

VIA DE SINALIZAÇÃO MAPK HIPOTALÂMICA E PERFIL COMPORTAMENTAL DO MODELO DE OBESIDADE MSG

Ernesto da Silveira Goulart Guimarães¹
Luiz Carlos de Caires Júnior²
Camila Manso Musso³
Rebecca de Medeiros Vasconcellos⁴
Diego de Assis Gonçalves⁴
Ana Eliza Andreazzi⁵
Carlos Alberto Mourão Júnior⁵
Raúl Marcel Gonzalez Garcia⁶

RESUMO

A administração de L-Glutamato Monossódico (MSG) neonatal em ratos Wistar provoca lesões no núcleo arqueado do hipotálamo, afetando o controle neuroendócrino na fase adulta desses animais. Os neurônios produtores de GnRH estão localizados justamente no núcleo arqueado do hipotálamo. É notado, além de um quadro de obesidade hipofágica característica do modelo, um *déficit* de hormônios hipofisários circulantes. Devido às inúmeras conexões neuronais do núcleo arqueado com importantes centros reguladores do comportamento, avaliamos os padrões comportamentais que esses animais apresentam e avaliamos a expressão das proteínas ERK1 e ERK2 no hipotálamo, relacionando a síntese de hormônios hipofisários. Nos 5 primeiros dias de vida, ratos Wistar machos receberam doses subcutâneas de MSG (4 mg/g de massa corporal) na região cervical. Animais controle receberam salina equimolar. Aos 90 dias de vida, foram iniciados os experimentos comportamentais em arena de campo aberto, avaliando-se o número de episódios de *freezing* (F) e tempo no centro da arena (TC) em 5 minutos de experimento. Foi calculado o Índice de Lee para estimar a obesidade, assim como foi retirada e pesada a gordura perigonadal para comprovar a hipertrofia do tecido adiposo. O hipotálamo dos animais foi retirado e tratado para determinar a expressão de ERK1/2 por Western blotting. O grupo MSG teve um aumento significativo de 12,06% do IL e de 66,4% do peso da gordura perigonadal, comprovando respectivamente a obesidade e a hipertrofia de adipócitos. O grupo MSG mostrou uma redução significativa na expressão das proteínas ERK1/2, o que revela uma falha na sinalização intracelular hipotalâmica. O Grupo MSG apresentou um padrão de comportamento que indica um estado de *stress* e ansiedade mostrado pelo aumento significativo no número de

1 Bolsista BIC

2 Bolsista do Programa de Doutorado em Biotecnologia, Genética e Imunologia

3 Bolsista do Programa de Mestrado em Biotecnologia, Genética e Imunologia

4 Bolsista do Programa GET-Biologia

5 Professor do Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Biológicas/UFJF

6 Professor orientador - Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas/UFJF, e-mail: raul.garcia@uff.edu.br

F e redução no TC. Concluímos, com este trabalho, que os animais MSG apresentam falha na sinalização celular hipotalâmica, relacionando-se assim com o *déficit* de hormônios hipofisários, além de apresentarem um comportamento indicativo de *stress* e ansiedade, provavelmente devido às complexas conexões do núcleo arqueado com centros reguladores comportamentais.

Palavras-chave: Obesidade. MSG. Comportamento. MAPK. Sinalização.

INTRODUÇÃO

A administração neonatal de L-glutamato monossódico (MSG) produz lesões no núcleo arqueado e eminência mediana do hipotálamo, afetando o controle neuroendócrino na fase adulta desses animais (McBRIDGE et al., 1976; LEIGH et al., 1992). Após repetitivas doses de MSG, roedores desenvolvem obesidade na vida adulta como comprovado pelo aumento no Índice de Lee, semelhante ao Índice de Massa Corpórea em humanos, e hipertrofia dos adipócitos (FABRES-MACHADO e SAITO, 1995; DOLNIKOFF et al., 2001). Contudo, diferentemente de outros modelos de obesidade, roedores obesos-MSG são hipofágicos (BUNYAN et al., 1976).

As proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK's) são proteínas que compõem uma família de serino/treonino quinases ativadas por fosforilação em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares, o que dispara a fosforilação e ativação de numerosas proteínas intracelulares. A via de sinalização de MAPK's é o principal mecanismo de regulação da atividade transcricional gerada por estímulo extracelular, atuando na proliferação, diferenciação, metabolismo e resposta ao estresse (RUBINFELD e SEGER, 2005). As enzimas ERK 1 e ERK 2 ativam diretamente fatores de transcrição gênica de hormônios hipofisários tais como GH, FSH e LH (KLAUSEN et al., 2005). Além disso, também atuam diretamente na síntese e secreção dos hormônios hipotalâmicos e hipofisários (KLAUSEN et al., 2005).

A via de sinalização de ERK 1 e ERK 2 nas células da hipófise ocorre a partir, por exemplo, da ligação de um sinal tal como o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), secretado pelo hipotálamo, a uma proteína de membrana receptora específica, nesse caso o receptor de GnRH. A transdução de sinais dessa mesma via também ocorre nas células hipotalâmicas, porém, a sua ativação se dá por outros sinais e promovem a síntese e secreção de hormônios hipotalâmicos, sejam eles inibidores ou indutores de liberação de hormônios hipofisários (RUBINFELD e SEGER, 2005; KLAUSEN et al., 2005).

Glutamato e aspartato são os mais abundantes aminoácidos no sistema nervoso central, onde eles funcionam como neurotransmissores excitatórios. Eles existem em atipicamente alta concentração, em regiões do cérebro que são críticas para a mediação do desempenho cognitivo, tais como córtex cerebral, giro denteado do hipocampo e estriado (COTMAN et al., 1987), indicando que esses aminoácidos desempenham papéis importantes na maiores funções cognitivas, incluindo a formação da memória.

O núcleo arqueado é rico em receptores de glutamato do tipo NMDA que, quando estimulados excessivamente, geram um grande influxo de cálcio, o que, de acordo com o conceito de excitotoxicidade, desencadeia um processo degenerativo intracelular (WHETSELL, 1996).

Devido às conexões neuronais dessa região com importantes centros reguladores do comportamento e memória e, o descontrole endócrino na vida adulta desses animais, o objetivo deste

trabalho foi avaliar o comportamento dos animais obesos MSG e a transdução de sinais intracelulares no hipotálamo.

METODOLOGIA

OBTENÇÃO E TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Para a execução dos experimentos, foram utilizados ratos *Wistar* machos obtidos através de matrizes provenientes do Centro de Biologia da Reprodução (CBR), da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Durante o cruzamento, foram mantidas quatro fêmeas para cada macho. Após constatarem-se prenhas, cada uma foi colocada em uma caixa individual separada das demais. Após o nascimento, foram mantidos seis filhotes com cada fêmea, para garantir melhor lactação (MOURA et al., 1996).

Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo com ciclo claro-escuro de 12 horas. Durante os cinco primeiros dias de vida, os ratos *Wistar* machos receberam injeções subcutâneas de MGS, na dose de 4mg/g de peso do animal, ao passo que os animais do grupo controle receberam solução fisiológica equimolar.

Aos 21 dias, procedeu-se o desmame. No nonagésimo dia, a obesidade foi avaliada calculando-se o Índice de Lee (IL) [peso corporal (g)^{1/3}/ comprimento naso-anal (cm) x 1000], que é semelhante ao IMC, mas utilizado em roedores. Pesando-se a gordura perigonadal, foi possível estimar a hipertrofia de adipócitos. Os animais foram sacrificados após injeção intraperitoneal de tiopental de sódio, na concentração de 60 mg/Kg.

ESTUDO DE COMPORTAMENTO EM ARENA DE CAMPO ABERTO

Os estudos de comportamento dos animais foram realizados pelo método de observação em campo aberto. Estes experimentos foram realizados aos 90 dias de vida dos animais e seu comportamento foi estudado sobre livre observação, por um tempo de 5 minutos. Foram avaliados o número de episódios de *freezing* e o tempo gasto no centro da arena.

TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

Os tecidos hipotalâmicos foram armazenados em tubos individuais contendo, 400 μL de solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, na presença de 2 mM de ortovanadato de sódio (responsável por minimizar a desfosforilação de proteínas) e coquetel de inibidores de proteases (aprotinina, leupeptina e SBTI 1mg/ml), sendo o tecido macerado e posteriormente congelado em nitrogênio líquido.

