar lesão no núcleo arqueado do hipotálamo e consequente obesidade e diabetes (Nagata et al, 2006; Hermanussen et al, 2006). Nestes experimentos, a barreira

hematoencefálica de roedores foi destruída de forma focada para tal lesão. Em animais que tinham recebido uma injeção contínua de MSG, o conteúdo de água no cérebro aumentou de forma significativa, provocando edema. A duplicação de concentrações de glutamato no plasma foi suficiente para causar este efeito, no qual o edema cerebral piorou apenas nestes animais. Provavelmente, o glutamato aumenta o conteúdo de água no cérebro como consequente absorção de glutamato nas células da glia, que elimina o glutamato extracelular juntamente com íons sódio e força a entrada de água .

Foi verificado que as concentrações de glutamato no plasma, em condições normais, podem chegar a 100 μ mol/L e no cérebro até 12.000 μ mol/L, mas apenas 0,5–2,0 μ mol/L chegam até o fluido extracelular, além disso, a passagem de glutamato pela barreira hematoencefálica é quase impermeável, mesmo em altas concentrações, exceto em algumas áreas pequenas com capilares fenestrados, pois o glutamato é um soluto polar e, portanto, o influxo passivo é limitado a menos de 1% daquele que ocorre nas veias sanguíneas de outros tecidos (Hawkins, 2009). Outros estudos que administraram MSG por via oral em diferentes espécies de animais, numa concentração de até 10,0 g/kg p.c. estão demonstrado na tabela 5. Constata-se que lesões ocorreram em doses extremamente elevadas, o que não reflete a utilização como aditivo alimentar.

Tabela 5: Estudos de neurotoxicidade relacionados à ingestão de MSG realizados em várias espécies.

Espécies	Tempo de exposição	de Dose (s) de MSG	Efeitos	Referência
Camundongos	Eutanásia após algumas horas do tratamento.	0,25 - 2,0 g/kg p.c. por gavagem.	Em 65 animais com 10 a 12 dias de idade foram estudados, onde 10 eram animais controle. Em 51 animais foram verificadas lesões no núcleo arqueado do hipotálamo. Estas lesões foram constatadas em 100% dos animais que receberam doses de 1,0 e 2,0 g/kg p.c. Nenhuma lesão foi verificada na dose de 0,25 g/kg p.c.	Olney, 1970
	Eutanásia após algumas horas do tratamento.	1,0 - 4,0 g/Kg p.c. na água de beber.	Em 95 animais com 5-7 dias de idade. Foram constatados danos nas células da glia em 26-28%. Nos outros animais não foram verificados efeitos adversos.	Abraham <i>et al</i> , 1971).
	Eutanásia após algumas horas do tratamento.	2,0 g/kg p.c. na dieta	Lesões cerebrais.	Geil, 1970.

Espécies	Tempo de exposição	Dose (s) de MSG	Efeitos	Referência
Camundongos	Eutanásia após vinte e quatro horas do tratamento.	10,0 mL/kg p.c.	Nenhuma evidência de efeito adverso foi verificada em análise microscópica do núcleo arqueado do hipotálamo.	Oser et al, 1973.
	Eutanásia após algumas horas do tratamento.	0,25 - 2,0 g/kg p.c.	Lesões foram verificadas em doses acima de 1,0 g/kg p.c. em animais neonatos.	Olney & Ho, 1970.
	Eutanásia após nove meses do tratamento.	2,0 - 4,0 g/kg p.c. por gavagem durante 10 dias.	Foram verificados danos nos neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo com rápida necrose celular em animais neonatos.	Olney, 1971.
	Eutanásia em trinta minutos a vinte e quatro horas após o tratamento.	2,0- 4,0 g g/kg p.c. por gavagem.	Foram verificados efeitos como edema e necrose cerebral em doses mais elevadas (4,0 g/kg) em animais neonatos.	Lemkey-Johnston & Reynolds, 1972, 1974.

Espécies	Tempo de exposição	Dose (s) de MSG	Efeitos	Referência
Camundongos	Eutanásia após seis dias de tratamento	2,0 - 4,0 g/kg p.c. por gavagem.	Nenhuma lesão foi verificada em animais com 6 dias de idade.	Lemkey-Johnston <i>et al</i> , 1975.
	Eutanásia após quatro horas do tratamento.	10% na água	Lesões cerebrais foram verificadas em animais recém-desmamados.	Olney et al, 1980.
	Eutanásia após uma hora e três dias do tratamento.	2,0 – 4,0 g/kg p.c. por gavagem junto com 0,63 g de NaCl/kg p.c. ou 1,93 g de glicose/kg p.c.	Em animais com 10 dias de idade, foi verificado que o cloreto de sódio não potencializou o dano induzido pelo MSG, enquanto a glutamato com glicose reduziu o número de neurônios do núcleo arqueado.	Takasaki, 1979
	Eutanásia após algumas horas do tratamento.	Doses maiores que 3,0 g/kg p.c. em solução aquosa.	Pequenas lesões cerebrais foram verificadas.	Torii & Takasaki, 1983.

Espécies	Tempo de exposição	Dose (s) de MSG	Efeitos	Referência
Camundongos	Eutanásia após onze dias no primeiro tratamento / Eutanásia após doze meses no segundo tratamento.	2,0 – 9,0 mg/kg p.c. no primeiro tratamento e 6,0 mg/kg p.c. no segundo tratamento	Nenhuma lesão hipotalâmica foi observada no primeiro tratamento. Nenhuma evidência de hipo ou hiperfagia, obesidade ou hiperatividade no segundo tratamento.	Wen et al, 1973.
Ratos	Observação de noventa minutos.	4,0 g/kg p.c. via intragástrica.	Pequenas convulsões foram verificadas somente após noventa minutos.	Mushahwar & Koeppe, 1971
	Eutanásia após noventa dias	0,001 – 0,25 g/kg p.c. na dieta	Após autópsia não foram verificadas diferenças no peso dos órgãos e não foi verificada nenhuma evidência de dano neurológico.	Golberg, 1973

Espécies	Tempo de exposição	Dose (s) de MSG	Efeitos	Referência
Ratos	Animais mortos 24 horas após a administração	1g/kg p.c.	Em animais com 3 a 12 dias de idade não foram verificados nenhum efeito histomorfológico no núcleo arqueado do hipotálamo.	Oser et al, 1971).
	A dieta foi dada para machos e fêmeas com 10 dias de idade. Após acasalamento e nascimento, as crias foram retiradas dos pais e a eutanásia foi realizada após cinco horas.	0.2 ml de comida para bebês com ou sem a adição de 0.4% de MSG.	Nenhuma lesão cerebral foi observada.	Geil, 1970.
	Eutanásia após vinte e quatro horas do tratamento	0,0-5,0 g/kg p.c. em solução e na dieta.	Nenhuma lesão hipotalâmica foi verificada.	Takasaki & Torii, 1983.

Espécies	Tempo de exposição	Dose (s) de MSG	Efeitos	Referência
Ratos	Eutanásia após cinco semanas	Dieta adicionada de 20% glicose, 20% MSG, 40% MSG ou 17% L-ácido glutâmico.	Nenhuma deficiência endócrina ou neurológica foi verificada.	Wen et al, 1973.
Hamsters	Eutanásia após seis horas do tratamanto.	Soluções contendo 2,0 – 8,0% de MSG por 30 minutos.	Nenhuma lesão hipotalâmica foi relatada.	Takasaki & Torii, 1983.
Cachorros	Eutanásia após vinte e quatro horas ou cinquanta e dois semanas do tratamanto.	1,0 g/kg p.c.	Nenhuma lesão cerebral foi verificada nem nos filhotes nem nos adultos.	Oser et al, 1973.
Macacos	Eutanásia após trinta dias do tratamento.	0,25 – 1,0 g/kg p.c. por gavagem.	Nenhuma alteração clínica foi verificada com relação a parâmetros hematológicos, glicose, uréia e sódio. Nenhuma lesão hipotalâmica foi constatada.	Golberg, 1973.

Espécies	Tempo de exposição	de	Dose (s) de MSG	Efeitos	Referência
Macacos	Eutanásia após quatro horas do tratamento.	após do	Animais com 5 – 40 dias de idade receberam 2.0 g/kg p.c. por via intragástrica e outros com 80 dias receberam 4,0 g/kg p.c.	Nenhuma lesão hipotalâmica foi associada a ingestão de MSG.	Huntington Research Centre, 1971).
	Eutanásia após quatro horas do tratamento.	após do	2.0 g/kg p.c. por via intragástrica.	Nenhuma lesão no hipotálamo ou quiasma óptico foi observada.	Heywood et al, 1979.
	Eutanásia após seis horas do tratamento.	após seis	1.0 - 4.0 g/kg p.c. por via intragástrica.	Nenhuma alteração morfológica foi verificada na região do hipotálamo.	Reynolds et al, 1979.

Espécies	Tempo de exposição	Dose (s) de MSG	Efeitos	Referência
Macacos	Eutanásia após nove semanas no primeiro tratamento e um ano no segundo tratamento.	5,0 - 17% de MSG em cápsula no primeiro tratamento e 0,1% no segundo tratamento.	Os animais que receberam 17% de MSG desenvolveram crises convulsivas. Nenhuma lesão hipotalâmica ou na retina foi constatada no primeiro tratamento. Nenhuma observação comportamental ou com relação ao ganho de peso, eletroforetinograma, eletroencefalograma e aminoácidos plasmáticos foi observada. Nenhuma evidência de obesidade foi notada no segundo tratamento.	Wen et al, 1973.
	Eutanásia após quatro horas do tratamento.	2,0-4,0 g/kg p.c.	Nenhuma anormalidade foi verificada no cérebro e em exames bioquímicos.	Newman et al., 1973

3. O MSG e a Síndrome do Restaurante Chinês

A Síndrome do Restaurante Chinês (ou Complexo de Sintomas relacionados ao MSG) foi descrita primeiramente por Kwok em 1968, que relatou um conjunto de sinais e sintomas, como por exemplo, dores no pescoço ou na cabeça, fraqueza e palpitações. Além disso, outros sintomas foram relacionados à ingestão de MSG, como asma, dermatite atópica, urticária, dificuldades respiratórias e taquicardia, através do consumo de comida chinesa, ou mais precisamente, através de alimentos que continham MSG (Allen et al, 1987; Van Bever et al, 1989; Gann, 1977; Ratner et al, 1984).

O estudo mais recente sobre a investigação da síndrome foi realizado por Gehe et al (2000). Os pesquisadores realizaram um desenho do tipo duplo-cego, placebo-controlado. Foram feitas medidas de pulsação, pressão sanguínea, taxa respiratória e temperatura para verificar as respostas que eram dadas como positivas a reações adversas (fraqueza geral, tensão e contração muscular, rubor, suor, sensação de queimação, dor de cabeça – enxaqueca, dor no peito, palpitações, dormência – formigamento). O estudo teve quatro testes seqüenciais; os dois primeiros eram idênticos àqueles do estudo de Yang et al (1997). A primeira fase do estudo foi feita com cento e trinta (130) indivíduos, que receberam cápsulas de placebo ou 5,0 g de MSG (para evitar que sentissem o sabor da substância do teste) junto com líquido de sabor cítrico, em dias diferentes e registrou reações durante 2 horas. Cinquenta (38.5%) dos 130 participantes apresentaram 2 ou mais sintomas (resposta positiva) durante o ensaio com MSG e apresentaram nenhum ou 1 sintoma após a ingestão do placebo. Dezenove (14.6%) participantes apresentaram 2 ou mais sintomas após ingestão do MSG e placebo, enquanto 17 (13.1%) participantes apresentaram 2 ou mais sintomas com placebo e nenhum ou 1 sintoma com MSG. Quarenta e quatro (33.8%) participantes apresentaram nenhum ou 1 sintoma com MSG e placebo.

A segunda fase foi feita com um estudo dose-resposta, onde o MSG foi administrado nas doses de 0, 1,25, 2,5 e 5,0g. Oitenta e seis (86) indivíduos, incluindo todos os que apresentaram duas ou mais respostas a um ou ambos os tratamentos, iniciaram a segunda fase, todavia, apenas 69 finalizaram. Nessa fase foi avaliada a ocorrência de todas as reações e o resultado foi semelhante àquele observado por Yang et al. (1997): mais indivíduos apresentaram sintomas conforme a dose de MSG aumentava. As respostas foram

analisadas para reprodutibilidade dos dois testes. No primeiro teste a reprodutibilidade de resposta para dose de 5,0g foi avaliada em ambos os testes. O critério de reprodutibilidade das reações foi acatado por apenas 14 indivíduos (um total de 19 indivíduos apresentou reações ao MSG e não ao placebo, mas apenas 14 tiveram sintomas reprodutíveis ao MSG).

Com base no relatório da FASEB (Raiten et al., 1995), a fase seguinte do estudo incluiu 12 dos 19 indivíduos que tiveram reações ao MSG e envolveu a administração de MSG (5,0g) ou placebo duas vezes, em ocasiões diferentes. Apenas dois dos indivíduos apresentaram dois ou mais sintomas após a ingestão de MSG e não ao placebo. Nenhum indivíduo apresentou os mesmos sintomas após cada teste com a administração de MSG. A fase final analisou a ocorrência dos sintomas após a ingestão de alimento contendo MSG (ou placebo) em três ocasiões diferentes. Embora não tenha restado nenhum indivíduo que tenha provado sensibilidade ao MSG, os dois que responderam ao MSG, mas não ao placebo, foram convidados a participar desta fase. Ambos indivíduos apresentaram dois ou mais sintomas em um dos três testes de MSG, sendo que os sintomas não foram os mesmos como aqueles apresentados nos testes anteriores.

Este estudo verificou que quando um grupo de indivíduos auto-identificados sensíveis ao MSG é questionado a mostrar reprodutibilidade de diferentes sintomas, nenhum consegue fazê-lo.

Nas suas conclusões da avaliação sobre a segurança do MSG, a FASEB e FDA não consideraram a existência de uma subpopulação sensível e concordaram com a avaliação de segurança do JECFA e SCF (Walker e Lupien, 2000).

Williams & Woessner (2009) realizaram uma revisão da literatura disponíveis sobre a provável participação do MSG nas reações alérgicas mais comuns, ou seja: asma, urticária e rinite, que fazem parte do ‘complexo de sintomas atribuídos ao glutamato monossódico’. Os pesquisadores concluíram que, no caso específico da asma, a análise crítica dos métodos e das propostas experimentais apresentam limitações que impossibilitam concluir a existência dessa relação. Além disso, estudos com maior rigor científico (como aqueles que envolvem testes duplo cego placebo controlado) demonstraram ser improvável que o consumo de MSG tenha papel participativo na asma, mesmo nos indivíduos identificados como sensíveis a esta substância.

Em contrapartida, muitos estudos, que examinaram o provável papel da ingestão alimentar de MSG como agente causador de urticária (edema geralmente pruriginoso) e angioedema (inchaço localizado na derme ou submucosa), sugeriram a possibilidade de um caso raro que provavelmente representa menos de 3% dos casos. Entretanto, a qualidade da evidência que sustenta essa relação está longe da ideal. A evidência de que o MSG é agente causador de rinite está limitada a dois relatos na literatura científica. Resumindo, é essencial mencionar que a evidência científica atual não indica que o MSG participe do aparecimento de asma, urticária, angioedema ou rinite.

Considerações finais

O MSG é um sal do ácido glutâmico e é utilizado mundialmente como aditivo alimentar pela indústria alimentícia com a finalidade de realçar o sabor. Todos os sais deste aminoácido se dissociam em solução aquosa. Portanto, o glutamato presente nas soluções é o mesmo glutamato livre encontrado dos alimentos (como queijos, carnes, tomates, etc).

No corpo humano, o glutamato proveniente da dieta, tanto na sua forma natural (encontrado nos alimentos) quanto adicionado como aditivo alimentar é, na sua maior parte, metabolizado no próprio trato gastrointestinal. Além disso, possui múltiplas funções fisiológicas, como a percepção do gosto *umami*, os metabolismos intermediários e a neurotransmissão excitatória.

O Comitê misto FAO/WHO de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) classificou, em 1987, o MSG na categoria mais segura de aditivos alimentares. O JECFA avaliou dados de metabolismo e farmacocinética do glutamato, junto com dados toxicológicos experimentais e estudos em seres humanos. Na avaliação foi verificado que o glutamato possui uma toxicidade aguda muito baixa e, quando administrado por via oral, a DL₅₀ (dose letal para 50% dos animais testados) em ratos e camundongos era de, aproximadamente, 15-19 g/kg p.c, respectivamente.

Estudos de toxicidade subcrônicos e crônicos, com duração de até dois anos em ratos e camundongos, incluindo a fase reprodutiva, não revelaram nenhum efeito adverso específico quando o MSG foi administrado na dieta em até 4,0%. Pesquisas de dois anos em cães, com 10% de MSG na dieta, não revelaram nenhum efeito no ganho de peso, peso dos órgãos, alterações clínicas, mortalidade ou comportamento em geral. A avaliação da

segurança realizada pelo JECFA levou a conclusão de que a ingestão dietética total de sais de ácido glutâmico, decorrentes do seu uso em níveis necessários para atingir o efeito tecnológico desejado e de sua aceitabilidade em alimentos, não representa um risco para a saúde. Então, a expressão de um valor numérico para IDA não foi considerada necessária e, assim, foi atribuído para sais de ácido glutâmico (sais de monossódio, potássio, cálcio e amônio) uma IDA “não especificada”. O JECFA também verificou que não havia necessidade de restrições para mulheres grávidas e crianças, mas mantiveram a posição colocada nas outras avaliações realizadas, que aditivos alimentares, em geral, não devem ser consumidos por neonatos, antes de doze semanas de idade.

