

*Daniela Soares Razolli*

GLUTAMATO PARTICIPA DO CONTROLE  
HIPOTALÂMICO DA HOMEOSTASE  
ENERGÉTICA EM RATOS

Campinas, 2011



---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

# GLUTAMATO PARTICIPA DO CONTROLE HIPOTALÂMICO DA HOMEOSTASE ENERGÉTICA EM RATOS

Daniela Soares Razolli

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Mestre em Fisiopatologia Médica, área de concentração em Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento. Sob orientação do Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

R219G Razolli, Daniela Soares, 1984 -  
Glutamato participa do controle hipotalâmico da  
homeostase energética em ratos. / Daniela Soares  
Razolli. -- Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Lício Augusto Velloso  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Leptina. 2. Obesidade. 3. Neurotransmissores.  
4. Alimentação. I. Velloso, Lício Augusto. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Glutamate participate of hypothalamic control of energetic homeostasis  
in rats

**Palavras-chave em inglês:**

Leptin

Obesity

Neurotransmitter

Feeding

**Área de concentração:** Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

**Titulação:** Fisiopatologia Médica

**Banca examinadora:**

Lício Augusto Velloso [Orientador]

Adriana de Souza Torsoni

Carla Roberta de Oliveira Carvalho

**Data da defesa:** 26-07-2011

**Programa de Pós-Graduação:** Faculdade de Ciências Médicas

---

## **Banca examinadora de Dissertação de Mestrado**

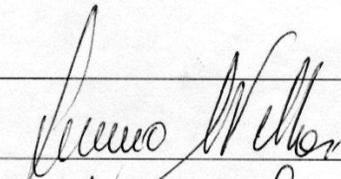
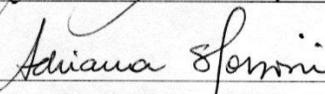
---

**Daniela Soares Razolli**

---

**Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Licio Augusto Velloso**

---

<b>Membros:</b>	
Prof(a). Dr(a). Licio Augusto Velloso -	
Prof(a). Dr(a). Adriana de Souza Torsoni -	
Prof(a). Dr(a). Carla Roberta de Oliveira Carvalho -	

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 26/07/2011**

---

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha mãe, Marina, pessoa a quem dedico toda minha existência. Que sempre fez de tudo por mim, com amor incondicional.

Agradeço ao Eduardo, meu companheiro. Sua presença em minha vida me faz completamente feliz. E você faz isso e muito mais.

Agradeço ao professor Lício, exemplo que sigo. Por toda oportunidade, ensinamento, paciência e orientação.

Agradeço a todos os amigos de laboratório, por toda convivência que tanto me acrescenta, e torna esse trabalho tão prazeroso.

Agradeço a todos os meus amigos, por toda a diferença que vocês fazem em minha vida.

A todos vocês, meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

Pág.

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 - INTRODUÇÃO.....	10
2 - OBJETIVOS.....	18
Gerais.....	18
Específicos.....	18
3 - CAPÍTULO 1.....	19
<b>Artigo:</b> Hypothalamic action of glutamate leads to body mass reduction through a mechanism partially dependent on JAK2	
4 - RESULTADOS COMPLEMENTARES.....	37
5 - CONCLUSÕES.....	38
6 – REFERÊNCIAS.....	39
7 - ANEXOS.....	42
Materiais e Métodos.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

AgRP	Proteína relacionada ao <i>agouti</i>
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
CART	Transcrito regulado por cocaína e anfetamina
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
GnRH	Hormônio liberador de gonadotropina
GTP	Guanosina trifosfato
ICV	Intracerebroventricular
JAK2	Janus kinase 2
KA	Ácido kaínico
MCH	Hormônio concentrador de melanina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização mundial da saúde
POMC	Propiomelanocortina
RNA	Ácido ribonucléico
SNC	Sistema nervoso central
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição
TRH	Hormônio liberador de tireotropina

## RESUMO

O receptor ionotrópico NMDA (N-metil-D-aspartato) é um receptor de glutamato envolvido em uma série de processos essenciais para o funcionamento adequado do sistema nervoso central. A ativação ou expressão anômala deste receptor pode contribuir para o desenvolvimento de doenças como Parkinson e Alzheimer. Um estudo utilizando um microarranjo de DNA realizado em nosso laboratório revelou que apenas dois dentre 1.176 genes hipotalâmicos avaliados, estão simultaneamente envolvidos na resposta a estímulos termogênicos induzidos pela ingestão de dieta hipercalórica e pela exposição à baixa temperatura; sendo eles, a subunidade 2B do receptor NMDA, e a proteína-G ligadora de GTP. Tal fato sugere que os processos envolvidos com o controle do gasto energético são complexos e finamente regulados. Ainda, dados prévios mostraram a co-localização entre receptores NMDA e neurônios MCH (Hormônio Concentrador de Melanina), o qual é um dos principais neurotransmissores hipotalâmicos envolvidos no controle do gasto energético. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão e a funcionalidade de receptores NMDA em hipotálamo de ratos alimentados com dieta padrão ou rica em lipídeos. Como o hipotálamo responde aos hormônios leptina e insulina no processo de controle de ingestão alimentar e gasto energético, decidimos avaliar se o receptor NMDA pode modular a expressão de neurotransmissores hipotalâmicos por meio da via da leptina. Para tal, ratos foram tratados por via intracerebroventricular (icv) com glutamato (agonista de NMDA) e AG490 seguido de glutamato. O AG490 é um inibidor químico da JAK2 – proteína inicial da via de sinalização da leptina. Nossos resultados mostraram que a administração icv de glutamato reduz a ingestão alimentar e o peso dos animais, modulando a expressão de neurotransmissores orexigênicos e anorexigênicos de maneira parcialmente dependente da via da leptina.