Os homogenatos foram centrifugados por 5 minutos a 10,621 g e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

WESTERN BLOTTING

Após a dosagem, as proteínas foram desnaturadas em tampão SDS (dodecil sulfato de sódio), na presença de β -mercaptoetanol e aquecimento a 95°C , por cinco minutos. Posteriormente, foi feita eletroforese, usando-se o equipamento Mini-Protean (Bio-Rad) e funcionando a 100 V e com amperagem livre, por período de 140 minutos para a separação das proteínas em géis de poliacrilamida 10%, junto com marcadores de massa molecular pré-corados (GE, Healthcare). Foram utilizados 100

ug de proteínas por amostra. Tal procedimento foi seguido por eletrotransferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose, por período de 60 minutos sob a voltagem de 100 V e amperagem livre.

Após a eletrotransferência, as membranas foram lavadas com tampão Tris (TBS) 20 mM, pH 7,6, por 30 segundos e incubadas em TBS com 5% de leite em pó caseiro, durante 2 horas e 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, as membranas foram novamente lavadas com TBS por 30 segundos e incubadas em solução TBS com 1% de leite, contendo anticorpos primários policlonais contra as enzimas ERK 1 e ERK 2, de massa molecular de 42 kDa e 44 kDa, respectivamente (Cell Signaling Technology), na proporção de 1 µL de anticorpo para cada 1000 µL de TBS (1:1000), por aproximadamente 12 horas. Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos com TBS e incubadas, por 1 hora, à temperatura ambiente, com segundo anticorpo conjugado à peroxidase (Life Sciences Ltda.).

Logo depois, as membranas foram lavadas três vezes com TBS e incubadas em solução de revelação com luminol (Kit ECL plus, Amersham Biosciences), seguida de revelação (Hyperfilm – ECL, Amersham), promovendo sua exposição, por 30 segundos para a detecção das bandas geradas pela marcação das enzimas ERK 1 e ERK 2. As proteínas imunorreativas foram digitalizadas e a avaliação/quantificação foi feita com o auxílio do programa ABEleto v 1.0.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 5 e os resultados expressos como média ± erro padrão da média (EPM). As comparações foram feitas usando o teste t de *Student*, considerando significativos os valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

O IL foi calculado para prever a obesidade. Os animais obesos-MSG apresentaram um aumento de 12,06% no IL (Fig. 1, $p < 0,0001$; $n = 23 - 26$).

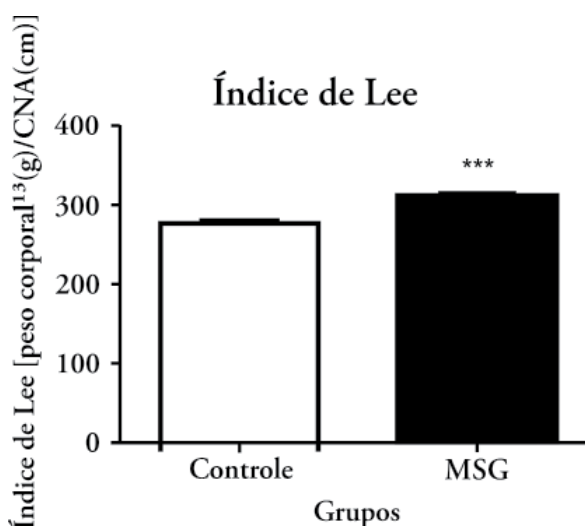


Figura 1 - Efeito do tratamento neonatal com MSG sobre o Índice de Lee de ratos - Os dados foram expressos como média ± EPM (Controle = 277,7 ± 2,0 n=23, MSG = 311,2 ± 1,8 n=26) *** $p < 0,0001$ (evidenciado pelo teste t de *Student*).

A gordura perigonadal foi retirada e pesada para estimar a hipertrofia de adipócitos induzida pelo tratamento. No grupo MSG, o aumento foi de 67,4% na gordura perigonadal, comparado ao grupo controle (Fig. 2, $p < 0,0001$; $n = 23 - 26$).