O Comitê Científico para Alimentos da Comissão da Comunidade Européia (SCF), em estudo de 1991, conduziu uma avaliação de segurança do MSG semelhante à realizada pelo JECFA e chegou a mesma conclusão, atribuindo uma IDA “não especificada” (SCF, 1991). No entanto, em 1995, uma diretiva Comunidade Européia (95/2/CE) sobre aditivos alimentares fixou um limite de 10g/kg para L-glutamato e sais presentes nos produtos alimentícios, com exceção de alimentos não processados, alimentos para bebês (para qual o uso glutamato e sais não são permitidos) e temperos e especiarias. Atualmente, a diretiva continua em vigor como mencionado na Resolução 1333/2008 (1333/2008/CE).

A Federação das Sociedades Americanas para Biologia Experimental (FASEB) publicou, em 1995, a avaliação realizada sobre reações adversas ao MSG e concluiu que, embora haja evidências científicas comprovadas de efeitos adversos em alguns indivíduos sensíveis a doses elevadas de glutamato, não há documentação suficiente para indicar que existe um subgrupo de indivíduos saudáveis que apresentam reações adversas ao MSG. O subgrupo que responde às manifestações do complexo de sintomas relacionados ao MSG geralmente respondem dentro de 1 hora de exposição, quando expostas a uma dose oral de 3,0g de MSG na ausência de alimento (FASEB, 1995).

O FDA adotou as conclusões da FASEB com relação ao complexo de sintomas, salientando que há diferenças em testes onde o MSG é administrado em cápsulas ou em soluções na ausência ou na presença de alimentos. O FDA também concluiu que não há nenhuma evidência de que o glutamato livre, presente naturalmente em alimentos ou adicionado a dieta, cause danos degenerativos a células nervosas a longo prazo. O FDA também interpretou as conclusões do relatório da FASEB coerentes com as avaliações de

segurança feitas por outras organizações competentes (incluindo o JECFA e SCF), que afirmaram a segurança do MSG nos níveis normalmente consumidos pela população em geral.

Após a revisão da FASEB, o FDA considerou o MSG como um ingrediente alimentar, como o sal e o açúcar. Tal como estes ingredientes, o MSG também não pode ser usado em excesso, pois é autolimitante. O MSG deve ser adicionado aos alimentos em uma determinada proporção (0,1 a 0,8%), segundo as Boas Práticas de Produção de Alimentos (Beyreuther et al, 2007). Se utilizado em excesso não melhora o gosto dos alimentos e na verdade, o piora. Considerando todas as avaliações realizadas, pode-se concluir que o uso do MSG como aditivo alimentar é seguro, se utilizado no nível necessário para obter efeito tecnológico desejado.

Referências bibliográficas

- Abraham R, Dougherty W, Golberg L, Coulston F. The response of the hypothalamus to high doses of monosodium glutamate in mice and monkeys. *Exp Mol Pathol*. 1971; 15, 43-60.
- Airoidi L, Salmona M, Ghezzi P, Garattini S.. Glutamic acid and sodium levels in the nucleus arcuatus of the hypothalamus of adult and infant rats after oral monosodium glutamate. *Toxicol Lett*. 1979; 3, 121-126
- Allen DH, Delohery J, Baker G.. Monosodium L-glutamate-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1987; 80(4), 530-7.
- Anantharaman K. In utero and dietary administration of monosodium L-glutamate to mice: reproductive performance and development in a multigeneration study. In: Filer LJ, Garattini, S, Kare M R, Reynolds WA, Wurtman RJ. *Glutamic acid: Advances in Biochemistry and Physiology*. New York, USA: Raven Press; 1979: 231-253.
- Anderson SA, Raiten DJ. Safety of amino acids used as dietary supplements. Prepared for the Food and Drug Administration under Contract nº FDA 223-88-2124 by Life Sciences Research Office, FASEB Bethesda, MD: Special Publications Office, Federation of American Societies for Experimental Biology, 1992.

- Arbogast LA, Voogt JL. Sex-related alterations in hypothalamic tyrosine hydroxylase after neonatal monosodium glutamate treatment. *Neuroendocrinology*. 1990 Nov;52(5):460-7.
- Ballantyne B, Sullivan JB. Basic principles of Toxicology. In: Sullivan, J. B.; Krieger, G. R. Hazardous materials toxicology: clinical principles of environmental health. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997: 9-23.
- Beyreuther K, Biesalski HK, Fernstrom JD, Grimm P, Hammes WP, Heinemann U, Kempfski O, Stehle P, Steinhart H, Walker R. Consensus meeting: monosodium glutamate - an update. *Eur J Clin Nutr* 2007; 61(3): 304-13.
- BRASIL. Resolução - RDC n.1, de 2 de janeiro de 2001. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico que aprova o uso de aditivos com a função de realçadores de sabor, estabelecendo seus limites máximos para os alimentos. *Diário Oficial da União, Brasília*, 4 jan. 2001. Seção 1, p.21.
- Broberger C. Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *J Int Med* 2005; 258: 301-27.
- Brosnan JT. Glutamate, at the interface between amino acids and carbohydrate metabolism. *J Nutr*. 2000; 130: 966S-70S.
- Brosnan ME, Brosnan JT. Hepatic glutamate metabolism: a tale of 2 hepatocytes. *Am J Clin Nutr*. 2009: 857S-61S.
- Burrin DG, Stoll B. Metabolic fate and function of dietary glutamate in the gut. *Am J Clin Nutr*. 2009: 849S-56S.
- Cetin, I. Amino acid interconversions in the fetal-placental unit: the animal model and human studies in vivo. *Pediatr Res*. 2001; 49: 148-154.
- Chaudhari N, Pereira E, Roper SD. Taste receptors for umami: the case for multiple receptors. *Am J Clin Nutr*. 2009; 90(3):738S-742S.
- Chaudhari N, Yang H, Lamp C, Delay E, Cartford C, Than T, Roper S. The taste of monosodium glutamate: membrane receptors in taste buds. *J. Neurosci*. 1996; 15, 16 (12):3817-26.
- Chaudhari N. Umami taste transduction: multiple receptors and pathways? *Sensory Neuron* 2001, 3 (3): 129-138.
- Dawson R Jr. Acute and long lasting neurochemical effects of monosodium glutamate administration to mice. *Neuropharmacology* 1983; 22(12A):1417-9.

European Parliament And Council. Directive n° 95/2/EC of 20 February 1995 on food additives other than colours and sweeteners. Official Journal of the European Union.

European Parliament and of the Council. Regulation n° 1333/2008 of 16 December 2008 on food additive. Official Journal of the European Union.

Ebert AG. The dietary administration of L-monosodium glutamate, DL-monosodium glutamate, or L-glutamic acid to rats. *Toxicol Lett.* 1979b; 3: 71-78.

Ebert, A.G. The dietary administration of monosodium glutamate or glutamic acid to C-57 black mice for two years. *Toxicol. Lett.* 1979a, 3, 65-70.

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. L-glutamotamic acid and its ammonium, calcium, monosodium and potassium salts. In *Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants*. New York, Cambridge University Press, 1988: 97-161.

FAO/WHO. Evaluation of food additives: specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation; some extraction solvents and certain other substances; and a review of the technological efficiency of some antimicrobial agents. 14th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. FAO Nutrition Meetings Report Series n°48, WHO Technical Reports Series n°462, 1971.

FAO/WHO. Toxicological evaluation of food additives with a review of general principles and of specifications. 17th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. FAO Nutrition Meetings Report Series n°53, WHO Technical Reports Series n°539, 1974.

FASEB. Analysis of Adverse Reactions to Monosodium Glutamate (MSG), Report. Life Sciences Research Office, Federation of American Societies of Experimental Biology, Washington, DC, 1995.

FDA (Food and Drug Administration) Database of Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Reviews, 2006.

Food and Drug Research Laboratories. Teratologic evaluation of FDA 71-69 (monosodium glutamate) in mice, rats and rabbits. NTIS, PB-234-865, 1974a.

Food and Drug Research Laboratories. Teratologic evaluation of FDA 73-58 (monopotassium glutamate) in mice and rats. Unpublished report, 27, 1974b.

Furuya H. Unpublished report. Submitted to WHO in 1970.

- Gann D. Ventricular tachycardia in a patient with the "Chinese restaurant syndrome". *South Med J.* 1977; 70 (7), 879-81.
- Geha RS, Beiser A, Ren C, Patterson R, Greenberger PA, Grammer LC, Ditto AM, Harris KE, Shaughnessy MA, Yarnold PR, Corren J, Saxon A. Multicenter, double-blind, placebo-controlled, multiple-challenge evaluation of reported reactions to monosodium glutamate. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000; 106(5), 973-80.
- Geil RG. Prelim. Comm. Gerber Products Co. Submitted to WHO in 1973.
- Go G, Nakamura FH, Rhoads GG, Dickinson LE. Long-term health effects of dietary monosodium glutamate. *Hawaii Medical J.* 1973; 32: 13-17.
- Golberg L. Unpublished report from the Institute of Experimental Pathology and Toxicology, Albany Medical College. Submitted to WHO in 1973.
- Gottschewski GHM. Kann die Traegersubstanz von Wirkstoffen in Dragees eine teratogene Wirkung haben? *Arzneimittel-Forsch* 1967.; 17, 1100-1103.
- Groot AP, Feron VJ, Immel HR. Induction of hyperplasia in the bladder epithelium of rats by a dietary excess of acid or base: implications for toxicity/carcinogenicity testing. *Food Chem. Toxicol.* 1988; 26(5):425-34.
- Hara S, Shibuya T, Nakakawaji K, Kyu M, Nakamura Y, Hoshikawa H, Takeuchi T, Iwao T, Ino H. Observations of pharmacological actions and toxicity of sodium glutamate, with comparisons between natural and synthetic products. *Tokyo Idadagaku Zasshi, J. Tokyo Med. Coll.* 1962; 20(1), 69-100.
- Hawkins R. The blood-brain barrier and glutamate. *Am J Nutr* 2009 (90):1S-8S.
- Hayes SP, Ordonez JM, Burrin DG, Snehag AL. Dietary glutamate is almost entirely removed in its first pass through the splanchnic bed in premature infants. *Pediatr Res.* 2007; 62(3): 353-356.
- Hermanussen 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. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60, 25–31.
- Hermanussen M, Tresguerres JAF. Does high glutamate intake cause obesity? *J Pediatr Endocrinol Metab* 2003; 16, 965-968.
- Heywood R, James RW. An attempt to induce neurotoxicity in an infant rhesus monkey with monosodium glutamate. *Toxicol. Lett.* 1979; 4, 285-286.

- Heywood R, Palmer AK, Newman AJ, Barry, DH, Edwards FP. 1972. Unpublished report submitted to Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc. Submitted to WHO in 1973.
- Holzman IR, Lemons JA, Meschia G, Battaglia FC. Uterine uptake of amino acids and glutamine-glutamate balance across the placenta of the pregnant ewe. *J Dev Physiol* 1979; 1:137–149
- Huntington Research Centre (1971). Unpublished report dated 18 October. Submitted to WHO in 1973.
- Ichimura M, Kirimura J. (1968). Unpublished report from Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc. Submitted to WHO in 1970.
- International Min. and Chem. Corp. (1969). Unpublished report. Submitted to WHO by International Mineral and Chemical Corporation.
- Izeki, T. (1964). Report of the Osaka Municipal Hygienic Laboratory, 23, 82. Submitted to WHO in 1970.
- Janeczko, M. J., Stoll, B., Chang, X., Guan, X., Burrin, D. G. Extensive gut metabolism limits the intestinal absorption of excessive supplemental dietary glutamate loads in infant pigs. *J Nutr.* 2007; 137(11), 2384-90.
- Khera, K.S., Whitta, L.L., & Nera, E.A., 1970. Unpublished results of Research Laboratories, Food and Drug Directorate, Ottawa, Canada. Submitted to WHO in 1970.
- Kwok RHM. Chinese-restaurant syndrome [letter]. *N Engl J Med* 1968; 278:796.
- Lemkey-Johnston N, Butler, V, Reynolds WA. Brain damage in neonatal mice following monosodium glutamate administration: possible involvement of hypernatremia and hyperosmolality. *J Neuropathol Exp Neurol* 1975, 48(2), 292-309.
- Lemkey-Johnston N, Reynolds WA. Incidence and extent of brain lesions in mice following ingestion of monosodium glutamate (MSG). *Anat Rec.* , 1972, 172, 354.
- Lemkey-Johnston N, Reynolds WA. Nature and extent of brain lesions in mice related to ingestion of monosodium glutamate. A light and electron microscopy study. *J. Neuropathol. Exp Neurol.* 1974; 33(1), 74-97.
- Maruyama Y, Pereira E, Margolskee RF, Chaudhari N, Roper SD. Umami responses in mouse taste cells indicate more than one receptor. *J Neurosci.* 2006; 26(8):2227-34.

- 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. *Neurosci Lett*. 1995, 193(1), 45-8.
- Mushahwar IK, Koeppe RE. The toxicity of monosodium glutamate in young rats. *Biochim Biophys Acta*. 1971; 244(2):318-21.
- Nagata M, Suzuki W, Iizuka S, Tabuchi M, Maruyama H, Takeda S, Aburada M, Miyamoto K. Type 2 diabetes mellitus in obese mouse model induced by monosodium glutamate. *Exp Anim*. 2006; 55(2), 109-115.
- Newman AJ, Heywood R, Palmer AK, Barry DH, Edwards FP, Worden AN. The administration of monosodium L-glutamate to neonatal and pregnant rhesus monkeys. *Toxicology*. 1973; 1(3):197-204.
- Nijijima A. Reflex Effects of Oral, Gastrointestinal and Hepatoportal Glutamate Sensors on Vagal Nerve Activity. *J Nutrition* 2000; 130 (4S): 971S-973S.
- Ohara I, Naim M. Effects of monosodium glutamate on eating and drinking behavior in rats. *Physiol Behav*. 1977; 19(5):627-34.
- Olney JW, Ho OL. Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature* 1970; 227, 609-611.
- Olney JW, Labruyère J, de Gubareff T. Brain damage in mice from voluntary ingestion of glutamatotamate and aspartate. *Neurobehav Toxicol* 1980; 2, 125-129.
- Olney JW, Sharpe LG, Fergin RD. Glutamate-induced brain damage in infant primates. *J. Neuropath. Exp Neurol*. 1972, 31, 464-488.
- Olney JW. Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. *J. Neuropath. Exp. Neurol*. 1971; 30, 75-90.
- Oser B L, Bailey DE, Morgareidge K, Carson S, Vogin E E. Unpublished report submitted to International Glutamate Technical Committee. Submitted to WHO in 1973.
- Oser BL, Carson S, Vogin EE, Cox GE. Oral and subcutaneous administration of monosodium glutamate to infant rodents and dogs. *Nature*. 1971, 229(5284):411-3.
- Owen G, Cherry CP, Prentice DE, Worden AN. The feeding of diets containing up to 10% monosodium glutamate to beagle dogs for 2 years. *Toxicol Lett* 1978b; 1, 217-219.
- Owen, G., Cherry, C.P., Prentice, D.E., & Worden, A.N. The feeding of diets containing up to 4% monosodium glutamate to rats for 2 years. *Toxicol. Lett* 1978a, 1, 221-226.

- Paine AJ. The design of toxicological studies. In: Ballantyne, B; Mars, T.; Turner, P. General applied toxicology. NY: McMillan Press, 1993: 231-245.
- Pinto-Scognamiglio W, Amorico L, Gatti GL. Esperienze di tossicità et di tolleranza al monosodioglutamato con un saggio di condizionamento di salvaguardia. *Il Farmaco* 1972; 27, 19-27.
- Pradhan SN, Lynch JF Jr. Behavioural changes in adult rats treated with monosodium glutamate in the neonatal stage. *Arch. Int. Pharmacodyn Ther.* 1972; 197, 301-304.
- Prosky L, O'Dell RG. Biochemical changes of brain and liver in neonatal offspring of rats fed monosodium L-glutamato. *Experientia* 1972; 28, 260-263.
- Ratner D, Eshel E, Shoshani E. Adverse effects of monosodium glutamate: a diagnostic problem. *Isr J Med Sci.* 1984; 20(3): 252-3.
- Reynolds WA, Lemkey-Johnston N, Filer LJ Jr, Pitkin R M. Monosodium glutamate: absence of hypothalamic lesions after ingestion by newborn primates. *Science* 1971; 172, 1342-1344.
- Reynolds WA, Lemkey-Johnston N, Stegink LD. Morphology of the fetal monkey hypothalamus after in utero exposure to monosodium L-glutamate. In: Filer LJ, Garattini S, Kare MR, Reynolds WA, Wurtman RJ. *Glutamic acid: Advances in Biochemistry and Physiology.* New York, USA: Raven Press, 8 1979: 217-229.
- Rodwell W, Kennelly PJ. Aminoácidos e peptídeos. In: Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P.; Rodwell, V. W. *Haper: Bioquímica Ilustrada.* 26 ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2006.
- SCF. Reports of the Scientific Committee for Food on a First Series of Food Additives of Various Technological Functions, Commission of the European Communities, Reports of the Scientific Committee for Food, 25th Series, Brussels, Belgium, 1991.
- Semprini ME, Conti L, Ciofi-Luzzatto A, Mariani A. Effect of oral administration of monosodium glutamate (MSG) on the hypothalamic arcuate region of rat and mouse; a histological assay. *Biomedicine* 1974; 21, 398-403.
- Semprini ME, Frasca MA, Mariani A. Effects of monosodium glutamate (MSG) administration on rats during the intrauterine life and the neonatal period. *Quaderni della Nutrizione* 1971; 31, 85-100.