## **ABSTRACT**

The ionotropic NMDA receptor is a glutamate receptor involved in a number of essential functions in the central nervous system. The anomalous expression or activation of this receptor can contribute to development of diseases such as Parkinson and Alzheimer. A previous study performed in our lab revealed that only two out of 1.176 genes were simultaneously modulated in the hypothalamus of rats exposed to two distinct thermogenic stimuli, i.e., exposition to low temperature and feeding a high-fat diet; the 2B NMDA receptor subunit and the GTP protein G. This fact suggests that energy expenditure is a complex and finely controlled process. In addition, previous data showed co-localization between NMDA receptor and MCH neurons, which is one of the most important hypothalamic neurotransmitters involved in the energy expenditure control. Thus, this study aimed at evaluating the expression and function of NMDA receptor in the hypothalamus of rats fed on control or high-fat diets. Since the hypothalamus is responsive to leptin and insulin, we evaluated if glutamate can modulate hypothalamic neurotransmitter expression through the leptin pathway. Rats were treated via intracerebroventricular (icv) with glutamate or glutamate followed of AG490 (a chemical inhibitor of JAK2 – inicial leptin pathway protein). Our results showed that icv glutamate reduce food intake and body weight, modulating the orexigenic and anorexigenic neurotransmitters through a mechanism, at least in part, dependent on leptin pathway.

## 1 – INTRODUÇÃO

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no cérebro, atuando em transmissões sinápticas que participam do funcionamento adequado do sistema nervoso central (SNC). Seus receptores são classificados como metabotrópicos e ionotrópicos. A família de receptores metabotrópicos possui sete domínios transmembrana, são de ação lenta e mobilizam vias de mensageiros secundários relacionados à proteína-G, modulando uma grande variedade de vias enzimáticas, expressão gênica, crescimento e diferenciação celular. Já a família de receptores ionotrópicos possui ação rápida e apresenta três subtipos de proteínas:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA), receptores de ácido kaínico (KA) e receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Van den Pol et al., 1994; Hardingham, 2009; Stanley BG et al., 2011).

Os receptores NMDA são descritos em quase todos os neurônios, desde os períodos iniciais do desenvolvimento neural. Compreendem as subunidades NR1, a qual pode gerar até oito isoformas por *splicing* alternativo (Zukin et al., 1997), NR2A-D e, em alguns casos, NR3A-B. A isoforma mais encontrada é um heterotetrâmero formado pelas subunidades NR1 e NR2, as quais possuem sítios para ligação de glicina (co-agonista) e glutamato (agonista), respectivamente (Figura 1). Para que o receptor NMDA seja ativado é necessário que ocorra despolarização da célula, pois este canal é bloqueado pelo íon magnésio de maneira voltagem-dependente.

Esta despolarização é gerada pela ativação prévia dos receptores AMPA/kainato através do glutamato, permitindo a entrada de íons sódio na célula e a saída do magnésio do canal, por diferença de potencial. Simultaneamente à despolarização, é necessária a ligação da glicina e do glutamato para a ativação do receptor. Após a saída do íon magnésio e a mudança conformacional gerada pela ligação dos agonistas, há um elevado influxo de cálcio através do receptor para o meio intracelular, além da entrada de sódio e saída de potássio em menor proporção (Figura 1) (MacDermott et al., 1986).

O aumento nos níveis intracelulares de cálcio acarreta inúmeros efeitos nas células, como a ativação de proteínas quinases dependentes de cálcio e aumento da liberação de neurotransmissores. Dessa forma, os receptores NMDA estão envolvidos na sobrevivência, maturação e migração dos neurônios, formação de mapas sensoriais e neurodegeneração. No entanto, a ativação excessiva desse receptor leva a excitotoxicidade devido ao aumento exacerbado de íons cálcio no meio intracelular, contribuindo para o desenvolvimento de distúrbios neurodegenerativos, como Parkinson e Alzheimer (Vincent et al., 2006; Hardingham, 2009; Navon et al., 2011).

Acredita-se que a ativação de NMDA em regiões neuroendócrinas do cérebro seja crítica para a regulação do sistema secretor do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), estando assim envolvido no desenvolvimento reprodutivo, principalmente no início da puberdade e durante a ovulação, tendo seu padrão de expressão modificado durante a senescência reprodutiva em fêmeas de ratos (Gore et al., 1996; Miller et al., 2002). Além disso, outros trabalhos relatam a importância do receptor NMDA no diabetes tipo I, evidenciando que a administração de agonistas para receptores NMDA é capaz de atenuar deficiências induzidas pela doença (diminuição da locomoção e da capacidade exploratória) e melhorar o desempenho da memória e atividade locomotora (Grzêda et al., 2007).

Estudos recentes revelam que a ativação de receptores NMDA no tronco cerebral e no complexo vago-dorsal acarretam em redução da ingestão alimentar mediada por colecistocinina e diminuição da produção de glicose hepática em ratos (Lam et al., 2010; Wright et al., 2011). Uma análise por microarranjo realizada em nosso laboratório avaliou a expressão gênica de 1.176 diferentes especificidades de mRNAs no hipotálamo de ratos submetidos à duas condições pró-termogênicas: consumo de dieta hiper-calórica e exposição ao frio. De forma surpreendente, apenas duas proteínas codificadas por esses RNAs mensageiros foram moduladas simultaneamente por ambas as condições termogênicas, correspondendo a apenas 0,17% do total de genes analisados: a

subunidade 2B do receptor NMDA e a proteína-G, ligadora de GTP (de Souza et al., 2008).

Estes resultados sugerem que somente uma parcela pequena de proteínas hipotalâmicas desempenha papel central na integração de mecanismos hipotalâmicos envolvidos na regulação da termogênese. Assim, a caracterização funcional de tais proteínas pode gerar perspectivas para desenvolvimento de fármacos mais específicos para o tratamento de obesidade, contribuindo para avanços na compreensão dos complexos mecanismos envolvidos com o desenvolvimento dessa doença. De fato, o tratamento atual da obesidade carece de métodos mais eficazes. Abordagens comportamentais como controle nutricional e estímulo à prática desportiva levam, na maior parte das vezes, à redução de menos de 10% da massa corporal. Medicamentos atualmente aprovados para o uso clínico raramente promovem perdas superiores a 15% do peso inicial. Porém, recidivas são a regra, e em geral levam a um ganho de peso superior ao peso inicial (Velloso e Schwartz, 2011).