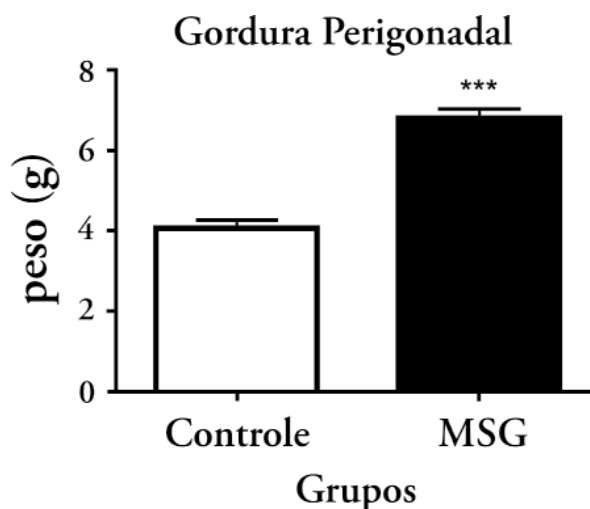


Figura 2 - Efeito do tratamento neonatal com MSG na gordura perigonadal de ratos -Os dados foram expressos como média ± EPM (Controle = 4,07 ± 0,2 n=23, MSG = 6,8 ± 0,2 n=26) *** $p < 0,0001$ (evidenciado pelo teste *t* de Student).

WESTERN BLOTTING

A figura 3 representa a análise da expressão de ERK1 e 2 no hipotálamo dos grupos experimentais. Nota-se diferença significativa entre as amostras testadas e representada pela imagem obtida após revelação. A unidade de leitura densitométrica foi de u.a (área x intensidade) da banda.

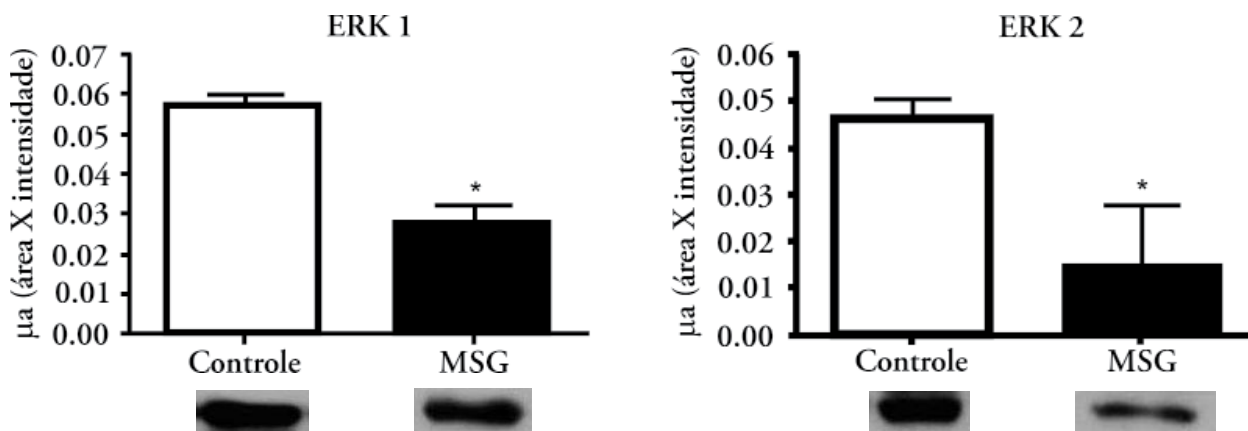


Figura 3 - Efeito do tratamento neonatal com MSG na expressão de ERK 1e 2 no hipotálamo de ratos - Os dados foram expressos como média ± EPM (ERK1. Controle = 0,03 ± 0,004 n=3, MSG=0,06 ± 0,003 n=3, $p < 0,05$) (ERK2. Controle = 0,05 ± 0,004 n=4, MSG=0,014 ± 0,01 n=2, $p < 0,05$). * $p < 0,05$) (evidenciado pelo teste *t* de Student).

COMPORTEAMENTO

Os Animais MSG apresentaram um aumento significativo no número de episódios de *freezing* e diminuição no tempo gasto no centro da arena, como pode ser observado na figura 4.