- Shibata MA, Tanaka H, Kawabe M, Sano M, Hagiwara A, Shirai T. Lack of carcinogenicity of monosodium L-glutamate in Fischer 344 rats. *Food Chem Toxicol* 1995; 33(5), 383-91.
- Stegink LD, Filer LJ Jr, Baker GL. Plasma amino acid concentrations in normal adults fed meals with added monosodium L-glutamate and aspartame. *J Nutr*. 1983;113(9):1851
- Stegink LD, Filer LJ, Baker GL. Plasma glutamate concentrations in adult subjects ingesting monosodium L-glutamate in consomme. *Am J Clin Nutr* 1985; 42, 220-225.
- Stegink LD, Filer LJ Jr, Baker GL. Monosodium glutamate: effect on plasma and breast milk amino acid levels in lactating women. *Proc Soc Expt Biol Med*. 1972; 140, 836-841.
- Stegink LD, Reynolds WA, Filer LJ, Baker GL, Daabees TT, Pitkin RM. Comparative metabolism of glutamate in the mouse, monkey and man. In: Filer LJ, Garattini S, Kare MR, Reynolds WA, Wurtman RJ. *Glutamic acid: Advances in Biochemistry and Physiology*. New York, USA: Raven Press, 8 1979: 5-102.
- Stegink LD, Reynolds WA, Filer LJ Jr, Pitkin RM, Boaz DP, Brummel MC. Monosodium glutamate metabolism in the neonatal monkey. *Am J Physiol*. 1975; 229(1):246-50.
- Stegink LD, Pitkin RM, Reynolds WA, Filer LJ Jr, Boaz DP, Brummel MC. Placental transfer of glutamate and its metabolites in the primate. *Am J Obstet Gynecol*. 1975; 122(1):70-8.
- Takasaki Y, Matsuzawa Y, Iwata S, O'Hara Y, Yonetani S, Ichimura M.. Toxicological studies of monosodium L-glutamate in rodents - relationship between routes of administration and neurotoxicity. In: Filer LJ, Garattini S, Kare MR, Reynolds WA, Wurtman RJ. *Glutamic acid: Advances in Biochemistry and Physiology*. New York, USA: Raven Press, 8 1979. 255-275.
- Takasaki Y, Torii K. Effects of water restriction on the development of hypothalamic lesions in weaning rodents given MSG. II. Drinking behaviour and physiological parameters in rats (*Rattus norvegicus*) and golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Toxicol Lett*. 1983, 16, 195-210.
- Tamano S, Tanaka H, Kawabe M, Asakawa E, Sano M, Shioya S, Shirai T, Fukushima S. No enhancing effects of calcium/magnesium salts of L-glutamate and L-ascorbate on

- tumor development in a rat medium-term multiorgan carcinogenesis bioassay. *J Toxicol Environ Health* 1993; 39(1), 43-58.
- Torii K, Takasaki Y. Effects of water restriction on the development of hypothalamic lesions in weanling rodents given MSG. I. Drinking behaviour and physiological parameters in mice. *Toxicol Lett.* 1983, 16, 175-194.
- Tung TC, Tung KS. Serum free amino acid levels after oral glutamate intake in infant and adult humans. *Nutr Rep Int.* 1980; 22, 431-443.
- US FDA. US Food and Drug Administration, Bureau of Science-Bureau of Medicine. Report on monosodium glutamate for review by Food Protection Committee, NAS/NRC, Washington, DC, USA, 1969.
- Van Bever HP, Docx M, Stevens WJ. Food and food additives in severe atopic dermatitis. *Allergy* 1989; 44(8): 588-94.
- Walker R, Lupien JR. The safety evaluation of monosodium glutamate. *J Nutr.* 2000; 130(4S), 1049-1052.
- Wen CP, Hayes KC, Gershoff SN. Effects of dietary supplementation of monosodium glutamate on infant monkeys, weanling rats and suckling mice. *Am J Clin Nutr.* 1973; 26, 803-813.
- Williams AN, Woessner KM. Monosodium glutamate 'allergy': menace or myth? *Clin Exp Allergy.* 2009; 39(5):640-6.
- Yonetani S, Ishii H, Kirimura J. Effect of dietary administration of monosodium glutamate on growth and reproductive functions in mice. *Oyo Yakuri (Pharmacometrics)* 1979; 17, 143-152.
- Yonetani S, Ishii H, Kirimura J. Unpublished report from Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc. Submitted to WHO in 1970.
- Yonetani S. (1967). Unpublished report from Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc. Submitted to WHO in 1970.
- Yu T, Zhao Y, Shi W, Ma R, Yu L. Effects of maternal oral administration of monosodium glutamate at a late stage of pregnancy on developing mouse fetal brain. *Brain Res* 1997;747(2):195-206.

Capítulo 2



Avaliação de parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos em ratos Wistar não diabéticos e diabéticos alimentados com glutamato monossódico

Este artigo sera submetido à publicação na revista Food and Chemical Toxicology.

Evaluation of biochemical, hematological and histological parameters in non diabetic and diabetic Wistar rats fed with monosodium glutamate

Abstract

The parenteral or oral administration of monosodium glutamate (MSG) has been reported to have a deleterious effect on the hypothalamic arcuate nucleus, which changes appetite control. This alteration in function may lead to obesity and disorders related to metabolic syndrome, such as alterations in carbohydrate metabolism (glucose and insulin resistance), dyslipidemia and cardiovascular disease. This study evaluates the induction of metabolic alterations due to MSG exposure at levels up to 5.0% in the diet. The study was carried out using diabetic and non-diabetic rats; the use of diabetic animals is based on their susceptibility to metabolic disorders. Methods capable of evaluating the entire metabolic profile of the diabetic condition were used, including biochemical tests and tests able to detect alterations in the organs usually affected by this disease. It was concluded that the use of MSG did not change the studied parameters for diabetic or non-diabetic animals. The alterations observed in the diabetic animals mainly reflected metabolic changes caused by the disease and were not related to the administration of MSG.

Keywords: MSG, glutamate, Wistar rat, diabetic.

1. Introduction

Monosodium glutamate (MSG) is a salt of glutamic acid, which is the most common amino acid found in nature and is present in many proteins, peptides and most tissues. MSG is used as a food additive and has historically been used as a flavor enhancer by the food industry in several types of foods, including soups, sauces and snack. In its last evaluation in 1987, JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) designated a “not specified” acceptable daily intake (ADI) for this food additive (FAO/WHO, 1988 & Jinap and Hajebe, 2010). JECFA applies the designation of ‘not specified ADI’ to food additives of very low toxicity; on the basis of available data, including chemical, biochemical, toxicological, and other data, the total dietary intake of this substance, according to the levels necessary to achieve the desired effect and its presence in foods, does not, in the opinion of the Committee, represent a hazard to human health. In 1958, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) considered MSG to be an ingredient Generally Recognized as Safe (GRAS). However, in 1992, in association with the Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), the FDA contracted a group of independent scientists to review the scientific studies related to the safety of MSG. They concluded that there was no scientifically verifiable evidence of adverse effects due to ingestion of MSG as food additive (FASEB, 1995). The amount of MSG normally used in the human diet is 0.1-0.8% because MSG stops having a pleasant taste when higher amounts are used (Beyreuther et al., 2007; Yamaguchi and Ninomiya, 2000).

An important characteristic of MSG is that its salts dissociate in aqueous solutions, and glutamic acid is naturally present in high concentrations in the human body. Glutamic acid is responsible for several metabolic functions of extreme importance, and evidence from human subjects, rats and non-primates indicates that free glutamate functions as a signal to regulate protein intake and nutritional status as well as other physiological processes (Kondoh et al., 2009; Smriga and Torii, 2000).

Studies showed that the oral (Diniz et al., 2004) and parenteral (Diniz et al., 2005) administration of MSG also promoted increases in glycemia, insulin production and oxidative disorders. In addition, an experimental obese animal model has been developed by parenteral administration of high doses of MSG in neonatal mice. These studies reported

that MSG caused obesity and other disorders, such as hepatic diseases and type II diabetes (Nagata et al., 2006; Nakanishi et al., 2008). Nevertheless, long-term animal feeding studies have demonstrated that MSG does not increase food intake or induce obesity (Anantharaman, 1972; Newman et al., 1973).

Reports by Broberger (2005), Hermanussen et al. (2003ab, 2006), Rol de Lama et al. (1998) and Schwartz et al. (2000), amongst others, showed that parenteral (4.0 mg/g b.w.) or oral (2.5 and 5.0 g/day) administration of MSG in newborn rats resulted in an injurious effect on the arcuate nucleus of the hypothalamus. This administration of MSG provoked alterations in the control of appetite and, as a consequence, obesity. According to these authors, MSG can cause chronic hyperglutamatemia, which is an increase in the blood glutamate concentration. However, the amounts of glutamate that were administered were extremely high and did not reflect the doses that are usually used in food preparation.

Insulin resistance and hyperinsulinemia are metabolic dysfunctions involved in type II diabetes; when present and associated with dyslipidemia, obesity and cardiovascular diseases, these conditions constitute the so-called metabolic syndrome (Eckel et al., 2005; Després and Lemieux, 2006). In addition, increased weight and obesity have been found to depend on several factors, including the influences of genetics, metabolism, behavior and the environment (Stein and Colditz, 2004). Studies on the prevalence of metabolic syndrome performed with several populations, including the Japanese (Arai et al., 2006) and Chinese (Hsiao et al., 2009) populations, verified a significant increase in this disease worldwide due to lifestyle and dietary habits.

Recently, He et al. (2008) suggested that the ingestion of MSG through diet is an important factor in the increased incidence of obesity in healthy Chinese men and women. In contrast, Shi et al. (2010) reported that the MSG intake in a Chinese population from Jiangsu province was not associated with either obesity or clinically significant weight gain.

Thus, the aim of this study was to evaluate, in a subchronical study, the effects of adding MSG to the diet at concentrations of 1.0, 2.5 and 5.0% on the biochemical, hematological and histological parameters of male diabetic and non-diabetic wistar rats.

2. Material and Methods

2.1. Biological assay

Healthy male Wistar rats (weighing 40.0 ± 10.0 g, 21 days), reared in the vivarium of the University of Campinas (Unicamp), were used in this study. The experimental protocol was submitted to the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Biology Institute, IB/Unicamp. During the entire experimental period, the animals were housed under standard conditions of temperature (21 ± 2 °C) and humidity ($55 \pm 10\%$) with a 12-hour light/dark cycle, and the rats received a specific diet and water ad libitum. Body weight and food consumption were measured daily.

The animals were separated into four groups ($n = 12$). For a period of 70 days, one group (Control) received the commercial diet (Labina-Purina®, Paulínia, SP, Brazil), and the others received the commercial diet plus 1.0% MSG (1.0 gram MSG + 99.0 grams food), 2.5% MSG (2.5 gram MSG + 97.5 grams food) or 5.0% MSG (5.0 gram MSG + 95.0 grams food). At the end of the designated period, diabetes was induced, and the animals were distributed into eight groups ($n = 6$) and maintained on the same diets for an additional 21 days: C (non-diabetic/commercial diet), C-MSG 1.0% (non-diabetic/1.0% MSG diet), C-MSG 2.5% (non-diabetic/2.5% MSG diet), C-MSG 5.0% (non-diabetic/5.0% MSG diet), D (diabetic/commercial diet), D-MSG 1.0% (diabetic/1.0% MSG diet), D-MSG 2.5% (diabetic/2.5% MSG diet) and D-MSG 5.0% (diabetic/5.0% MSG diet) (Figure 1).

Diabetes was induced by streptozotocin. For this purpose, a freshly prepared solution of streptozotocin (50 mg/kg b.w.) in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5, was injected intraperitoneally into rats that were fasted overnight. After 24 hours, a blood sample was collected in vials from the tail vein of the overnight-fasted rats, and glucose levels were determined using the Accutrend GCT method (Roche Diagnostics®, Bern, Switzerland). Glucose levels were checked regularly to evaluate hyperglycemia, and animals showing marked hyperglycemia (glucose > 200 mg/dl) were selected for the study (Elliott et al., 1997; Freitas et al., 2007). Insulin (Novolin L, 100 U/mL) was injected intraperitoneally every two days to control hyperglycemia and to prevent animal mortality.

After treatment with streptozotocin, the animals (Groups D and D-MSG) showed higher glucose, ketone body and protein levels in the urine, which corroborated the diabetic condition in both groups (Uriquest, Labtest[®]).

One day before death, blood for amino acid analysis was collected from the eye vein in the morning after feeding. The blood was collected in 1.0 mL tubes containing the anticoagulant EDTA. At the end of the experimental period, the animals were fasted for 10 hours and sacrificed by exsanguination under anesthesia (sodium pentobarbital, 60 mg/kg b.w.); 5.0 mL of blood was collected in tubes without anticoagulant and centrifuged at 4000xg for 10 minutes at room temperature to obtain serum for the determination of biochemical parameters.

The kidneys and livers were collected for morphological evaluations. Fragments of the organs were removed and stored in formaldehyde solution (37%); the organ fragments were submitted to a routine histological technique using the hematoxylin-eosin method.

2.2. Biochemical analyses

The blood from the fasting rats was collected for biochemical analyses. The following biochemical parameters were evaluated in the blood serum: total proteins and albumin, total cholesterol and its fractions, triacylglycerols and glucose. These parameters were determined using the Modular Analytics system (Roche Diagnostics®, Berna, Switzerland).

2.3. Amino acid analysis

The Waters Pico-Tag System was used for the analysis of free amino acids (White et al., 1986; Hagen et al., 1989). Amino acid concentrations were measured by reverse-phase high-performance liquid chromatography (Shimadzu, SPD-20A/20AV UV-Vis Detectors; Bomb, LC20 AT; Column heater, CTO20A; Autosampler, SIL10AF; Software, LC Solution). For free amino acids in plasma, 50 µL of internal standard (TL-2- α -aminobutyric acid; Sigma-Aldrich[®]) was added to 250 µL of plasma. Proteins were precipitated with 200 µL of methanol. The collection tube was centrifuged at 6000xg for 15

minutes, and the supernatant was transferred to a fresh tube after filtration through a GV with PVDF membrane (Millex, Millipore®; pore 0.22 µm, diameter 13 mm). Phenylisothiocyanate (PITC, Edman's reagent; Thermo Scientific, Pierce Protein Research Product®) derivatives for reverse phase HPLC were prepared as previously described (Bidlemeier et al., 1984). Known amino acid standards (Amino Acid Standard H; Thermo Scientific, Pierce Protein Research Product®) were prepared and analyzed in tandem with the serum samples.

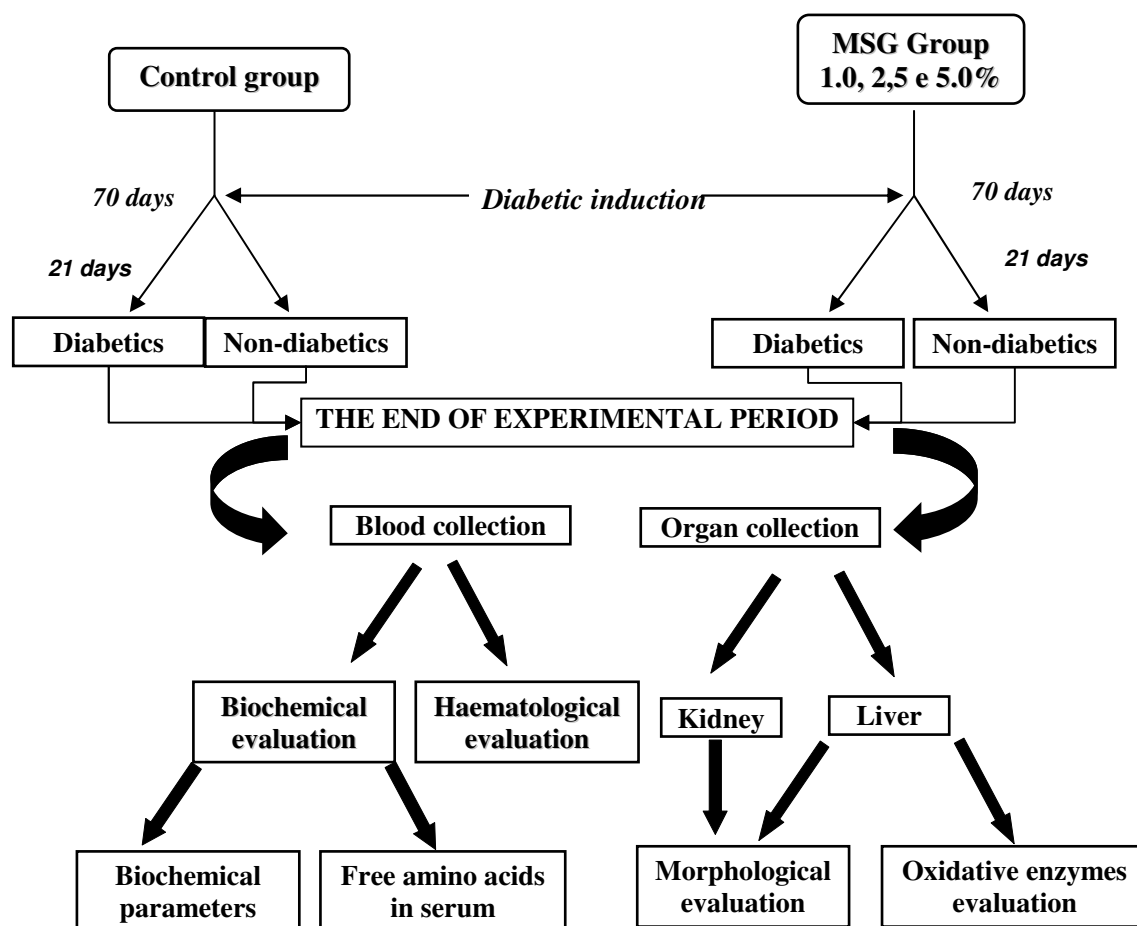


Figure 1 The experimental protocol used in this study.