A obesidade resulta da interação entre fatores genéticos, metabólicos, comportamentais e ambientais e é atualmente um dos mais importantes problemas de saúde pública das sociedades modernas, acometendo cerca de 300 milhões de indivíduos no mundo todo. Seu estabelecimento se dá por um aumento absoluto ou relativo do consumo de alimentos com alto teor calórico associado a uma redução progressiva da atividade física, ou seja, um desequilíbrio entre ingestão de alimento e gasto de energia, funções que são finamente controladas por neurônios especializados do hipotálamo. Na prática clínica, a obesidade é diagnosticada através do cálculo do índice de massa corpórea (IMC), obtido pela divisão do peso pelo quadrado da altura ( $\text{kg/m}^2$ ). Indivíduos com IMC entre 18-25 são considerados normais, entre 25-30 com sobrepeso e  $>30$  são considerados obesos (Kopelman, 2000; Stein e Colditz, 2004; Baskin et al., 2005; Velloso e Schwartz, 2011).

Projeções da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam para o ano de 2025 prevalências de obesidade superiores a 25% no Brasil e 50% nos Estados Unidos (Figura 2). Atualmente no Brasil existem cerca de 40% de indivíduos com sobrepeso e 11% com algum grau de obesidade. Uma vez instalada, essa doença predispõe a um risco aumentado do desenvolvimento de diversas comorbidades associadas, tais como diabetes tipo 2, hipertensão, aterosclerose, dislipidemias e alguns tipos de câncer (Figura 2) (Kopelman, 2000; Stein e Colditz, 2004; Baskin et al., 2005; Velloso e Schwartz, 2011).

Com a identificação da leptina em 1994, foi possível expandir o conhecimento acerca dos fenômenos biológicos que participam do controle neural da fome e gasto energético, os quais são finamente controlados por neurônios especializados do hipotálamo. A leptina é um hormônio produzido pelo tecido adiposo branco em quantidade diretamente proporcional à massa total deste tecido. Seu principal sítio de ação são neurônios localizados no núcleo arqueado do hipotálamo. Para alcançar estes neurônios, a leptina atravessa a barreira hematoencefálica, utilizando um sistema saturável de transporte mediado por receptores. Liga-se então ao seu receptor (ObRb), o qual sofre mudança conformacional e desencadeia uma cascata de transdução de sinal mediada pela via JAK2/STAT3 (Zhang et al., 1994; Friedman et al., 1998; Schwartz et al., 2000; Flier, 2004).

Nesta via, a proteína janus quinase – 2 (JAK2) é ativada, se autofosforila e fosforila outra proteína JAK2 em resíduos de tirosina. Essas proteínas fosforilam o receptor de leptina, que se torna um sítio de ancoragem para o fator de transcrição STAT3. A STAT3 fosforilada se dimeriza e transloca-se para o núcleo onde é capaz de regular a transcrição de genes de neurotransmissores responsivos ao sinal hormonal (Figura 3) (Sahu, 2004).

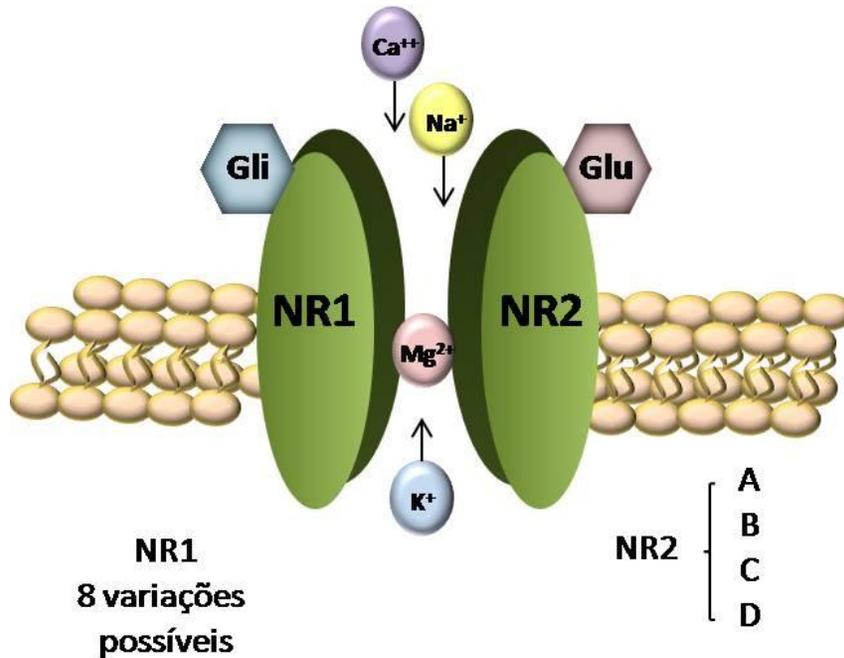
Pelo menos dois grupos distintos de neurônios de primeira ordem estão presentes no núcleo arqueado, ambos possuindo receptores para leptina e insulina: neurônios produtores dos neurotransmissores orexigênicos NPY e AgRP

(NPY/AgRPérgicos), e neurônios produtores dos neurotransmissores anorexigênicos POMC e CART (POMC/CARTérgicos). Esses neurônios sinalizam para outras duas subpopulações de neurônios orexigênicos e anorexigênicos de segunda ordem, localizados no hipotálamo lateral e no núcleo paraventricular, respectivamente. No hipotálamo lateral ocorre a produção dos neuropeptídeos orexigênicos MCH e orexina e no núcleo paraventricular ocorre a produção dos neuropeptídeos anorexigênicos CRH e TRH (Tritos et al., 1998; Tritos et al., 2001; Schwartz et al., 2000).