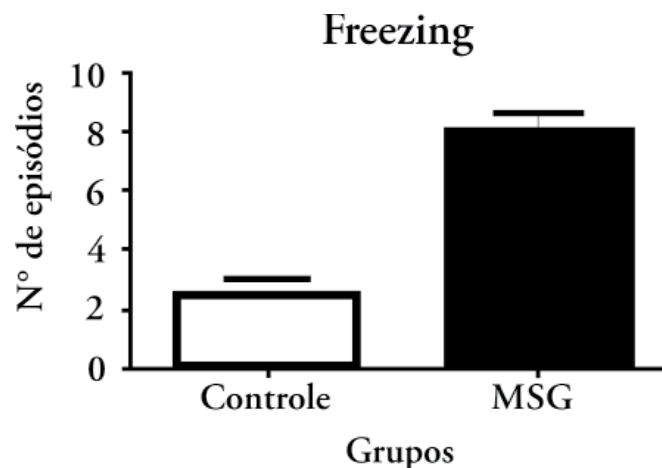


Figura 4 - Número de episódios de freezing em 5 minutos de experimento - (Controle = 2,5 ± 0,4 n=23, MSG=7,9 ± 0,7 n=26, p<0,05)

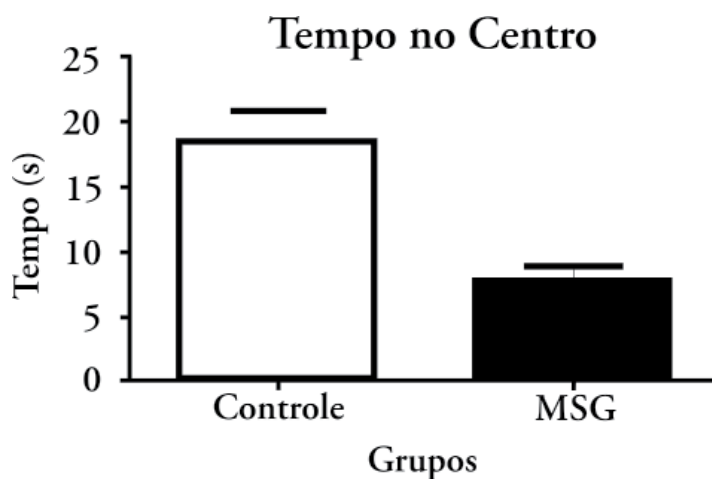


Figura 5 - Tempo gasto pelo animal no centro da arena em 5 minutos de experimento (Controle = 18,4 ± 2,5 n=23. MSG = 7,8 ± 1,2 n=26, p<0,05).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Comprovamos com esses resultados que os animais MSG se tornaram obesos, o que pode ser afirmado devido ao significativo aumento do índice de Lee nos animais obesos, juntamente com os resultados das pesagens da gordura perigonadal, que comprova a hipertrofia dos adipócitos no grupo MSG.

Nosso trabalho indica que a baixa secreção dos hormônios gonadotrópicos, que desencadeia todo o processo patológico descrito anteriormente, pode estar envolvida não só simplesmente com a necrose tecidual do núcleo arqueado do hipotálamo, mas também, com problemas na secreção de neuropeptídeo Y, que é indutor da expressão de GnRH - hormônio liberador de gonadotropinas - (DHILLON, 2009). Pode também estar relacionada com problemas nas vias de sinalização intracelular, pelo menos uma delas, da produção e secreção desses hormônios, visto que a expressão das ERK's se encontra reduzida significativamente no hipotálamo, ou seja, o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal está comprometido devido a tais falhas. Vale a pena ressaltar que é necessário o estudo das outras

vias envolvidas na regulação da produção e secreção das gonadotropinas, assim como a avaliação da atividade de ERK1 e 2.

Concluimos que o processo desencadeador do hipogonadismo-hipogonadotrófico nos animais obesos MSG se deve também a falhas nas vias de sinalização celular iniciado no hipotálamo, comprometendo assim toda a comunicação nesse circuito neuronal.

É importante ressaltar que outras vias hormonais e neuroendócrinas estão relacionadas com a instauração desse quadro de obesidade, mas este estudo se limitou a descrever apenas a relação do eixo estudado com tal patologia.

O grupo MSG apresentou aumento significativo no número de episódios e *freezing* e diminuição de tempo, no centro da arena, o que nos leva a concluir que ratos MSG apresentam um padrão de comportamento, que indica um estado de *stress* e ansiedade, o que pode ser explicado com as inúmeras conexões neuronais que existem entre o hipotálamo e importantes centros controladores do humor.