2.4. Hematological analyses

The following hematological parameters in the blood were estimated using an Animal Blood Counter-ABC vet (Horiba ABX, France): white blood cells, red blood cells, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, red cell distribution width, platelet count and mean volume, lymphocytes, monocytes and granulocytes.

2.5. Oxidative enzymes evaluations

Levels of catalase, superoxide dismutase and glutathione in the animal livers were evaluated according to methods described by Cohen (1970), Winterbourn (1995) and Carlberg (1985).

2.6. Morphological evaluation

For the morphological evaluations of the kidney and liver, fragments of these organs were removed, stored in formaldehyde solution (37%) and submitted to a routine histological technique using the hematoxylin-eosin method.

2.7. Statistics

The GraphPad Prism program, version 5.0 (2008), was used for statistical analyses with a random block design according to the animals' weights. The two-way variance analysis (ANOVA) was used to determine the value for P, and the Bonferroni test was used to compare the means of significant values with a probability of 5%.

3. Results

Figures 2 summarizes the values for weight gain and diet consumption obtained for the groups; notably, food intakes were similar across groups. Significant differences among diabetic and non-diabetic groups that ingested MSG were not observed.

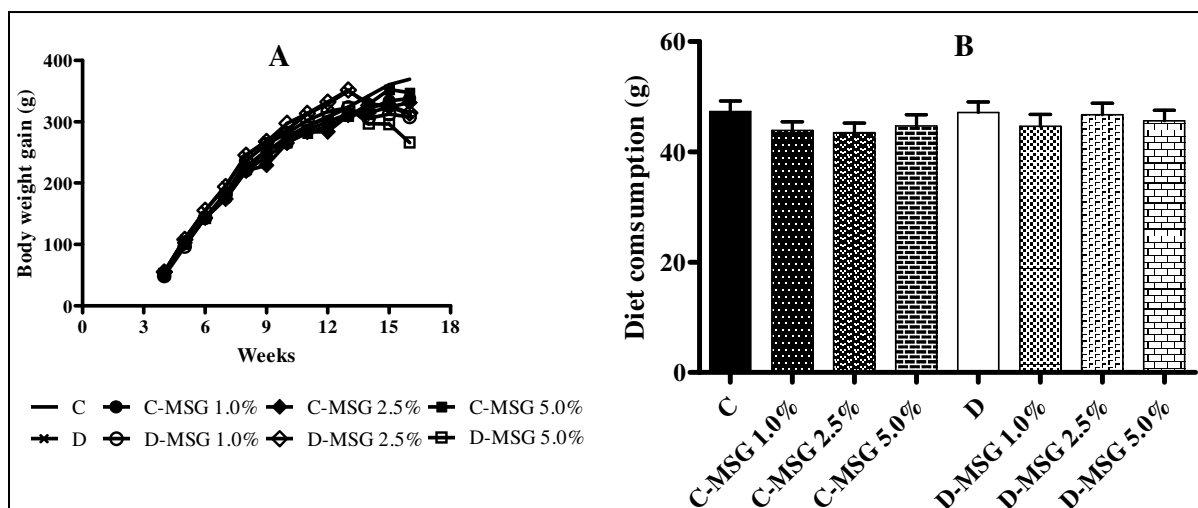


Figure 2: Body weight gain and diet consumption determined in the non-diabetic (C group) and diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%), diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%) and diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%).

The amounts of free glutamate found in the rat serum did not change (Figure 3), and no significant differences in the other amino acids, including aspartate, serine, glycine, histidine, arginine, threonine, alanine, proline, tyrosine, valine, methionine, cysteine, isoleucine, leucine, phenylalanine and lysine, were observed among the groups.

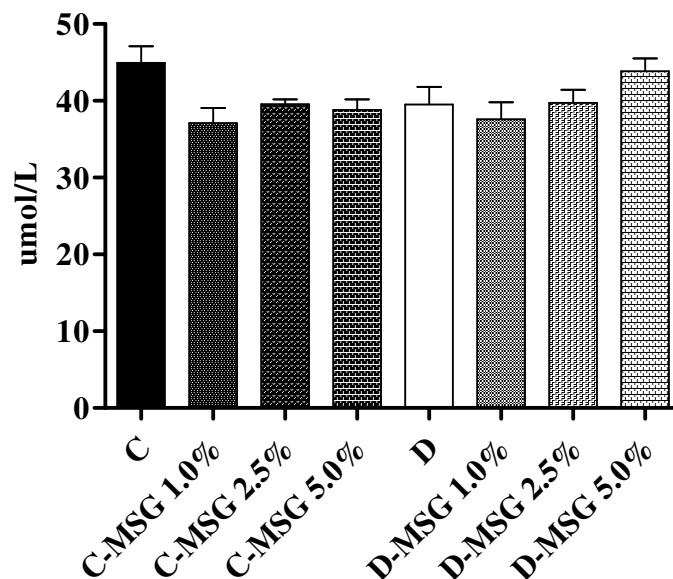


Figure 3: Free glutamate in serum determined in the non-diabetic (C group) and diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%), diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%) and diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%).

Serum glucose levels were high in the diabetic group compared to levels in the control animals; no significant effects of dietary MSG content were present in either group (Figure 4). The lipid profile for triglycerides and total cholesterol and fractions revealed no significant effects related to treatment (control, diabetes) or MSG ingestion, except for the significantly increased amounts of triglycerides in the diabetic groups (Figures 5). Table 1 shows the levels of hepatic enzymes that are indicative of oxidative stress. Superoxide dismutase was normal in the control group, but this enzyme was significantly decreased in the diabetic groups. No significant differences for glutathione or catalase were found among the groups.

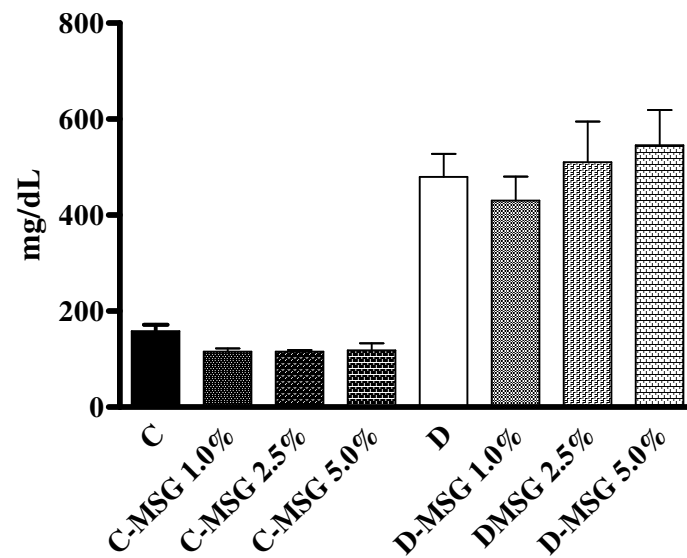


Figure 4: Blood glycemia determined in the non-diabetic (C group) and diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%). diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%) and diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%).

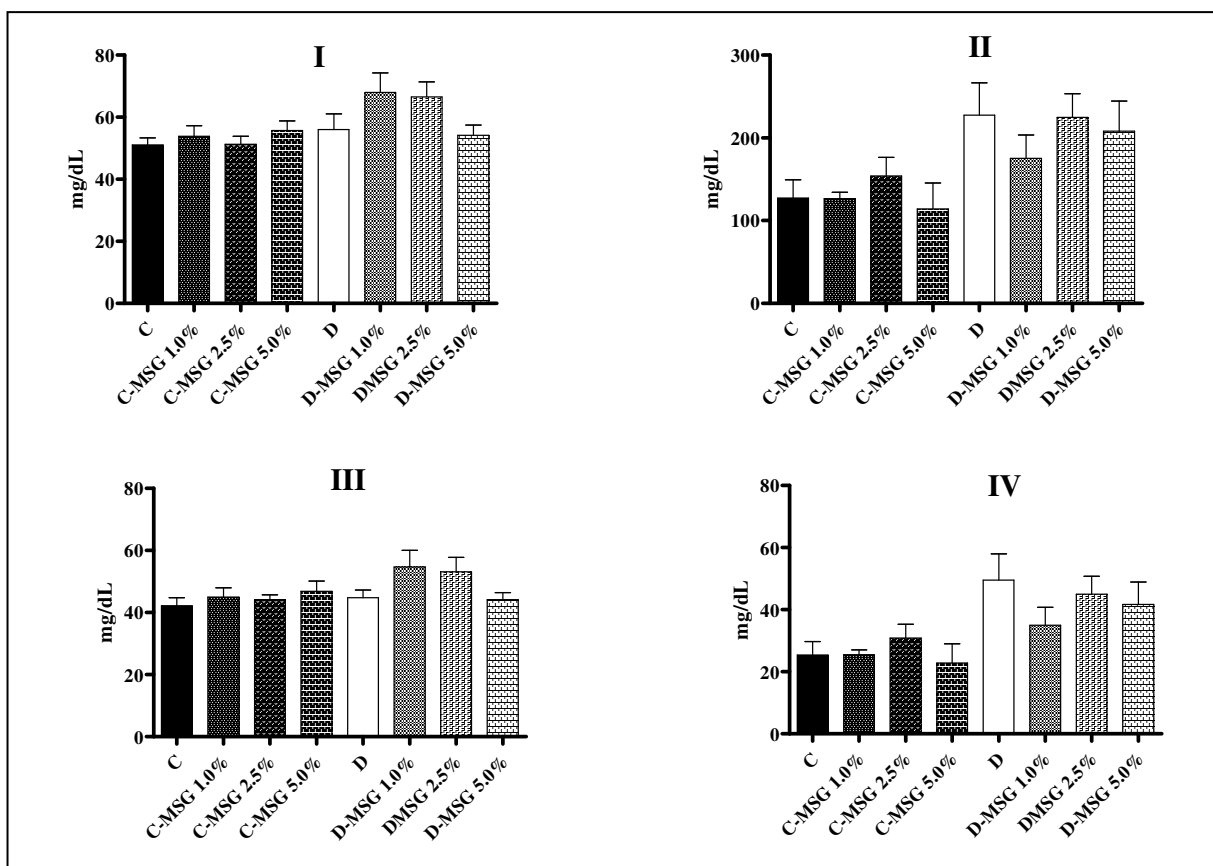


Figure 5: Triacylglycerol (I), total cholesterol (II), VLDL (III) and HDL (IV) determined in the non-diabetic (C group) and diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%), diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%) and diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%).

Table 1: Oxidative stress parameters determined in the blood of the rats for a period of 13 weeks ($P<0,05$): non-diabetic group (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%), diabetic group (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%).

<i>Parameters</i>	C	C-MSG 1%	C-MSG2.5%	C-MSG5%	D	D-MSG 1%	D-MSG2.5%	D-MSG5%
<i>Catalase</i> (U/ μ g protein.min)	0.025 $\pm$ 0.004	0.028 $\pm$ 0.004	0.025 $\pm$ 0.005	0.026 $\pm$ 0.006	0.022 $\pm$ 0.006	0.014 $\pm$ 0.002	0.014 $\pm$ 0.001	0.021 $\pm$ 0.003
<i>Superoxide dismutase</i> (U/ μ g protein)	0.712 $\pm$ 0.147	0.516 $\pm$ 0.237	0.586 $\pm$ 0.167	0.671 $\pm$ 0.112	0.188 $\pm$ 0.019	0.099 $\pm$ 0.023 ^e	0.081 $\pm$ 0.039	0.122 $\pm$ 0.014
<i>Glutathione</i> (nmol/ μ g protein.min)	0.141 $\pm$ 0.017	0.133 $\pm$ 0.028	0.153 $\pm$ 0.034	0.163 $\pm$ 0.036	0.162 $\pm$ 0.007	0.146 $\pm$ 0.016	0.169 $\pm$ 0.031	0.167 $\pm$ 0.048

^aSignificant difference from group C; ^bSignificant difference from group C-MSG 1.0%; ^cSignificant difference from group C-MSG 2.5%;

^dSignificant difference from group C-MSG 5.0%; ^eSignificant difference from group D; ^fSignificant difference from group D-MSG 1.0%;

^gSignificant difference from group D-MSG 2.5%; ^hSignificant difference from group D-MSG 5.0%

No alterations in morphology were observed in the livers of the control group animals (Figure 6), but lipid inclusion was observed in the diabetic animals; however, significant differences in lipid inclusions among the groups fed MSG were not observed (Figure 7). No alterations in morphology were observed in the kidneys of the rats, and these results were independent of diet and diabetic condition (Figure 8 and 9).

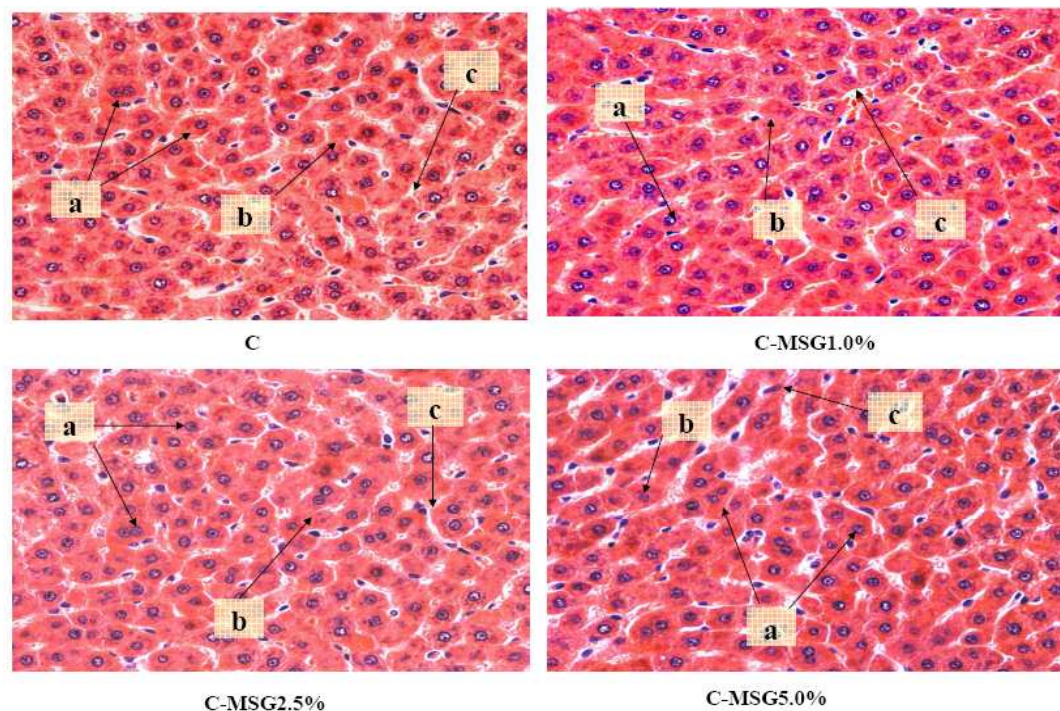


Figure 6: Photomicrograph (X40) of liver cross sections from non-diabetic (C group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%) and non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%), stained with HE. Observe the whole hepatocytes with one or two nuclei (a), normal cytoplasm with no granulosity or Kupffer cells (b) located between the hepatocytes and sinusoids (c). Lymphocytic infiltration was not observed.

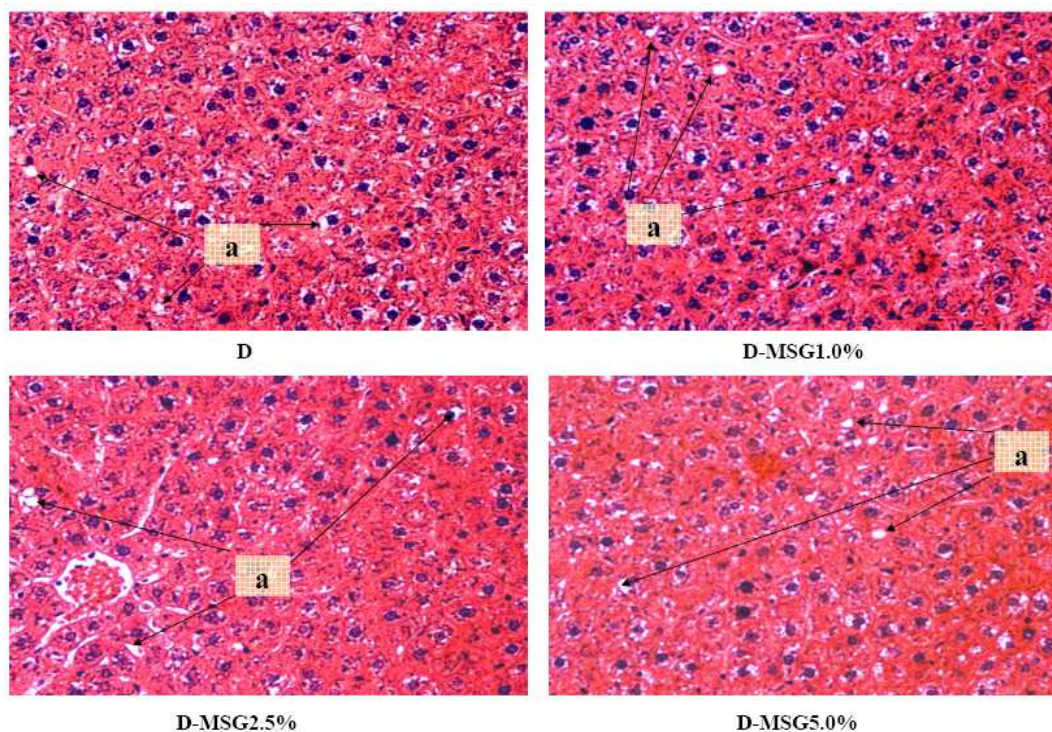


Figure 7: Photomicrograph (X40) of liver cross sections from diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%) and diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%)], stained with HE. Observe the whole hepatocytes with lipid inclusions in the cytoplasm (a). Lymphocytic infiltration was not observed.