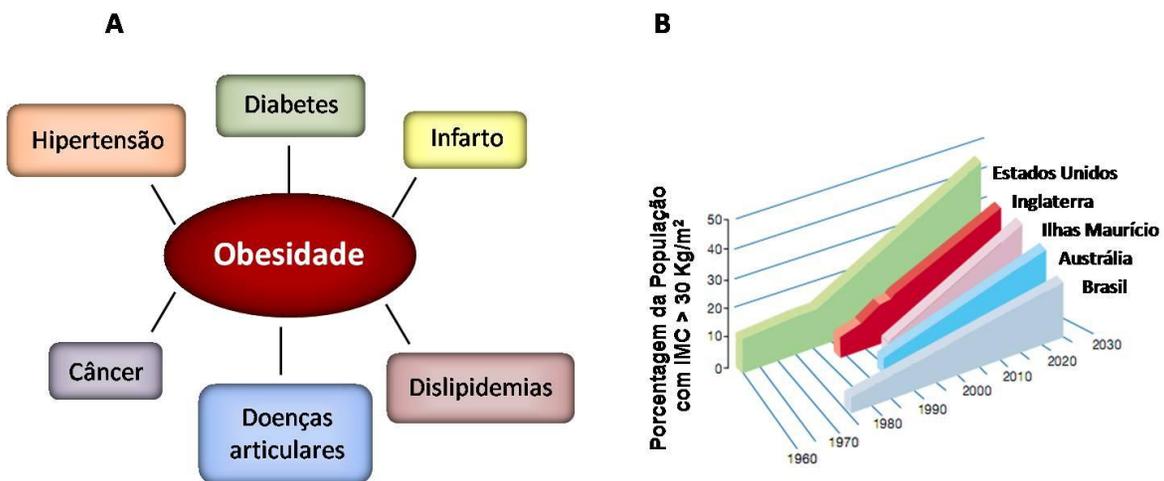
Num ambiente onde predominam os baixos níveis de leptina e insulina, como, por exemplo, durante o jejum prolongado e em indivíduos com baixo percentual de gordura corporal, a maior parte dos receptores de insulina e leptina no núcleo arqueado está desocupada. Nesta situação, predominam os sinais e conexões excitatórios para os neurônios NPY/AgRPérgicos e os sinais e conexões inibitórios para os neurônios POMC/CARTérgicos. Como resultado, há aumento da expressão de orexina e MCH no hipotálamo lateral, acompanhado da redução da expressão de TRH e CRH no núcleo paraventricular (Schwartz et al., 2000; Spiegelman e Flier, 2001). Essa sinalização acarreta em um aumento da fome e diminuição da termogênese (Figura 4a).

Por outro lado, após uma refeição, quando principalmente os níveis de insulina se elevam, ou quando há discreto ganho de massa de tecido adiposo, como, por exemplo, no período pós-prandial ou após um período de ingestão alimentar média aumentada, predominam sinais e conexões inibitórias para os neurônios NPY/AgRPérgicos e sinais e conexões excitatórios para neurônios POMC/CARTérgicos, resultando em uma redução da expressão de orexina e MCH no hipotálamo lateral e aumento da expressão de TRH e CRH no núcleo paraventricular (Schwartz et al., 2000; Spiegelman e Flier, 2001). Nessas condições, há uma diminuição da fome e um aumento da termogênese (Figura 4b).

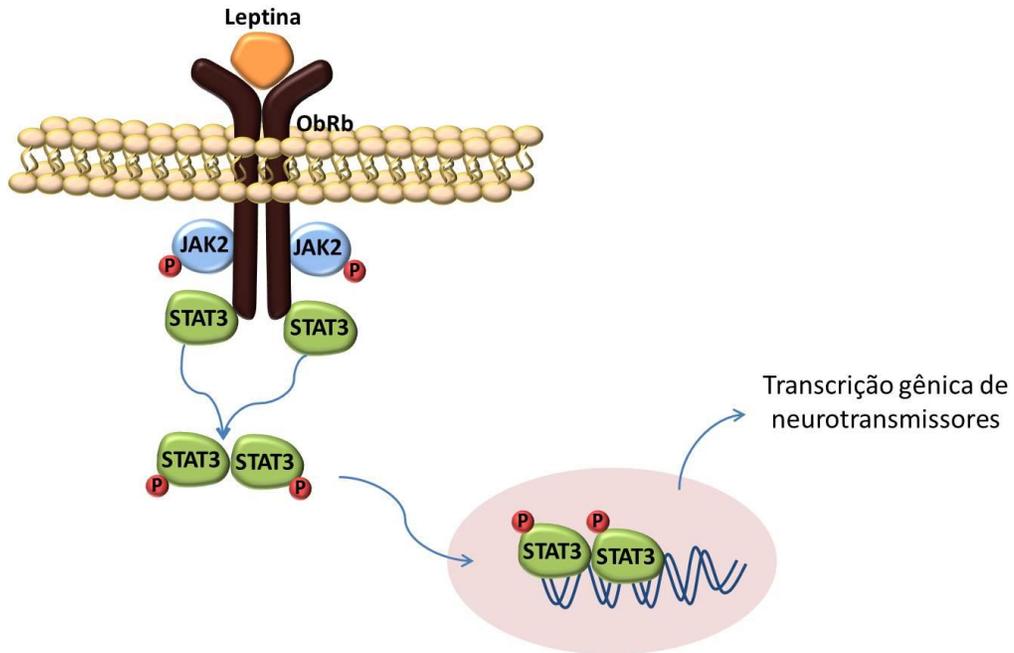
Frente a estes fatos, a caracterização de outros mecanismos regulatórios da atividade de neurônios controladores de fome e gasto energético pode abrir novas perspectivas para desenvolvimento de fármacos para obesidade. Como abordagem inicial nessa busca, planejamos investigar neste trabalho se a ativação dos receptores NMDA por glutamato pode modular a expressão de neurotransmissores hipotalâmicos envolvidos no controle de fome e termogênese de maneira dependente da via da leptina. Nossos resultados mostraram que a administração intracerebroventricular de glutamato reduz a ingestão alimentar e o peso dos animais, modulando a expressão de neurotransmissores orexigênicos e anorexigênicos de maneira parcialmente dependente da via da leptina, através da proteína JAK2.