HYPOTHALAMIC MAPK SIGNALING PATHWAY AND BEHAVIOR PATTERN OF THE MSG OBESITY MODEL

ABSTRACT

The neonatal administration of L-monosodium glutamate (MSG) in rats leads lesions in the arcuate nucleus of the hypothalamus affecting the neuroendocrine control in the adulthood. The GnRH-producing neurons are located precisely in the arcuate nucleus of the hypothalamus. It is noted, along with a hypophagic obesity of the model, a deficit of circulating pituitary hormones. Due to multiple neuronal connections of the arcuate nucleus with important regulatory centers our goal was to evaluate the behavior patterns that these animals shown. The other objective was to evaluate the expression of ERK1 and ERK2 proteins in the hypothalamus relating those with the synthesis of pituitary hormones. At the first 5 days of life, male Wistar rats received subcutaneous doses of MSG (4 mg/g body weight) in the neck area. Control animals received saline solution equimolar. At 90 days of life were initiated behavioral experiments in the open field arena regarding the number of freezing episodes and time spent at the center of the arena in a 5 minutes experiment. Lee Index was calculated to estimate obesity as well as the perigonadal fat pad was weighted to analyze the hypertrophy of adipose tissue. The hypothalamus was removed and treated to determine expression of ERK1/2 by Western blotting. The MSG group had a significant increase in IL 12.06% and 66.4% increase of perigonadal fat pad weigh, confirming respectively the obesity and hypertrophy of adipocytes. The MSG group showed a significant reduction in protein expression ERK1 and 2, which reveals a failure in the intracellular signaling at the hypothalamus. The MSG group showed a behavior pattern that indicates a stress and anxiety state shown by the significant increase in the number of freezing episodes and less time spent at the center of the arena. We conclude with this work that the MSG animals have fails in hypothalamic cell signaling linking itself with the deficit of pituitary hormones. This animals also presents a behavior pattern that is indicative of stress and anxiety, probably due to the complex connections between the arcuate nucleus and regulatory behavior centers.

Keywords: Obesity. MSG. Behaviour. MAPK. Signaling.

REFERÊNCIAS

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BUNYAN, J.; MURREL, E.A.; SHAH, P.P. The induction of obesity in rodent by means of monosodium glutamate. *British Journal of Nutrition*, v. 25, p. 35-39, 1976.
- COTMAN, C.W., MONAGHAN, D.T., OTTERSEN, O.P., STORN-MATHISEN, J. Anatomical organization of excitatory amino receptors and their pathways. *Trends in Neuroscience*, v. 10, p. 273-280, 1987.
- DHILLON SS, GINGERICH S, BELSHAM DD. Neuropeptide Y induces gonadotropin-releasing hormone gene expression directly and through conditioned medium from mHypoE-38 NPY neurons. *Regulatory Peptides*, v. 156, n.1-3, p. 96-1031, 2009.
- DOLNIKOFF, M.; MARTIN-HIDALGO, A.; MACHADO, U.F.; LIMA, F.B.; HERRERA, E. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, v. 25, p. 426-433, 2001.
- FABRES-MACHADO, U.; SAITO, U. The effect of adipose cell size on the measurement of GLUT 4 in the adipose tissue of obese mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 28, p. 369-376, 1995.
- KLAUSEN C, TSUCHIYA T, CHANG JP, HABIBI HR. PKC and ERK are differentially involved in gonadotropin-releasing hormone-induced growth hormone gene expression in the goldfish pituitary. *American Journal of Physiology, Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 289, n. 6, p. 1625-33, 2005.
- LEIGH, F.S.; KAUFMAN, L.N.; YOUNG, J.B. Diminished epinephrine excretion in genetically obese (ob/ob) mice and monosodium glutamate-treated rats. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, v. 16, n. 8, p. 597-604, 1992.
- McBRIDE, W.J.; HINGTGEN, J.N.; APRISON, M.H. Neurochemical correlates of behavior: levels of amino acids in four areas of brain of the rat during drug-induced behavior excitation. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 4, p. 53-57, 1976.
- RUBINFELD, H. & SEGER, R. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Molecular Biotechnology*, v. 31, p. 151-174, 2005.
- WHETSELL, W.O. JR.,. Current concepts of excitotoxicity. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 55, p. 1-13, 1996.