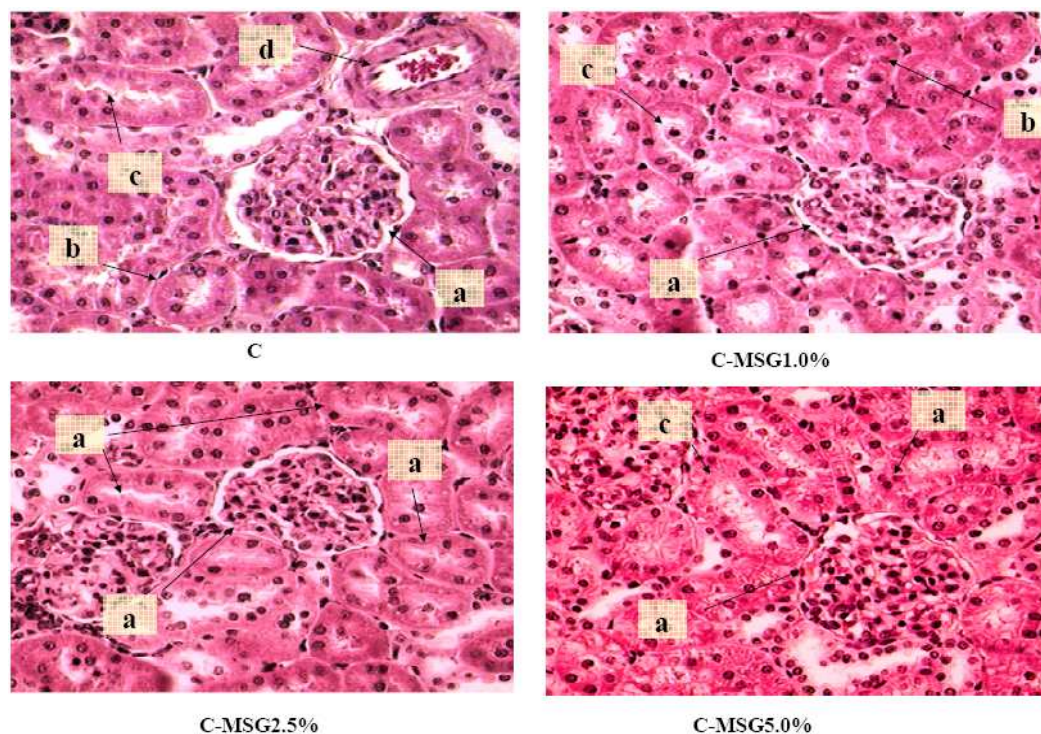


Figure 8: Photomicrograph (X40) of left kidney cross sections from non-diabetic (C group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%) and non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%)), stained with HE. Bowman's capsule with the capillaries forming a whole glomerulus (a). Proximal convoluted tubules are more numerous with narrow lumens and an epithelium with a brush-like border (b). Fewer distal convoluted tubules with slightly larger lumen and an epithelium showing no apical differentiation (c). Presence of blood capillaries (d).

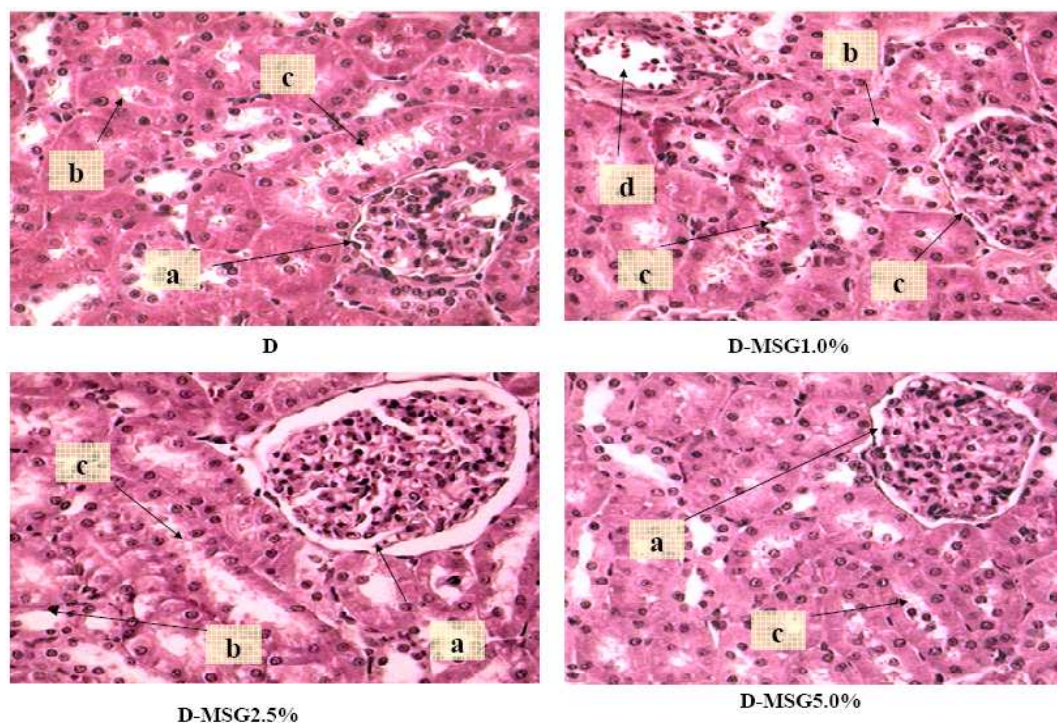


Figure 9: Photomicrograph (X40) of left kidney cross sections from diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%), diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%), stained with HE. Bowman's capsule with the capillaries forming a whole glomerulus (a). Proximal convoluted tubules are more numerous with narrow lumens and an epithelium with a brush-like border (b). Fewer distal convoluted tubules with slightly larger lumen and an epithelium showing no apical differentiation (c). Presence of blood capillaries (d).

With respect to the hematologic profile (Table 2), no changes in anemia or platelet reduction were observed. However, the total white blood cell (WBC), lymphocyte, monocyte and granulocyte counts were decreased in the diabetic groups. The C-MSG 5.0% group presented a mild decrease in the monocyte count.

Table 2: Hematological parameters determined in the blood of the rats for a period of 13 weeks (P<0,05): non-diabetic group (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%); diabetic group (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%).

Parameters	C	C-MSG _{1%}	C-MSG _{2.5%}	C-MSG _{5%}	D	D-MSG _{1%}	D-MSG _{2.5%}	D-MSG _{5%}
<i>Red blood cells</i>	9.05±1.99	8.20±0.948	8.68±0.45	8.63±0.73	7.00±2.69	8.49±0.94	8.80±0.39	8.06±0.83
<i>Hemoglobin</i>	17.53±1.66	15.93±1.50	16.88±0.76	17.00±1.88	16.90±1.08	16.67±1.94	16.77±0.56	15.74±0.98
<i>Hematocrit</i>	50.1±5.82	44.23±5.28	47.52±2.30	47.98±5.61	49.93±2.40	47.97±5.72	50.43±2.75	45.30±4.62
<i>MCV*</i>	55.67±1.21	53.83±2.48	54.83±1.33	54.83±1.33	55.20±2.05	56.50±1.05	55.50±1.38	56.20±1.30
<i>MCH*</i>	19.50±0.42	19.47±1.02	19.43±0.74	19.43±0.68	18.94±0.78	19.63±0.45	19.07±0.66	19.58±0.90
<i>MCHC*</i>	35.03±1.02	36.15±1.11	35.53±0.873	35.48±0.70	33.85±1.30	34.80±0.82	34.27±1.45	34.78±1.55
<i>RCDW*</i>	13.50±0.71	13.20±0.51	13.12±0.66	13.63±0.37	14.38±0.92	14.42±1.17	14.75±0.60	14.60±0.27
<i>Platelet Count</i>	7.48±0.47	7.55±0.56	7.23±0.30	7.65±0.63	8.20±0.56	7.18±0.56	7.65±0.55	7.62±0.59
...								
<i>White blood cells</i>								
<i>Lymphocyte</i>	5.27±1.26	4.65±1.34	5.25±0.70	4.13±0.83	3.74±1.4	2.53±1.24	3.47±0.96	3.32±1.06
<i>Monocyte</i>	0.70±0.15	0.68±0.19	0.80±0.19	0.60±0.14 ^c	0.42±0.17 ^{a,b,c}	0.42±0.17 ^{a,b,c}	0.53±0.19 ^{a,b,c}	0.52±0.084 ^{a,b,c}
<i>Granulocyte</i>	3.08 ± 0.68	3.90 ± 0.97	3.25 ± 0.95	2.83 ± 0.82	2.56 ± 0.83 ^b	2.28 ± 0.61 ^b	2.28 ± 0.71 ^b	2.42± 0.29 ^b

^aSignificant difference from group C; ^bSignificant difference from group C-MSG 1.0%; ^cSignificant difference from group C-MSG 2.5%;

^dSignificant difference from group C-MSG 5.0%; ^eSignificant difference from group D; ^fSignificant difference from group D-MSG 1.0%;

^gSignificant difference from group D-MSG 2.5%; ^hSignificant difference from group D-MSG 5.0%; *MCV (Mean Corpuscular Volume); MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin); MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration); RCDW (Red Cell Distribution Width).

4. Discussion

Several authors have reported that the parenteral (4.0 mg/kg bw) (Rol de Lama et al., 1998; Schwartz et al., 2000; Broberger, 2005) or oral (2.5 and 5.0 g/day) (Hermanussen et al., 2003ab, 2006) administration of MSG in rodents may cause chronic hyperglutamatemia, which is an increased level of glutamate, in the blood of newborn rats. This causes injurious effects on the hypothalamic arcuate nucleus and changes appetite control, resulting in obesity. However, the glutamate in these studies was administered via parenteral or at very high oral levels, which does not reflect its recommended use as an additive in food preparation.

Due to its sensorial properties, the amount of MSG normally used in the human diet is between 0.1-0.8% (Lölinger, 2000; Beyreuther et al., 2007). In our study, we used diets containing MSG at levels of 1.0%, 2.5 and 5.0%. The food intake was similar across all of the groups (Figure 2) and the amount of MSG ingested by the groups reflected the amount included in the diet. Consequently, the ingestion of diets containing up to 5% MSG did not induce obesity, nor increase diet consumption, in newly weaned rats (21 days of age) when they consumed diets *ad libitum* for a period of 70 days.

Hermanunsenn et al. (2006), who verified weight gain in rats fed diets containing 2.5 g and 5.0 g of MSG in the diet. In contrast, Kondoh and Torii (2008) reported a difference in body weight gain between Sprague-Dawley rats receiving a 1.0% MSG solution for drinking (MSG group) and a “control group” receiving only water for drinking, that were fed diets of varying caloric density, fat and carbohydrate contents. The authors concluded that the voluntary ingestion of an MSG solution reduced weight gain and did not affect food intake. The present study used the dosages of 1.0%, 2.5 and 5.0% MSG in the diet. No increased weight gain was observed as well as increased diet consumption was not affected during the experimental period, among the control and the rats that ingested MSG, for both non-diabetic and diabetic animals (Figure 2). These data indicate that before and after the diabetes induction period, there were no significant differences between the groups receiving the commercial diet and those receiving the commercial diet plus MSG.

Even when relatively large quantities of MSG are added to the food of mice, monkeys or humans, only very small changes in the plasma concentration of glutamate have been

reported to occur (Stegink et al., 1985, 1987; Tsai & Huang, 2000). Our findings corroborate these previous results; the level of free glutamic acid in the serum (Figure 3) showed no differences between the control group and those that received MSG in their diet. The mean free glutamate concentration in the serum was 40.14 $\mu\text{mol/L}$ for all of the groups. According to Reeds et al. (1996), almost all of the free glutamate that is ingested is metabolized (95%) in the intestinal wall of pigs during the absorption process.

Similar to the results of a study reported by Simon & West (1992), who induced a diabetic state with a single intraperitoneal dose (45 mg/kg b.w.) of STZ in rats, all of the animals that were treated with STZ (50 mg/kg b.w.) in this study (groups D, D-MSG 1.0%, D-MSG 2.5%, D-MSG 5.0%) presented increased serum glucose levels, indicating a diabetic condition in relation to the control groups (C, C-MSG 1.0%, C-MSG 2.5%, C-MSG 5.0%). However, no differences in blood glucose levels occurred among the diabetic and the control animals that ingested different amounts of MSG in their diet (Figure 4).

The rat serum lipid profiles (triacylglycerols, total cholesterol, HDL and VLDL) indicated that the diabetic animals exhibited increased concentrations of these lipids compared to the non-diabetic animals and that this increase was independent of the addition of MSG to the diet at the concentrations studied (Figures 5). These alterations may be attributed to the metabolic changes induced by the diabetic condition.

Studies performed on non-diabetic mice have correlated the histological hepatic changes caused by nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) to increased plasmatic lipids generated by the oral (Collison et al., 2008) and subcutaneous (Nakanishi et al., 2008) administration of MSG. In contrast to the observations made by these authors, in the present study the hepatic histological analyses of the non-diabetic rats showed preserved hepatocytes and absence of lipid inclusions, likely due to the lack of alterations in the serum lipid levels in these animals. These results were independent of the addition of MSG to the diet (Figure 6). On the other hand, the diabetic groups (D, D-MSG 1.0%, D-MSG 2.5%, D-MSG 5.0%) showed lipid inclusions in the cytoplasm of the hepatocytes (Figure 7), suggesting that nonalcoholic hepatic steatosis occurred in all of the diabetic groups independent of the addition of MSG to the diet. This condition likely occurred as a result of the increased concentration of triacylglycerols in the serum of the diabetic animals, as

previously reported. In fact, diabetes and dyslipidemias are important risk factors in the genesis of nonalcoholic hepatic steatosis (Marchesini et al., 2003; D'Angelo et al., 2009).

The presence of superoxide dismutase (SOD) in the hepatocytes or blood plasma reduces the formation of superoxide radicals, protecting the cells from oxidative damage (Fridovich, 1995). Catalase is another potent antioxidant enzyme, especially against the superoxide radical and singlet oxygen. A decrease in the levels of hepatic SOD enzymes and catalase was observed in the diabetic rats, and this was correlated to the presence of MSG in the diet. In contrast, no significant changes in glutathione levels were observed among the studied groups. The non-diabetic animals exhibited no significant changes in the activity of these enzymes, and this result was independent of the addition of MSG to the diet (Table 1). The decrease in SOD activity that was observed in the diabetic groups could be due to the reduced availability of NADPH caused by this disease. This observation was reported by Singh & Ahluwalia (2003) and Farombi & Onyema (2006), who administered MSG subcutaneously in non-diabetic animals.

As previously reported, the high glucose levels caused by diabetes may result in peroxidation of cell membrane lipids, including those of red blood cells. Peroxidation of red blood cells likely occurs by glucose enolization, the production of α -ketoaldehydes and free radical intermediates; this process reduces molecular oxygen and, as a consequence, causes hemolysis due to membrane weakening (Jain, 1989). However, even at high glucose levels, insignificant differences were observed in the blood cell count or in the hemoglobin and hematocrit levels. There was also no alteration in the platelet count. In contrast, a significant reduction in the white cell count (lymphocytes, monocytes and granulocytes) was observed in the diabetic animals, and this was independent of the addition of MSG to the diet (Table 2). This occurs due to the metabolic changes induced by the diabetic condition, reducing immunologic function and increasing the risk of infection (Alberti and Zimmet, 1998; Tan et al., 2000).

5. Conclusions

Male Wistar rats oral exposed to MSG, at levels up to 5.0% in the diet, during 13 weeks, did not shown alterations in biochemical, hematological and histological parameters in relation to the control group. The biochemical and histological alterations observed in the diabetic animals (diabetes was induced after the 13 weeks exposure and the animals maintained under the same diets for additional 3 weeks) mainly reflected metabolic changes that are characteristic of this disease, and they were independent of the addition of MSG to the diet.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the partial financial support received from the Brazilian Foundation for Improvement of Higher Education (CAPES) and the International Glutamate Technical Committee (IGTC).

References

- Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P.Z., 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.* 15, 539-553.
- Anantharaman, K., 1972. In utero and dietary administration of monosodium Lglutamate to mice: reproductive performance and development in a multigenerationstudy, in L. J. Filer, S. Garattini, M. R. Kare, W. A. Reynolds, & R. J. Wurtman (Eds.), *Glutamic acid: advances in biochemistry and physiology*. Raven Press, New York, pp. 231–254.
- Arai, H, Yamamoto, A., Matsuzawa, Y., Saito, Y., Yamada, N., Oikawa, S., Mabuchi, H., Teramoto, T., Sasaki, J., Nakaya, N., Itakura, H., Ishikawa, Y., Ouchi, Y., Horibe, H., Shirahashi, N., Kita, T., 2006. Prevalence of metabolic syndrome in the general Japanese population in 2000. *J. Atheroscler. Thromb.* 13(4), 202-208.