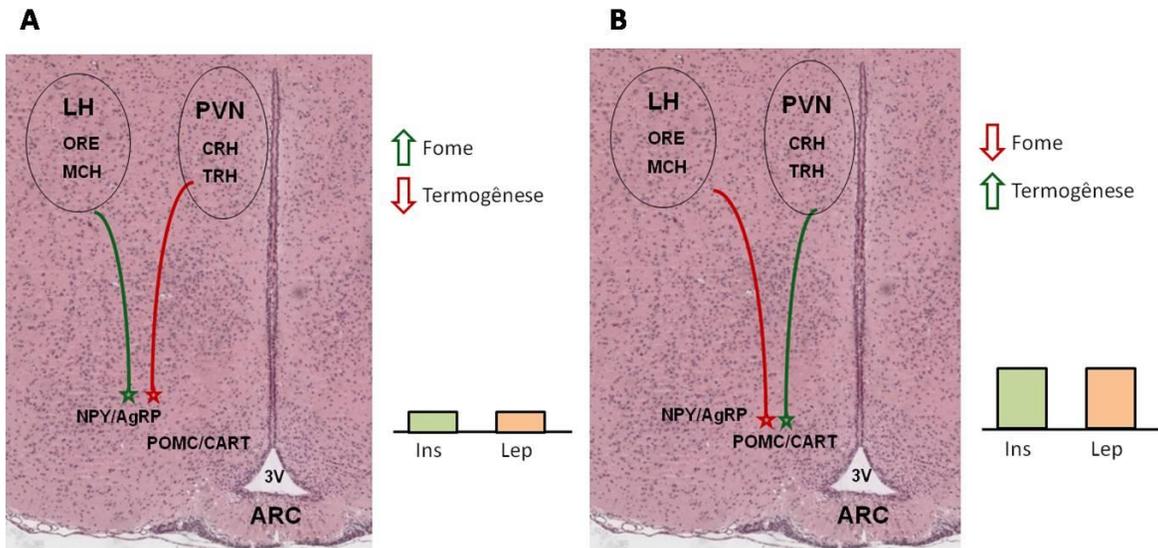
**Figura 1:** Receptor NMDA. A isoforma mais comumente encontrada do receptor é um heterotetrâmero composto por duas subunidades NR1 e duas subunidades NR2, ativadas por glicina e glutamato, respectivamente. Após despolarização da célula, ocorre o desbloqueio do canal pela saída do íon magnésio, acarretando no influxo dos íons cálcio e sódio para o meio intracelular, com saída do íon potássio para o meio extracelular.



**Figura 2:** A) Comorbidades associadas ao estabelecimento da obesidade. B) Projeções para o número de indivíduos obesos em 2025.



**Figura 3:** Esquema da via de sinalização da leptina.



**Figura 4:** Ação dos hormônios leptina e insulina sobre o hipotálamo. A) Sinalização hipotalâmica quando os níveis séricos de insulina e leptina estão diminuídos. B) Sinalização hipotalâmica quando os níveis séricos de insulina e leptina estão aumentados.

## **2 - OBJETIVOS**

### ***Gerais***

Caracterizar a distribuição de receptores NMDA em hipotálamo de ratos e avaliar a participação da atividade glutamatérgica na regulação dos neurotransmissores hipotalâmicos orexigênicos (NPY, AgRP, MCH, ORE) e anorexigênicos (POMC, CART, CRH, TRH).

### ***Específicos***

- Avaliar, por meio de imunohistoquímica de fluorescência, a distribuição do receptor NMDA em hipotálamo de ratos e sua possível co-localização com os neurotransmissores hipotalâmicos orexigênicos e anorexigênicos.

- Avaliar, por meio de PCR em tempo real, a expressão de neurotransmissores hipotalâmicos orexigênicos e anorexigênicos após tratamento intracerebroventricular (icv) com glutamato (agonista de NMDA) e glutamato seguido de AG490 (inibidor de JAK2 – proteína da via da leptina) em ratos submetidos à 8 semanas dieta padrão e dieta hiperlipídica.

- Avaliar ingestão alimentar, peso, calorimetria indireta e atividade locomotora voluntária após tratamento icv com glutamato e glutamato seguido de AG490 em ratos submetidos à 8 semanas dieta padrão e dieta hiperlipídica

### 3 – CAPÍTULO 1: Artigo

Article

---

#### **Hypothalamic action of glutamate leads to body mass reduction through a mechanism partially dependent on JAK2**

Daniela S. Razolli<sup>1</sup>, Carina Solon<sup>1</sup>, Erika Anne Roman<sup>1</sup>, Letícia M. Ignacio-Souza<sup>1</sup>, Licio A. Velloso<sup>1\*</sup>

*<sup>1</sup>Laboratory of Cell Signaling, University of Campinas, Brazil*

Running head: Glutamate action in the hypothalamus

**Key words: Leptin, obesity, neurotransmitter, feeding.**

Figures: 5

Tables: 1

\*LAV is the corresponding author: Laboratory of Cell Signaling, University of Campinas, 13084-761, Campinas SP, Brazil.

Phone: 55 19 35218022

Email: lavelloso.unicamp@gmail.com

## **Abstract**

Glutamate acts in the hypothalamus promoting region-, and cell-dependent effects on feeding. Part of these effects are mediated by NMDA receptors, which are up regulated in conditions known to promote increased food intake and thermogenesis, such as exposure to cold and consumption of highly caloric diets. Here, we hypothesized that at least part of the effect of glutamate on hypothalamic control of energy homeostasis would depend on the control of neurotransmitter expression and JAK2 signaling. The expression of NMDA receptors was co-localized to NPY/AgRP, POMC, CRH and MCH but not to TRH and orexin neurons of the hypothalamus. The acute intracerebroventricular injection of glutamate promoted a dose dependent increase in JAK2 tyrosine phosphorylation. In obese rats, five days' intracerebroventricular treatment with glutamate resulted in the reduction of food intake, accompanied by a reduction of spontaneous motility and reduction of body mass, without affecting oxygen consumption. The reduction of food intake and body mass were partially restrained by the inhibition of JAK2. In addition, glutamate produced an increased hypothalamic expression of NPY, POMC, CART, MCH, orexin, CRH and TRH, and the reduction of AgRP. All these effects on neurotransmitters were hindered by the inhibition of JAK2. Thus, the intracerebroventricular injection of glutamate results in the reduction of body mass through a mechanism, at least in part, dependent on JAK2, and on the broad regulation of neurotransmitter expression. These effects are not impaired by obesity, which suggest that glutamate actions in the hypothalamus may be pharmacologically explored to treat this disease.