- Beyreuther, K., Biesalski, H.K., Fernstrom, J.D. Grimm, P., Hammes, W.P., Heinemann, U., Kempfski, O., Stehle, P., Steinhart, H., Walker, R., 2007. Consensus meeting: monosodium glutamate - an update. *Eur. J. Clin. Nutr.* 61, 304-313.
- Bidlingmeyer, B. A., Cohen, S. A., Tarvin, T. L., 1984. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J Chromatogr.* 336(1), 93-104.
- Broberger C., 2005. Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *J. Int. Med.* 258, 301–27.
- Carlberg, I., Mannevik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113, 484-499.
- Cohen G, Dembiec D, Marcus J., 1970. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal Biochem.* 34, 30-38.
- Collison, K. S., Maqbool, Z., Saleh, S.M., Inglis, A., Makhoul, N. J., Bakheet, R., Al-Johi, M., Al-Rabiah, R., Zaidi, M. Z., Al-Mohanna, F. A., 2008. Effect of dietary monosodium glutamate on trans fat-induced nonalcoholic fatty liver disease. *J. Lipid. Res.* 11.
- D'Angelo, M. G. B.; Actis, A. M.; Outomuro, D., 2009. Hígado Graso no Alcohólico: una entidad cada vez más frecuente y de pronóstico incierto. *Rev. Gastroenterol. Perú* 29 (1), 44-50.
- De Freitas Mathias P.C., Grassioli S, Rocha D. N, Scomparin D. X, Gravena C., 2007. Transplantation of pancreatic islets from hypothalamic obese rats corrects hyperglycemia of diabetic rats. *Transplant Proc.* 39 (1), 193-5.
- Després, J. P., Lemieux, I., 2006. Abdominal obesity and metabolic syndrome, *Nature* 444 (7121), 881-887.
- Diniz, Y. S., Fernandes, A. A. H., Campos, K. E., Mani, F., Ribas, B. O., Novelli, E. L. B., 2004. Toxicity of hypercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. *Food Chem. Toxicol.* 42, 313–319,

- Diniz, Y. S., Faine, L. A., Galhardi, C. M., Rodrigues, H.G., Ebaid, G. X, Burneiko, R. C., Cicogna, A. C., Novelli, E. L.B., 2005. Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. *Nutrition* 21(6), 749–755
- Elliott, J. I., Ewchand, H., Altmann, D. M., 1997. Streptozotocin-induced diabetes in mice lacking alphabeta T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 109, 116-120.
- Farombi, E. O, Onyema, O. O., 2006. Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. *Hum. Exp. Toxicol.* 25(5), 251-9.
- Fridovich I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutase. *Annu Rev Biochem.*, 64, 97-112.
- Hagen, S. R., Frost, B., Augustin, J., 1989. Precolumn Phenylisothiocyanate Derivatization and Liquid-Chromatography of Amino-Acids. *Food. J. Assoc. Offic. Anal.* 72 (6), 912-916.
- He, K., Zhao, L., Daviglus, M. L., Dyer, A. R., Van Horn, L., Garside, D., Zhu, L., Guo, D., Wu, Y., Zhou, B., Stamler, J., 2008. Association of monosodium glutamate intake with overweight in Chinese adults: the INTERMAP Study; INTERMAP Cooperative Research Group. *Obesity (Silver Spring)*. 16 (8), 1875-80.
- Hermanussen, M.; García, A. P.; Sunder, M.; Voigt, M.; Salazar, V.; Tresguerres, J. A. F., 2006. Obesity, voracity, and short stature: the impact of glutamate on the regulation of appetite. *Eur J Clin Nutr.* 60, 25–31.
- Hermanussen, M.; Tresguerres, J.A.F., 2003a. Does high glutamate intake cause obesity? *J. Pediatr. Endocrinol. Metabol.* 16, 965-968.
- Hermanussen, M.; Tresguerres J.A.F., 2003b. Does the thrifty phenotype result from chronic glutamate intoxication? *J. Perinat. Med.* 31, 489-495.
- Hirata, A. E., Andrade, I. S., Vaskevicius, P., Dolnikoff, M. S., 1997. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30(5), 671-674.

- Hsiao, F. C., Wu, C. Z., Hsieh, C. H., He, C. T., Hung, Y. J., Pei, D., 2009. Chinese Metabolic Syndrome Risk Score. *South Med J.* 102(2), 159-64.
- Iwase, M., Yamamoto, M., Iino, K., Ichikawa, K., Shinohara, N., Yoshinari, M., Fujishima, M., 1998. Obesity induced by neonatal monosodium glutamate treatment in spontaneously hypertensive rats: an animal model of multiple risk factors. *Hypertens. Res.*, 21(1), 1-6.
- Jain, S.K., 1989. Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *J. Biol. Chem.* 264(35), 21340-21345.
- Jinap, S., Hajeb P., 2010. Glutamate. Its applications in food and contribution to health. *Appetite*: doi:10.1016/j.appet.2010.05.002.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1988. L-glutamic acid and its ammonium, calcium, monosodium and potassium salts, in: *Toxicological evaluations of Certain Food Additives and Contaminants*. Cambridge University Press New York, pp 97-161.
- Kondoh, T; Torii, K., 2008. MSG intake suppresses weight gain, fat deposition, and plasma leptin levels in male Sprague-Dawley rats. *Physiol. Behav.* 95(1-2), 135-44.
- Kondoh T, Mallick HN, Torii K., 2009. Activation of the gut-brain axis by dietary glutamate and physiologic significance in energy homeostasis. *Am J Clin Nutr.* 90(3):832S-837S.
- Löliger, J., 2000. Function and importance of glutamate for savory foods. *J Nutr*, 130 (4S Suppl):915S-920S.
- Marchesini G., Bugianesi, E., Forlani, G., 2003. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatol.* 37(4), 917-923.
- Nagata M., Suzuki W, Iizuka S., Tabuchi M., Maruyama H., Takeda S, Aburada M, Miyamoto K., 2006. Type 2 diabetes mellitus in obese mouse model induced by monosodium glutamate. *Exp Anim.* 55(2), 109-115.

- Nakajima, H., Tochino, Y., Fujino-Kurihara, H., Yamada, K., Gomi, M., Tajima, K., Kanaya, T., Miyazaki, A., Miyagawa, J., Hanafusa, T., 1985. Decreased incidence of diabetes mellitus by monosodium glutamate in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 50(2), 251-257.
- Nakanishi, Y., Tsuneyama, K., Fujimoto, M., Salunga, T. L., Nomoto, K., An, J. L., Takano, Y., Iizuka, S., Nagata, M., Suzuki, W., Shimada, T., Aburada, M., Nakano, M., Selmi C, Gershwin ME., 2008. Monosodium glutamate (MSG): a villain and promoter of liver inflammation and dysplasia. *J. Autoimmun.* 30(1-2), 42-50.
- Reeds P. J.; Burrin, D. G., Jahoor, F., 1996. Enteral glutamate is almost completely metabolized in first pass by the gastrointestinal tract of infant pigs. *Am. J. Physio.* 1270, 413-418.
- Reeds, P. J., 2000. Dispensable and indispensable amino acids for humans. *J. Nutr.* 130 (7), 1835-1840.
- Rol de Lama, M. A.; Perez Romero, A.; Ariznavarreta, C.; Hermanunssen, M.; Tresguerres, J. A. F., 1998. Periodic growth in rats. *Ann. Hum. Biol.* 25 (5), 441-451.
- Schwartz, M. W.; Woods, S. C.; Porte Jr, D.; Seeley, R. J.; Baskin, D. G., 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404, 661–671.
- Shi, Z., Luscombe-Marsh, N.D., Wittert, G.A., Yuan, B., Dai, Y., Pan, X., Taylor, A.W., 2010. Monosodium glutamate is not associated with obesity or a greater prevalence of weight gain over 5 years: findings from the Jiangsu Nutrition Study of Chinese adults. *Br. J. Nutr.* 7, 1-7.
- Simon, O. R., West, M. E., 1992. Unstable diabetic state produced by small dose streptozotocin in rats. *W. I. Med. J.* 42, 146-149.
- Singh, K., Ahluwalia, P., 2003. Studies on the effect of monosodium glutamate [MSG] administration on some antioxidant enzymes in the arterial tissue of adult male mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 49(2), 145-148.

- Smriga M, Torii K., 2000. Release of hypothalamic norepinephrine during MSG intake in rats fed normal and nonprotein diet. *Physiol. Behav.* 70, 413–415.
- Stegink, L. D., Filer, L. J. Jr, Baker G. L., 1985. Plasma glutamate concentrations in adult subjects ingesting monosodium L-glutamate in consommé. *Am. J. Clin. Nutr.* 42, 220-225.
- Stegink, L. D., Filer, L. J. Jr, Baker, G. L., 1987. Plasma amino acid concentrations in normal adults ingesting aspartame and monosodium L-glutamate as part of a soup/beverage meal. *Metabolism.* 36(11), 1073-1079.
- Stein, C.J., Colditz, G.A., 2004. The epidemic of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89(6), 2522–2525.
- Tan, K. C., Mackay, I. R., Zimmet, P. Z., Hawkins, B. R., Lam, K. S., 2000. Metabolic and immunologic features of Chinese patients with atypical diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 23, 335-338.
- Tsai, P. J., Huang, P. C., 2000 Circadian variations in plasma and erythrocyte glutamate concentrations in adult men consuming a diet with and without added monosodium glutamate. *J Nutr.* 130 (4S Suppl), 1002S-4S
- Winterbourn, C. C., Hawkins, R. E.; Brian, M., Carrel R. W., 1975. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J. Lab. Clin. Med.* 85, 337-341.
- White, J. A., Hart, R. J., Fry, J. C., 1986. An Evaluation of the Waters Pico-Tag System for the Amino-Acid-Analysis of Food Materials. *J. Automat.Chem.* 8 (4), 170-177.
- Yamaguchi, S., Ninomiya, K., 2000. Umami and food palatability. *J Nutr.* 130(4S Suppl), 921S-6S.

Capítulo 3



Avaliação eletrocardiográfica de ratos Wistar diabéticos e não diabéticos alimentados com glutamato monossódico

Este artigo será submetido para publicação na Journal of Electrocardiology.

Electrocardiographic evaluation of diabetic and non-diabetic Wistar rats fed with monosodium glutamate.

Abstract

Some studies have recently indicated that MSG is linked to obesity and diabetes. These diseases can cause cardiovascular changes, such as increases in blood pressure and arrhythmias including ventricular fibrillation that may result in sudden death. Twenty-one-day-old Wistar rats were fed with diets containing 0.0, 1.0, 2.5 or 5.0% monosodium glutamate (MSG) for 70 days. Diabetes was then induced with streptozotocin (STZ; 50 mg/kg bw) in half of the rats, and after an additional 21 days, the electrocardiographic parameters and heart histology were evaluated for each rat. The presence of MSG in the diet did not change the parameters evaluated between the experimental groups. Although the diabetic rats presented a reduction in heart rate as well as an enlargement of the QRS complex and QT and QTc intervals, these changes are typical of STZ-induced diabetes. No histological alterations were observed in any of the groups studied. In summary, diets containing MSG did not interfere with the electrocardiographic and histological characteristics of either diabetic or non-diabetic rats.

Key words: monosodium glutamate (MSG), electrocardiogram, diabetes.

Introduction

The sodium salt of glutamic acid, called monosodium glutamate (MSG), is used worldwide as an additive in several foods (e.g., snacks, sauces and soups) to enhance their flavor. Glutamate is naturally present in the human body and has several important metabolic functions. In addition, studies involving humans, rats and non-primates have indicated that free glutamate functions as a signal to regulate protein intake, nutritional status and other physiological processes^{1;2;3}. As an additive, MSG normally accounts for 0.1-0.8% of a food because it stops having a pleasant taste when higher amounts are added^{4;5}. A study in young pigs indicated that enteral glutamate is extensively oxidized even when the dietary intake is three- to four-fold higher than normal⁶.

In the European Union (EU) countries, the mean intake of glutamate ranges from 0.3 to 0.5 g/day, but in Asian countries, people consume an average of 1.2–1.7 g/day. Individual glutamate intake from food additives, however, shows broad variations; high consumers in Europe may reach up to 1.0 g/day, and in Asian countries up to 4.0 g/day. The average intake in EU countries has only increased slightly since 1997⁴.

In its last evaluation in 1987, the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) established a Group Acceptable Daily Intake (ADI) “not specified” for L-glutamic acid and its monosodium, potassium, calcium, magnesium and ammonium salts for their use as food additives in the functional classes of flavor enhancer or salt substitute. JECFA applies the designation “ADI not specified” to food additives shown to have very low toxicity based on available chemical, biochemical, toxicological and other data (i.e., the total dietary intake of the substance arising from its use at the levels necessary to achieve the desired effect combined with its background in foods does not, in the opinion of the Committee, represent a hazard to human health)^{7;8}.

In 1958, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) considered MSG to be a Generally Recognized as Safe (GRAS) ingredient. In 1992, however, the FDA contracted the Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), an independent scientific organization, to review the scientific data related to the safety of MSG. In its report, FASEB concluded that there was no scientifically verifiable evidence of adverse health effects to the general population caused by MSG at levels normally consumed due to its use as a food ingredient⁹.

Despite the evaluations, a new hypothesis has been recently raised linking obesity, voracity and growth hormone (GH) deficiency to the consumption of elevated amounts of glutamate¹⁰. The metabolic syndrome, which can be consequent to obesity, is a common metabolic disorder that results from the increasing prevalence of obesity, and it is associated with type II diabetes and cardiovascular disease¹¹. Diabetes is a metabolic disorder characterized by increased blood glucose resulting from alterations in the metabolism of proteins, lipids and carbohydrates due to the impaired secretion of or peripheral resistance to insulin. These alterations increase the tendency to develop cardiovascular diseases and neuropathies, which represent one of the major causes of death of the patients^{12;13}. The prevalence of excess weight and cardiovascular disease is increasing rapidly across Brazil, and currently nearly 65% of the adult population is overweight or obese^{14;15}. Flegal¹⁶ reported that 32.2% of adult men and 35.5% of adult women are overweight, but the increases in the prevalence of obesity previously observed do not appear to have continued at the same rate over the past 10 years, particularly for women and possibly for men.

An electrocardiogram (ECG) is the most common cardiovascular diagnostic procedure¹⁷, particularly because ECGs provide much information in relatively little space. An ECG is a time/voltage graph of the electrical activity of the heart. Cardiac muscle activity also generates electrical impulses, and usually muscle contraction, which creates the pulse, follows the electrical activity. Although there are many factors that can influence cardiac function, measurement of the time of electrical conduction and the voltage involved usually indicates the function, with different parts of the ECG complex representing different stages of conduction¹⁸. Muscle electrical activity occurs via the movement of sodium, calcium and potassium ions across the cell membrane. This ion movement changes the charge of the cell membrane from its resting state of 90 millivolts (mV) such that its polarity is lost, resulting in the cell becoming electrically excitable (depolarization). When the normal ion balance and cell membrane polarity are restored, the electrical excitability ceases (repolarization). The normal sinus rhythm complex comprises a P wave, PR interval, Q wave, QRS complex, ST segment, T wave and occasionally a U wave. In this study, the P wave, PR interval, Q wave and QRS complex were evaluated because these parameters can be altered in patients with diabetes. The P wave, representing atrial depolarization, is

relatively broad and shallow. The PR interval is measured from the beginning of the P wave to the beginning of the Q wave or in the absence of Q waves, to the beginning of the R wave. The Q wave, representing the first negative deflection, is caused by depolarization through the septum (muscle wall) that separates the left and right ventricles and through which the ventricular conduction pathway passes, and it is usually small or absent, depending on the electrical view or the lead used. The QRS complex represents ventricular depolarization. Because a large amount of voltage is required for ventricular depolarization, the QRS complex is the highest component of the sinus rhythm. A specialized conduction pathway comprising the His bundle, bundle branches, hemi-branches and Purkinje fibers ensures that the impulses travel quickly from the AV node to the ventricular muscle. The QT interval, representing the total ventricular depolarization and repolarization time, is measured from the beginning of the Q wave to the end of the T wave and should be less than half the time of the preceding R-R interval. Prolonged QT intervals represent delayed repolarization, which may cause tachydysrhythmias (i.e., dysrhythmias with rates over 100 bpm and often considerably faster) and sudden cardiac death¹⁹.

Taking the possible association of obesity, type II diabetes and cardiovascular disease with the ingestion of MSG into consideration, the aim of this study was to investigate the effects of MSG oral administration on the electrical conduction and histological dysfunctions of the heart in diabetic and non-diabetic Wistar rats.

Material and Methods

Animals

Healthy male Wistar rats weighing 52.0 ± 3.0 g and 21-days-old were used for this investigation. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Biology Institute, IB/Unicamp (Protocol nº1075-1). During the entire experimental period, the animals were housed in the Vivarium of the University of Campinas (Unicamp) under standard conditions of temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 10\%$) with a 12-hour light/dark cycle and received diet and water ad libitum. Body weight and diet consumption were measured at the beginning and the end of the

experimental period. The control group (C) received a commercial diet (Labina-Purina - Paulínia, SP, Brazil), and the other groups received the commercial diet plus 1.0 %, 2.5% and 5.0 % MSG (1 g MSG + 99 g food, 2.5 g MSG + 97.5 g food and 5.0 g MSG + 95 g food, respectively), all for a period of 70 days. At the end of this period, the animals (weighing 326.0 ± 16.0) were separated into eight groups (n=6) and maintained on the same diets in metabolic cages for an additional 21 days: C (non-diabetic/commercial diet), C-MSG 1.0% (non-diabetic/1.0% MSG diet), C-MSG 2.5% (non-diabetic/2.5% MSG diet), C-MSG 5.0% (non-diabetic/5.0% MSG diet); D (diabetic/commercial diet), D-MSG 1.0% (diabetic/1.0% MSG diet); D-MSG 2.5% (diabetic/2.5% MSG diet) and D-MSG 5.0% (diabetic/5.0% MSG diet). Diabetes was induced by streptozotocin (STZ). For this purpose, a freshly prepared solution of STZ (50 mg/kg bw) in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5 was injected intraperitoneally into overnight-fasted rats. After 24 hours, each streptozotocin-treated rat was evaluated for hyperglycemia by measuring its glucose level using the Accutrend GCT method (Roche Diagnostics® - Berna, Switzerland) and a blood sample collected from the tail vein. All these animals showed marked hyperglycemia (glucose > 200 mg/dl)^{20;21}. Insulin (Novolin L - 100 U/mL; Novo Nordisk A/S; Bagsvaerd, Dinamarca) was injected intraperitoneally every two days. The experimental protocol used in this study is shown in Figure 1.

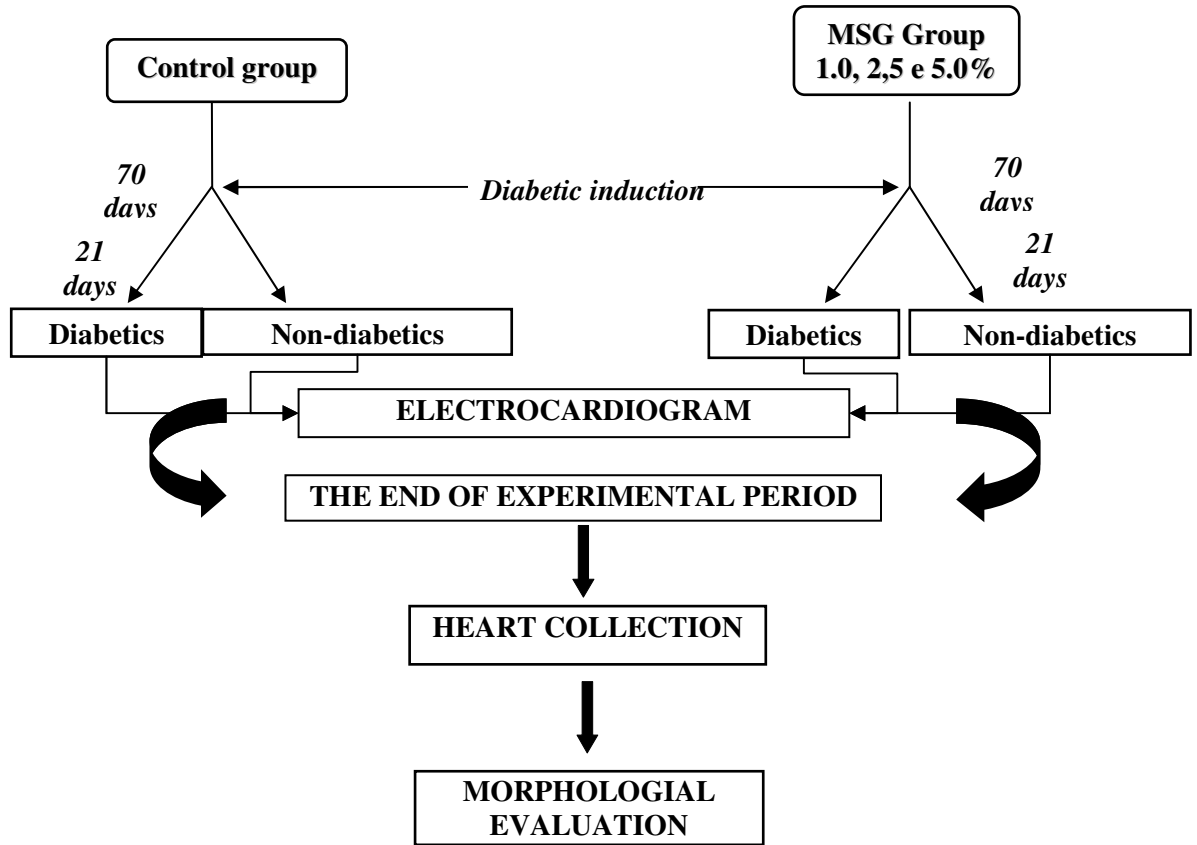


Figure 1: The experimental protocol.

Electrocardiogram

Anesthetized rats (sodium pentobarbital, 40 mg/kg bw) were kept in the supine position with spontaneous breathing for the ECG recording. The electrodes were connected to computer channels (Heart Ware System, Heart Ware International Inc, Framingham, Massachusetts, USA), and six standard waves (I, II, III, aVR, aVL and aVF) were recorded with 2N sensitivity at a speed of 50 mm/second . The P wave amplitude, PR interval and QT interval were measured for three consecutive beats from the beginning of the QRS-complex to the point of return of the T wave to the isoelectric line, defined as the TP segment. The QT interval was corrected for heart rate using Bazett's formula²².

Morphological evaluation

The heart was collected for a morphological evaluation. Fragments of the left ventricle were removed, stored in a 37% formaldehyde solution and submitted to routine histological examination using the hematoxylin-eosin method.

Statistics

The GraphPad Prism program, version 5.0 (2008) was used for the statistical analyses, using a random block design based on the weight of the animals. A two-way variance analysis (ANOVA) was used to determine the P-value, and the Bonferroni test was used to compare the means of significant values. A probability of <5% was considered to be significant.

Results and Discussion

The treatment of young adult rats with STZ produces a diabetic state that is characterized by weight loss, polydipsia, polyuria, glucosuria, polyphagia, hypoinsulinemia and hyperglycemia. The pathophysiology of STZ-induced diabetes includes a cardiomyopathy that is frequently associated with contractile dysfunction and heart rhythm disturbances²³. In this study, diabetes was induced with STZ and was verified by elevated blood glucose (491.4±48.8 mg/dl) and a non-significant loss in body weight during the 21-day experimental period after diabetic induction when compared with non-diabetic rats (Figure 2-I).

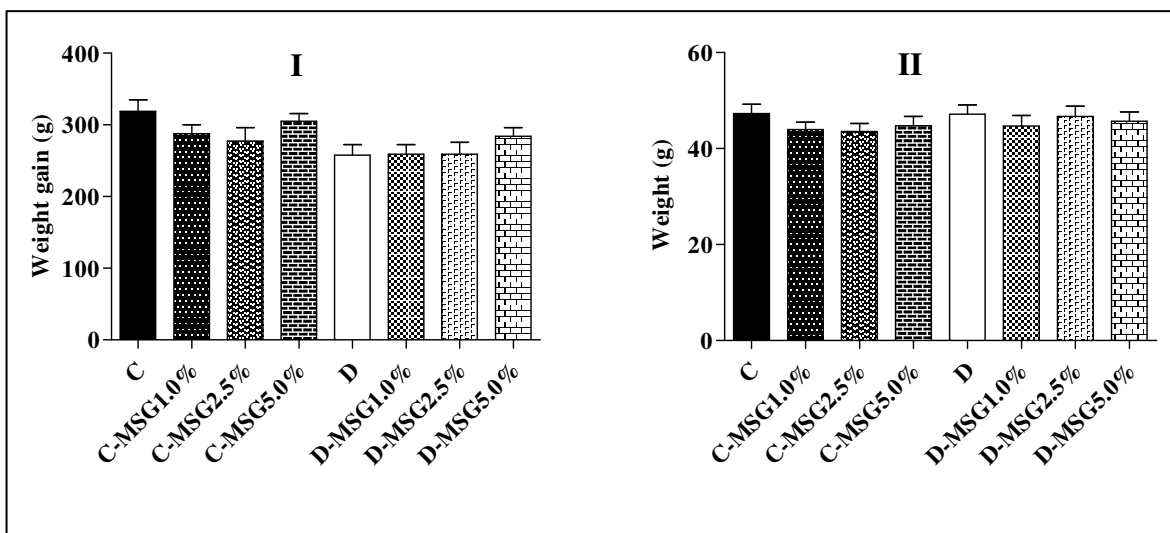


Figure 2. Body weight gain (I) and diet consumption (II) in the non-diabetic (C group) and diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%), diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%) and diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%).

Contradictory results with respect to the relationship between body weight gain and the consumption of a MSG-containing diet have been reported in rats. Hermanussen¹⁰ reported that the ingestion of MSG increased body weight gain and food consumption. On the other hand, in a study using Sprague-Dawley rats fed with diets of varying caloric density, fat and carbohydrate contents, Kondoh and Torii²⁴ found a significant difference in body weight gain between rats that drank a 1.0% MSG solution and those that drank only water and concluded that the voluntary ingestion of an MSG solution reduced weight gain and had no effects on food intake. In this study, the presence of MSG in the diet, at levels up to 5.0%, had no effect on the body weight and food consumption of both the non-diabetic and diabetic rats (Figures 2).

The sinoatrial node (SA) normally serves as the cardiac pacemaker, initiating electrical impulses and setting the heart rate. There was no significant difference in heart rate (HR) between the control and MSG-fed animals in both the non-diabetic and diabetic groups. Nevertheless, the HR was lower in the diabetic rats (272.6 ± 14.6 beats/min) than in the non-diabetic rats (329 ± 6.8 beats/min) (Figure 3). These results corroborate those of Howarth et al.^{23;25}, who reported that HR declined rapidly after the administration of STZ, reaching a new steady state after 1 week, and remained at the new level for up to 20 days. A decrease in physical activity may partly underlie this reduction in HR.

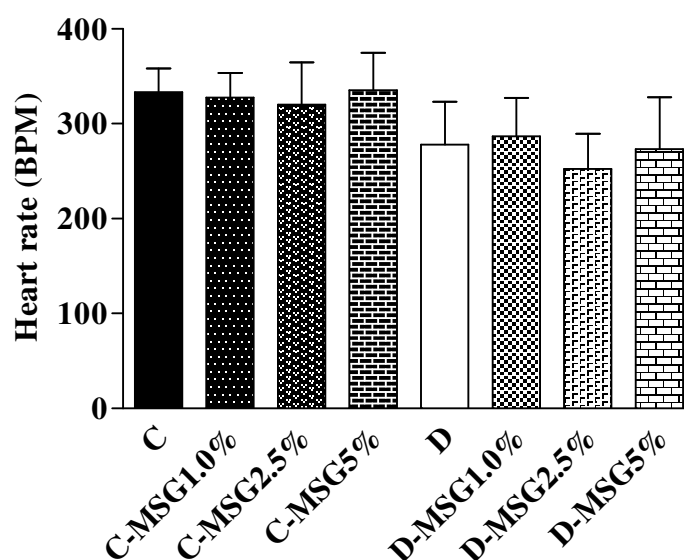


Figure 3: Heart rate (BPM) in the non-diabetic (C group) and diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%), diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%) and diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%).

The reduction in HR in the STZ-induced diabetic rats may be caused by a prolongation of the action potentials in the sinoatrial node, which in turn, may be caused by the altered expression and/or function of the ion channels. In addition, STZ itself may directly contribute to heart rhythm disturbances²⁶. Given these observations, the addition of MSG to the diet at the concentrations studied did not change the rate of potential generations in the cardiac pacemaker in both non-diabetic and diabetic rats.

The amplitude of the P wave and the PR interval (Figure 4) showed no significant differences between the control and MSG-fed rats in both the non-diabetic and diabetic groups. Furthermore, there was no significant difference between non-diabetic and diabetic animals fed with a diet containing MSG. Impulses from the SA node spread out across the atrial muscle and are conducted from one muscle cell to the next. The P wave represents atrial depolarization, and the PR interval includes the P wave along with the period of electrical standstill created by impulse crossing the AV node²⁷. Thus, diets containing up to 5.0% MSG did not alter atrial depolarization or the conduction of electrical stimuli from the atria to the ventricle.

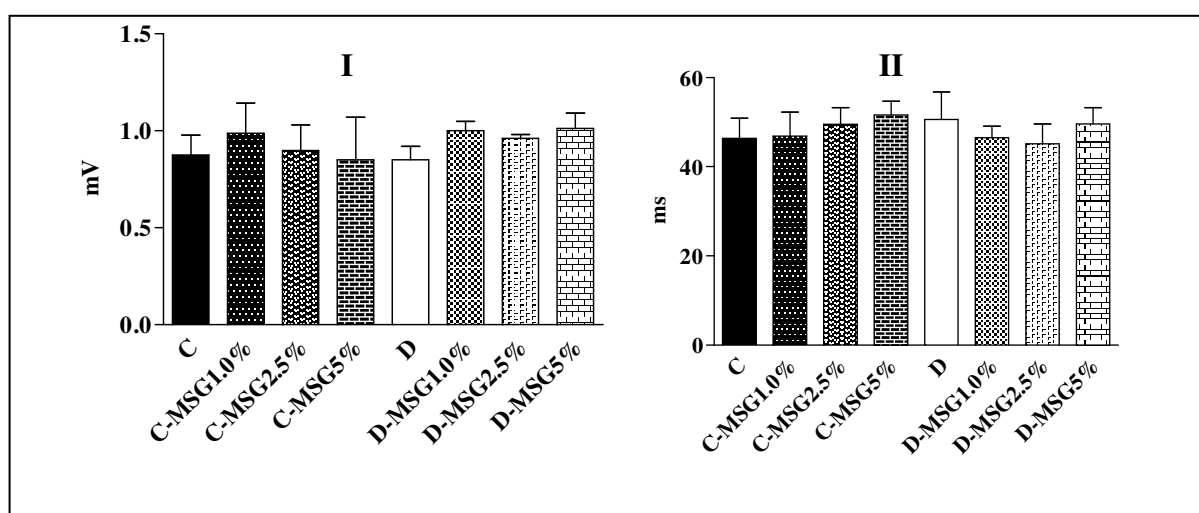


Figure 4: P wave amplitude (I) and PR interval (II) in the non-diabetic (C group) and diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%), diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%) and diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%).

The main clinical manifestation of diabetic cardiomyopathy is a higher incidence of cardiac arrhythmias, including ventricular fibrillation, and of sudden death as a result of alterations in ventricular repolarization. These alterations may cause changes in the cardiovascular physiology and structure, which can be recorded by ECG. One of the most common problems detected in diabetic patients are prolongations of the QRS complex, QT

interval and QTc²⁸. The QRS complex represents ventricular depolarization, and it is the largest component of the sinus rhythm complexes because a large amount of voltage is required for ventricular depolarization. A specialized conduction pathway comprising the His bundle, bundle branches, hemi-branches, and Purkinje fibers ensures that impulses travel quickly from the AV node to the ventricular muscle. The QT interval, representing the total ventricular depolarization and repolarization time, is measured from the beginning of the Q wave to the end of the T wave and should be less than half the time of the preceding R-R interval. Prolonged QT intervals represent delayed repolarization, which may cause tachydysrhythmias and sudden cardiac death²⁹.

The results obtained for the QRS complex, QT interval and QTc are illustrated in Figure 5. There was no difference in any of these parameters between the control and MSG-fed rats in both the non-diabetic and diabetic groups. The rats in the diabetic group, however, did show significant increases in the QRS complex, QT interval and QTc when compared with the rats in the non-diabetic group, although this result was irrespective of the addition of MSG to the diet. These findings are consistent with previous studies in STZ-induced diabetic rats. A prolonged QRS complex indicates a prolongation of ventricular depolarization, and a prolonged QT interval indicates prolongation of the events between depolarization and repolarization^{25;23;27;30}. In fact, the direct actions of STZ itself may also contribute to these heart rhythm disturbances. The prevalence of QT prolongation has been reported to be as high as 16% and 26% in type 1 and type II diabetes, respectively. Diabetic patients with more pronounced QT abnormalities tend to be older and have higher blood pressures and cardiovascular complications³¹.