## Introduction

Glutamate elicits orexigenic and/or anorexigenic responses when injected directly in the hypothalamus. These effects depend on the site of injection and other variables such as time-course and dose (Guard *et al.*, 2009; Stanley *et al.*, 2011). All three ionotropic glutamate receptors' subtypes, NMDA, AMPA and KA are known to play a role in these responses and defining the mechanisms behind this control may provide valuable information for the development of drugs for the treatment of obesity and related disorders (Doane *et al.*, 2007; Stanley *et al.*, 2011).

Recently we reported that rats submitted to two different pro-thermogenic conditions, i.e., cold exposure and feeding on a high-fat diet, would selectively and coincidentally modulate only a minority of hypothalamic genes, suggesting that the products of such genes would play important roles in energy homeostasis (De Souza *et al.*, 2008). One of the genes is NMDA2B, which codes for a subunit of the NMDA receptor. Upon both cold exposure and high-fat feeding the expression of NMDA2B increases by approximately 3-fold (De Souza *et al.*, 2008).

A number of studies have evaluated the mechanisms by which NMDA plays a role in the control of food intake (Zhang & Fogel, 2002; Guard *et al.*, 2009; Stanley *et al.*, 2011). At the cellular level, the activation of NMDA leads to increased excitability and neurotransmitter release (Zhang & Fogel, 2002; Guard *et al.*, 2009; Stanley *et al.*, 2011). Depending on the neuron type responding to glutamate, orexigenic or anorexigenic neurotransmitter can be released (Zhang & Fogel, 2002; Guard *et al.*, 2009; Stanley *et al.*, 2011). In neurons of the arcuate nucleus, insulin and leptin act in concert to provide the most robust anorexigenic signals (Figlewicz & Benoit, 2009). These signals control both neurotransmitter expression and release, and the activation of JAK2 provides the cross-talk between the signaling systems of these hormones (Villanueva & Myers, 2008). Here we tested the hypothesis that hypothalamic glutamate modulates food intake and energy homeostasis by mechanisms dependent on JAK2 activation and

neurotransmitter expression. Our results reveal that intracerebroventricular injection of glutamate results in body mass loss through a mechanism at least in part dependent on JAK2 activation.

## **Materials and methods**

*Antibodies, chemicals and buffers.* Anti-NR2B (sc-1469, goat polyclonal), Anti-NPY (sc-28943, rabbit polyclonal); Anti-POMC (sc-20148, rabbit polyclonal); Anti-AgRP (sc-18634, rabbit polyclonal); Anti-MCH (sc-28931, rabbit polyclonal); Anti-CRH (sc-5543, rabbit polyclonal); and FITC or rodamin conjugated goat and rabbit antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). L-glutamic acid ( $C_5H_9NO_4$  P.M: 147.13) was from Synth (Diadema, Brazil) and the JAK2 inhibitor AG490 was from EMD Chemicals (Darmstadt, Germany).

*Animal model and experimental protocols.* In all experiments, 8 w old, male Wistar rats with a body mass of 250-300 g were employed. The animals were maintained on a 12:12 h artificial light-dark cycle and housed in individual cages. After random selection, rats were submitted for eight weeks to a control or high-fat (HF) diet, as presented in Table 1. The investigation followed the University guidelines for the use of animals in experimental studies and conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23 revised 1996). The animals were stereotaxically instrumented to receive a cannula placed in the lateral ventricle, following the stereotaxic coordinates: anteroposterior, 0.2 mm/lateral, 1.5 mm/depth, 4.0 mm. After seven days, the correct location of the cannula was tested by injecting 2.0  $\mu$ l angiotensin II ( $10^{-6}$  M) and determining the thirst response. For this, rats were water deprived for two hours and immediately after icv injection of angiotensin II, a bottle containing 10.0 ml water was made available. Only the rats spontaneously drinking at least 5.0 ml water in 30 min were considered correctly cannulated and used in the experiments. For evaluation of

relative expression of mRNA by real time PCR rats were treated twice a day for 5 days with 2.0  $\mu$ l of saline, glutamate (30nM) or AG490 (10nM) + glutamate (30nM).

**Table 1. Macronutrient composition of the diets.**

	Standard Chow		High-Fat Chow	
	g%	kJ%	g%	kJ%
Protein	20	19	20	14
Carbohydrate	76	72	45	31
Saturated fat	4		35	55
kJ/g	17.5		24.1	

*Real-time PCR.* The expressions of hypothalamic neurotransmitter mRNAs were measured in hypothalamus obtained from rats treated icv according to the protocols described above. Intron-skipping primers were obtained from Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase primers were used as a control. Real-time PCR analysis of gene expression was performed with an ABI Prism 7500 sequence detection system (Applied Biosystems). The optimal concentration of cDNA and primers, as well as the maximum efficiency of amplification, were obtained through seven-point, three-fold dilution curve analysis for each gene. Each PCR contained 3.0 ng of reverse-transcribed RNA, 200 nM of each specific primer, TaqMan™ (Applied Biosystems), and RNase free water in a final volume of 10  $\mu$ l. Real-time data were analyzed using the Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems).

*Oxygen Consumption/Carbon Dioxide Production and Respiratory Exchange Ratio Determination.* Oxygen consumption/carbon dioxide production and respiratory exchange ratio (RER) were measured in fed animals through a computer-controlled, open circuit calorimeter system LE405 Gas Analyzer (Panlab – Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Rats were singly housed in clear

respiratory chambers and room air was passed through chambers at a flow rate of 0.8 l/min. The air flow within each chamber was monitored by a sensor Air Supply & Switching (Panlab – Harvard Apparatus). Gas sensors were calibrated prior to the onset of experiments with primary gas standards containing known concentrations of O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> (Air Liquid, Sao Paulo, Brazil). The analyses were performed in triplicate of 6 min for each chamber. Therefore, each rat was evaluated for 18 min. Outdoor air reference values were sampled after every four measurements. Sample air was sequentially passed through O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> sensors for determination of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> content, from which measures of oxygen consumption (VO<sub>2</sub>) and carbon dioxide production (VCO<sub>2</sub>) were estimated. The VO<sub>2</sub> and VCO<sub>2</sub> were calculated by Metabolism 2.2v software and expressed in mL.h<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>, based on Withers equation and the RER was calculated using VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>.

*Immunofluorescence staining.* For histological evaluation, hypothalamic tissue samples were fixed in 10% formaldehyde and processed routinely for embedding in paraffin block. The samples were submitted to dehydration (alcohol at 70%, 80%, 90%, 95% and absolute) being diaphanized by immersion in xylol and embedded in paraffin. Hydrated (alcohol at absolute, 95%, 90%, 80%, and 70%) 5.0 µm paraffin sections were processed for immunofluorescence staining. The expressions of NDMA and hypothalamic neurotransmitters were analyzed. The images were obtained using a Confocal Laser Microscopy (LSM510, Zeiss, New York, NY, USA). Analysis and documentation of results were performed using a Leica FW 4500 B microscope.

*Statistical analysis.* Mean ± S.E. values obtained from the experiments were compared utilizing Student's *t* test for paired samples or by repeat-measure analysis of variance (one-way or two-way analysis of variance) followed by post hoc analysis of significance (Tukey test) when appropriate. A *p* < 0.05 was accepted as statistically significant.

## Results

*NMDA is expressed in several subpopulations of neurons in the hypothalamus.* Double staining immunofluorescence assays were employed to determine the distribution of NMDA receptors in hypothalamic neurons of rats. In the arcuate nucleus NMDA co-localized with AgRP (Fig. 1A), NPY (Fig. 1B) and POMC (Fig. 1C). In the lateral hypothalamus only MCH neurons expressed NMDA (Fig. 2A), while in the paraventricular hypothalamus only CRH neurons expressed NMDA (Fig. 2B). In orexin and TRH neurons, no expression of NMDA was detected (not shown).

*Glutamate modulates neurotransmitter expression in the hypothalamus.* Lean and obese rats were icv cannulated and treated for five days with glutamate or glutamate plus AG490. In lean rats, the effects of glutamate were discrete, leading to an increased expression of NMDA2B (Fig. 2A), which was accompanied by a reduction of NPY (Fig. 2B), POMC (Fig. 2D) and orexin (Fig. 2F). No changes in the expression of AgRP (Fig. 2C), CART (Fig. 2E), MCH (Fig. 2G), CRH (Fig. 2H) and TRH (Fig. 2I) were induced by glutamate. The simultaneous treatment with AG490 inhibited the effect of glutamate only on the expression of NPY and POMC. In obese rats, glutamate promoted increases of expression of NPY, POMC, CART, TRH, CRH, orexin and MCH, and reduction of AgRP, only. Simultaneous treatment with AG490 was capable of completely inhibiting the effect of glutamate on all of the neurotransmitters.

*Icv glutamate reduces body mass through a mechanism dependent on the reduction of food intake.* In lean rats, glutamate produced a significant reduction of food intake (Fig. 4A) which resulted in a reduction of body mass (Fig. 4B). This was not accompanied by changes in oxygen consumption/carbon dioxide production and respiratory quotient (Fig. 4C-E), but was paralleled by a reduction of spontaneous activity (Fig. 4F). The simultaneous treatment with AG490 was not sufficient to revert the effects of glutamate on food intake (Fig. 4A), body mass (Fig. 4B) and spontaneous activity (Fig. 4F). Similarly, in obese rats, glutamate

produced a reduction of food intake (Fig. 5A) and a reduction of body mass (Fig. 5B). As in the lean rats, glutamate produced no changes in oxygen consumption/carbon dioxide production and respiratory quotient (Fig. 5C-E) but led to a significant reduction of spontaneous activity (Fig. 5F). However, in the obese rats, the treatment with AG490 resulted in a reversal of the glutamate-induced reduction of food intake (Fig. 5A).

## **Discussion**

Glutamate is the most important excitatory neurotransmitter in the mammalian brain (Monaghan *et al.*, 1989). In the hypothalamus, it acts through three distinct ionotropic receptor subtypes, NMDA, AMPA and KA, to exert site specific effects on food intake and energy expenditure (Meister, 2007; Stanley *et al.*, 2011).

In a recent study, we observed that the expression of the NMDA2B subunit of the NMDA receptor is increased in the hypothalamus of rodents exposed to two environmental conditions known to increase food intake and thermogenesis, i.e., exposure to cold and high-fat feeding (De Souza *et al.*, 2008). Under either condition, the control of feeding elicited by hormonal inputs, particularly insulin and leptin, is impaired (Torsoni *et al.*, 2003; De Souza *et al.*, 2008; Velloso & Schwartz, 2011), and defining mechanisms capable of reverting such impairment may provide novel potential targets for the treatment of obesity.

The main intracellular pathway transducing the leptin signal in the hypothalamus depends on the activation of the tyrosine kinase JAK2 (Sahu, 2004). As a consequence of a cross-talk with the PI3K signaling system, JAK2 modulates not only neurotransmitter expression but also neurotransmitter release, through the regulation of neuronal depolarization (Carvalheira *et al.*, 2001; Bjorbaek & Kahn, 2004). Therefore we decided to evaluate if the control of feeding elicited by glutamate would be modulated by JAK2, providing a connection between the rapid effects of glutamate and the more robust effects of leptin.

First, we evaluated the distribution of the NMDA receptor in all hypothalamic nuclei known to play important roles in the control of energy homeostasis in the body. The presence of glutamatergic innervations in NPY and POMC neurons was previously reported (Kiss *et al.*, 2005). Here we showed that NMDA is expressed in AgRP, NPY, POMC, MCH and CRH neurons of the arcuate, lateral and paraventricular nuclei of the hypothalamus. This is in pace with the fact that glutamate exerts distinct actions on feeding depending on the site of injection (Stanley *et al.*, 2011). It is of particular relevance the series of studies performed by Stanley and collaborators exploring the mechanisms by which glutamate increases food intake when acting directly in the lateral hypothalamus (Stanley *et al.*, 2011).

As our main interest was to investigate an eventual connection between the actions of glutamate and elements belonging to the leptin signaling system, we decided to treat rats with glutamate through a cannula placed in the lateral ventricle. This site is in close anatomical relation with the hypothalamus, and is frequently used in experimentation aimed at studying feeding and thermogenesis. Injection of hormones and drugs through a cannula placed in this site provides a reproducible access to hypothalamic regions involved in the control of these functions (Milanski *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2009).