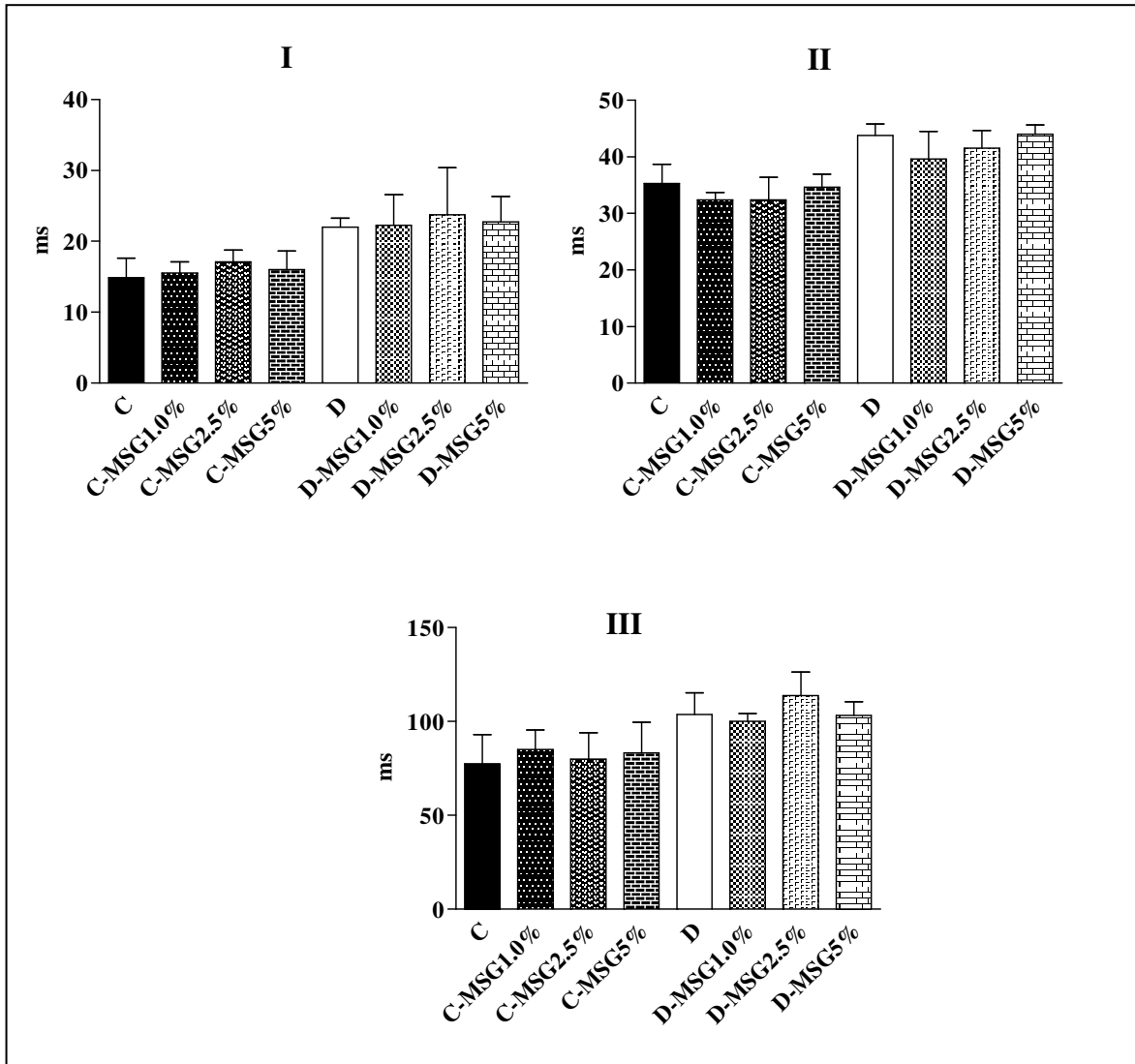


Figure 5: QRS complex (I), QT interval (II) and QTc interval (III) in the non-diabetic (C group) and diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%), non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%), diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%) and diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%).

Although prolongation of the QRS complex and a prolonged QT interval could be consequent to cardiac hypertrophy²², the histological evaluations of the rat hearts did not reveal any significant differences between the non-diabetic and diabetic groups. All groups presented irregular nuclei located in the center of the cells and spaces between the fibers, both of which are typical characteristics of a normal heart (Figures 6 and 7). In addition, the cardiac cells had similar sizes in all of the studied groups. Therefore, there was no evidence of cardiac hypertrophy observed in the rats from both the non-diabetic and diabetic groups.

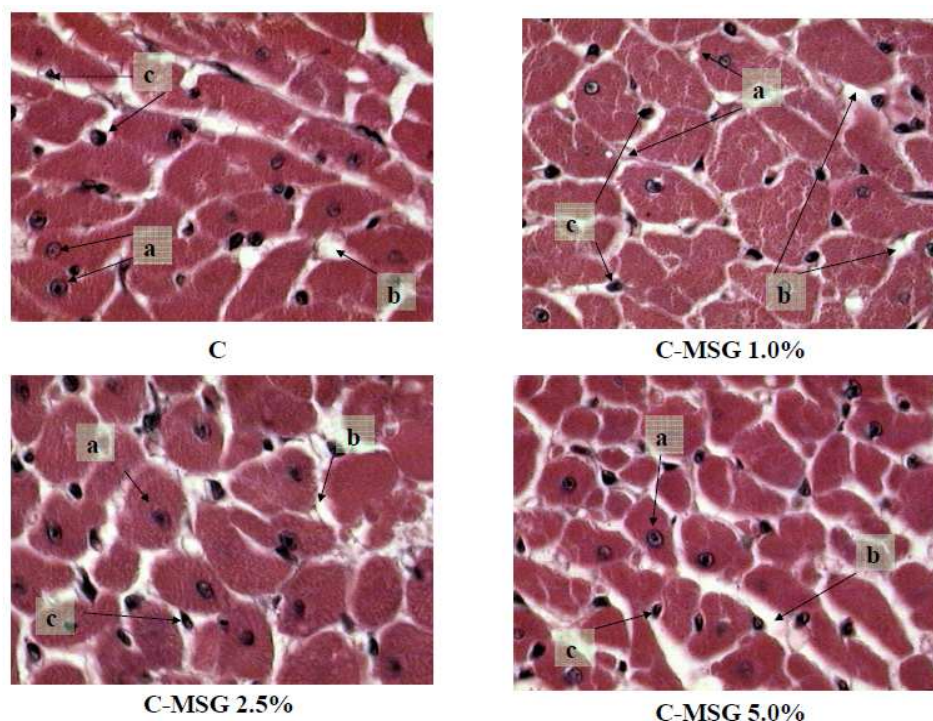


Figure 6: Photomicrograph of cross-sections of the left ventricle determined in the non-diabetic (C group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG. The hearts from non-diabetic control (C), non-diabetic 1.0% MSG (C-MSG 1.0%), non-diabetic 2.5% MSG (C-MSG 2.5%) and non-diabetic 5.0% MSG (C-MSG 5.0%) rats were stained with HE. Irregular nuclei in the cell center (a) and spaces between the cardiac fibers (b), both typical of a normal heart, were found in all groups. Nuclei located outside the cardiac fibers belong to endothelial cells and fibroblasts (c). Intercalated disks mark the junctions between the cardiomyocytes.

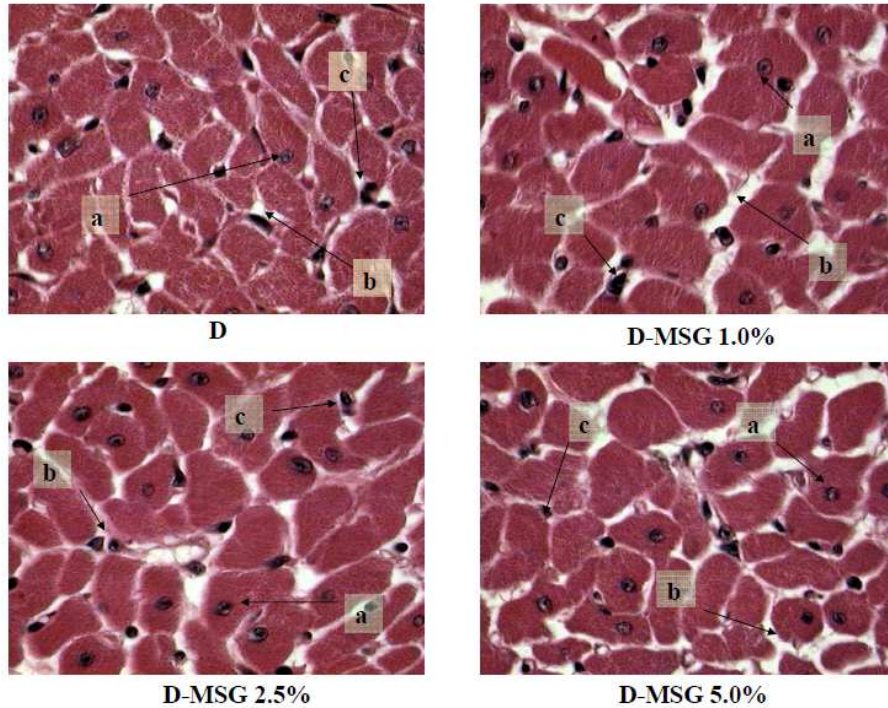


Figure 7: Photomicrograph of cross-sections of the left ventricle from diabetic (D group) Wistar rats fed with diets containing 0.0-5.0% added MSG: The hearts from diabetic control (D), diabetic 1.0% MSG (D-MSG 1.0%), diabetic 2.5% MSG (D-MSG 2.5%), and diabetic 5.0% MSG (D-MSG 5.0%) rats were stained with HE. Irregular nuclei in the cell center (a) and spaces between the cardiac fibers (b), both typical of a normal heart, were found in all groups. Nuclei located outside the cardiac fibers belong to endothelial cells and fibroblasts (c). Intercalated disks mark the junctions between the cardiomyocytes.

Given these data, we believe that the changes in the QRS complexes, and consequently in the QT and QTc intervals, in the diabetic animals fed a diet containing either no or up to 5.0% MSG are a consequence of hydro-electrolytic alterations that are typical of diabetes. In fact, such electrocardiographic alterations may be explained by the polyuria generally observed in diabetics, which is caused by osmotic diuresis as a result of the increase in glycemia²³. This excessive urinary loss causes a decrease in potassium, which could be responsible for the increase in the membrane repolarization period represented by a prolonged QT interval. The increased QT interval may also be a result of changes in voltage-dependent potassium ion channels^{22;32;33}. In fact, diabetes can alter the magnitude of the potassium channels involved in the repolarization process of the cardiomyocyte membrane³⁴, thereby affecting the cardiac tissue.

Conclusions

The ingestion of diets containing MSG at concentrations up to 5.0% did not influence the stimulation and electrical conduction of the heart in non-diabetic rats nor interfere in the electrocardiographic profile of diabetic rats that is typical to streptozotocin-induced diabetes.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the partial financial support received from the Brazilian Foundation for Improvement of Higher Education (CAPES) and the International Glutamate Technical Committee (IGTC).

References

1. Garattini, S. Glutamic acid, twenty years later. *J Nutr* 2000; 130(4S): 901S-9S.
2. Smriga M, Torii K., 2000. Release of hypothalamic norepinephrine during MSG intake in rats fed normal and nonprotein diet. *Physiol. Behav.* 70, 413–415.
3. Kondoh T, Mallick HN, Torii K., 2009. Activation of the gut-brain axis by dietary glutamate and physiologic significance in energy homeostasis. *Am J Clin Nutr.* 90(3):832S-837S.
4. Beyreuther K, Biesalski HK, Fernstrom JD, Grimm P, Hammes WP, Heinemann U, Kempfski O, Stehle P, Steinhart H, Walker R. Consensus meeting: monosodium glutamate – an update. *Eur J Clin Nutr.* 2007; 61(3):304-13.
5. Yamaguchi, S., Ninomiya, K., 2000. Umami and food palatability. *J Nutr.* 130(4S Suppl), 921S-6S.
6. Janeczko MJ, Stoll B, Chang X, Guan X, Burrin DG. Extensive gut metabolism limits the intestinal absorption of excessive supplemental dietary glutamate loads in infant pigs. *J Nutr.* 2007; 137(11):2384-90.
7. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1988. L-glutamic acid and its ammonium, calcium, monosodium and potassium salts, in: *Toxicological evaluations of*

- Certain Food Additives and Contaminants. Cambridge University Press New York, pp 97-161.
8. Jinap, S., Hajeb P., 2010. Glutamate. Its applications in food and contribution to health. *Appetite*: doi:10.1016/j.appet.2010.05.002.
 9. FASEB. Analysis of Adverse Reactions to Monosodium Glutamate (MSG), Report. Life Sciences Research Office, Federation of American Societies of Experimental Biology, Washington, DC, 1995.
 10. Hermanussen 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. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60: 25–31.
 11. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365 (9468): 1415-28.
 12. Paulson D. The diabetic heart is more sensitive to ischemic injury. *Cardiovasc Res* 1997; 34: 104-12.
 13. Balkau, B, Hu, G, Qiao, Q, Tuomilehto, J, Borch-Johnsen, K, Pyorala, K. Prediction of the risk of cardiovascular mortality using a score that includes glucose as a risk factor. *Diabetologia* 2004; 47 (12): 2118-28.
 14. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA*. 2010 20;303(3):235-41.
 15. McLellan F. Obesity rising to alarming levels around the world. *Lancet* 2002; 359: 1412.
 16. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among U.S. adults, 1999–2000. *JAMA* 2002; 288(14):1723-7..
 17. Kligfield P, Gettes LS, Bailey JJ, Childers R, Deal BJ, Hancock EW, van Herpen G, Kors JA, Macfarlane P, Mirvis DM, Pahlm O, Rautaharju P, Wagner GS Recommendations for the standardization and interpretation of the electrocardiogram: part I. *Circulation* 2007; 115 (10): 1306-1324.
 18. Houghton AR, Gray D Making Sense of the ECG: A Hands-on Guide. 3^a ed. London: Edward Arnold; 2008.
 19. Woodrow P. An introduction to electrocardiogram interpretation: part 1. *Nursing Standard* 2009; 24 (12): 50-57.

20. Elliott, J. I.; Ewchand, H.; Altmann, D. M.. Streptozotocin-induced diabetes in mice lacking β cells. *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 116-120.
21. Freitas Mathias P.C., Grassioli S, Rocha D. N, Scomparin D. X, Gravena C. Transplantation of pancreatic islets from hypothalamic obese rats corrects hyperglycemia of diabetic rats. *Transplant Proc* 2007; 39 (1), 193-5.
22. Costa ECS, Gonçalves AA, Areas MA, Morgabel RGB. Effects of Metformin on QT and QTc Interval Dispersion of Diabetic Rats. *Arq Bras Cardiol* 2008; 90(4): 232-238.
23. Howarth FC, Jacobson M, Shafiullah M, Adeghate E. Long-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. *Exp Physiol* 2005b; 90 (6): 827-35.
24. Kondoh, T; Torii, K., 2008. MSG intake suppresses weight gain, fat deposition, and plasma leptin levels in male Sprague-Dawley rats. *Physiol. Behav.* 95(1-2), 135-44.
25. Howarth FC, Jacobson M, Naseer O, Adeghate E. Short-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. *Exp Physiol* 2005a; 90: 237–245
26. Howarth FC, Al-Sharhan R, Al-Hammadi A, Qureshi MA. Effects of streptozotocin-induced diabetes on action potentials in the sinoatrial node compared with other regions of the rat heart. *Mol Cell Biochem* 2007; 300:39–46
27. Hampton JR The ECG Made Easy. 7thed. Edinburgh Churchill: Livingstone, 2008.
28. Feuvray, D, Lopaschuk, GD. Controversies on the sensitivity of the diabetic heart to ischemic injury: the sensitivity of the diabetic heart to ischemic injury is decreased. *Cardiovasc Res* 1997; 34: 113-20.
29. Straus SM, Kors JA, De Bruin ML, van der Hooft CS, Hofman A, Heeringa J, Deckers JW, Kingma JH, Sturkenboom MC, Stricker BH, Witteman JC. Prolonged QTc interval and risk of sudden cardiac death in a population of older adults. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 17;47(2):362-7.
30. Howarth FC, Jacobson M, Qureshi MA, Shafiullah M, Hameed RS, Zilahi E, Al Haj A, Nowotny N, Adeghate E. Altered gene expression may underlie prolonged duration of the QT interval and ventricular action potential in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Mol Cell Biochem* 2009; 328:57–65.

31. Veglio M, Bruno G, Borra M, Macchia G, Barger G, D'Errico N. Prevalence of increased QT interval duration and dispersion in type 2 diabetic patients and its relationship with coronary heart disease: a population-based cohort. *J Intern Med* 2002; 251:317–324.
32. Punske BB, Rossi S, Ershler P, Rasmussen I, Abel ED. Optical mapping of propagation changes induced by elevated extracellular potassium ion concentration in genetically altered mouse hearts. *J Electrocardiol* 2004; 37 (Suppl): 128-34.
33. Nishiyama A, Ishii DN, Backx PH, Pulford BE, Birks BR, Tamkun MM. Altered K⁺ channel gene expression in diabetic rat ventricle: isoform switching between Kv4.2 and Kv1.4. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H1800–7.
34. Shimoni Y, Severson D, Ewart HS. Insulin resistance and the modulation of rat cardiac K(+) currents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000, 279 (2): H639-49.

CONCLUSÕES GERAIS

Concluiu-se que a exposição de ratos Wistar não-diabéticos a doses orais de até 5.0% de MSG adicionados a dieta, durante 13 semanas, não alterou parâmetros bioquímicos, cardiovasculares, hematológicos e histológicos. O grupo de animais diabéticos recebeu streptozotocina após 70 dias de tratamento e permaneceram em gaiolas metabólicas por mais 21 dias. Foram verificadas alterações bioquímicas, cardiovasculares e histológicas que refletiram principalmente aos distúrbios característicos desta enfermidade, independente da adição de MSG na dieta.

ANEXO I

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEAB-UNICAMP

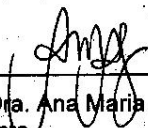
CERTIFICADO

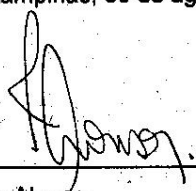
Certificamos que o Protocolo nº 1075-1, sobre "AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E CARDIOVASCULARES EM RATOS WISTAR DIABÉTICOS ALIMENTADOS COM GLUTAMATO MONOSSÓDICO", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Felix Guilherme Reyes Reyes / Hellen Dea Barros Maluly, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAB)-IB-UNICAMP em 30 de agosto de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1075-1, entitled "EVALUATION OF BIOCHEMICAL AND CARDIOVASCULAR PARAMETERS IN DIABETIC WISTAR RATS FED WITH MONOSODIUM 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 August 30, 2006.

Campinas, 30 de agosto de 2006.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEAB-IB - Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3788-6359
Telefax: (19) 3788-6356
E-mail: ceea@cemb.unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>