Icv glutamate treatment for five days led to an increase in the hypothalamic expression of the NMDA2B receptor subunit either in lean or obese rats. These effects were abolished by the inhibition of JAK2. Interestingly, in lean rats, the treatment with glutamate promoted a reduction in the expression of NPY, POMC and orexin, while in obese rats, glutamate led to an increased expression of NPY, POMC, CART, orexin, MCH, TRH and CRH and a reduction of AgRP, only. All the effects of glutamate, either in lean or obese rats, were reverted by the inhibition of JAK2, except for orexin in the lean group.

The effect of glutamate modulating the expression of a number of hypothalamic neurotransmitters provides further support for its broad role in the control of energy homeostasis (Stanley *et al.*, 2011). However it is interesting that,

depending on the energy status of the animal, its effects on neurotransmitter expression can be completely shifted. Recent studies have revealed that in obese rodents and humans, the hypothalamus becomes dysfunctional due to the installation of an inflammatory process (Milanski *et al.*, 2009; van de Sande-Lee *et al.*, 2011; Velloso & Schwartz, 2011). The expression/activation of inflammatory proteins in the hypothalamus targets leptin and insulin action which results in the loss of the coordinated control of neurotransmitter expression/release, thus, impacting on the neural control of feeding and thermogenesis. We suspect that the shift on the effect of glutamate on neurotransmitter expression when lean and obese rodents are compared is yet another consequence of the diet-induced hypothalamic inflammation/dysfunction. Interestingly, the inhibition of JAK2 was capable of completely reversing the effects of glutamate on almost all neurotransmitters evaluated, and this was independent of the diet type employed. It seems that, although hormone action through JAK2 is impaired in obesity, this kinase is still active when responding to glutamate.

In order to investigate the functional outcomes of glutamate action in hypothalamus, we evaluated food intake, body mass variation, indirect calorimetry and spontaneous locomotory activity. Both in lean and obese rats, glutamate produced a reduction of food intake and body mass without affecting oxygen consumption/carbon dioxide production. In addition, glutamate icv was also capable of reducing spontaneous activity. Upon JAK2 inhibition, only the reduction of food intake in obese rats was reversed.

As a whole, this data suggest that the pleotropic effects of glutamate in the hypothalamus results from its isolated actions in distinct neuronal subpopulations. When all glutamate-responsive neurons of the hypothalamus are activated, the result is a reduction of food intake accompanied by reduction of spontaneous activity. In lean rats, this is associated with the regulation of fewer neurotransmitters and is not modulated by the inhibition of JAK2, while in obese rats, all the major neurotransmitters involved in the control of energy homeostasis

are modulated and in all cases, the inhibition of JAK2 results in reversal of the phenomenon.

We suspect that, in lean rats, as the hormonal pathways controlling food intake and energy expenditure are intact, the effect of glutamate on JAK2 is restricted and the capacity of this amino acid to modulate neurotransmitter expression is restricted to a few neuronal subpopulations. Conversely, in obesity, as the hormonal pathways controlling energy homeostasis are impaired, the effect of glutamate on JAK2 and on neurotransmitter expression is enhanced.

In summary, this work shows that glutamate controls neurotransmitter expression in the hypothalamus and part of this effect depends on JAK2. In addition our results suggest that in obesity, glutamate can bypass the impaired signal transduction of leptin through JAK2, to promote a reduction of food intake.

*Acknowledgements.* This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Mr. G. Ferraz and Mr. M. Souza provided valuable technical assistance. We thank Dr. N. Conran for editing the English grammar.

## **References**

Bjorbaek, C. & Kahn, B.B. (2004) Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res*, **59**, 305-331.

Carvalho, J.B., Siloto, R.M., Ignacchitti, I., Brenelli, S.L., Carvalho, C.R., Leite, A., Velloso, L.A., Gontijo, J.A. & Saad, M.J. (2001) Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett*, **500**, 119-124.

De Souza, C.T., Pereira-da-Silva, M., Araujo, E.P., Morari, J., Alvarez-Rojas, F., Bordin, S., Moreira-Filho, D.C., Carvalho, J.B., Saad, M.J. & Velloso,

L.A. (2008) Distinct subsets of hypothalamic genes are modulated by two different thermogenesis-inducing stimuli. *Obesity (Silver Spring)*, **16**, 1239-1247.

Doane, D.F., Lawson, M.A., Meade, J.R., Kotz, C.M. & Beverly, J.L. (2007) Orexin-induced feeding requires NMDA receptor activation in the perifornical region of the lateral hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **293**, R1022-1026.

Figlewicz, D.P. & Benoit, S.C. (2009) Insulin, leptin, and food reward: update 2008. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **296**, R9-R19.

Guard, D.B., Swartz, T.D., Ritter, R.C., Burns, G.A. & Covasa, M. (2009) NMDA NR2 receptors participate in CCK-induced reduction of food intake and hindbrain neuronal activation. *Brain Res*, **1266**, 37-44.

Kiss, J., Csaba, Z., Csaki, A. & Halasz, B. (2005) Glutamatergic innervation of neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin-containing neurons in the hypothalamic arcuate nucleus of the rat. *Eur J Neurosci*, **21**, 2111-2119.

Meister, B. (2007) Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiol Behav*, **92**, 263-271.

Milanski, M., Degasperi, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D.E., Tsukumo, D.M., Anhe, G., Amaral, M.E., Takahashi, H.K., Curi, R., Oliveira, H.C., Carnevali, J.B., Bordin, S., Saad, M.J. & Velloso, L.A. (2009) Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci*, **29**, 359-370.

Monaghan, D.T., Bridges, R.J. & Cotman, C.W. (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **29**, 365-402.

Moraes, J.C., Coope, A., Morari, J., Cintra, D.E., Roman, E.A., Pauli, J.R., Romanatto, T., Carnevalheira, J.B., Oliveira, A.L., Saad, M.J. & Velloso, L.A. (2009) High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One*, **4**, e5045.

Sahu, A. (2004) Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology*, **145**, 2613-2620.

Stanley, B.G., Urstadt, K.R., Charles, J.R. & Kee, T. (2011) Glutamate and GABA in lateral hypothalamic mechanisms controlling food intake. *Physiol Behav*, **104**, 40-46.

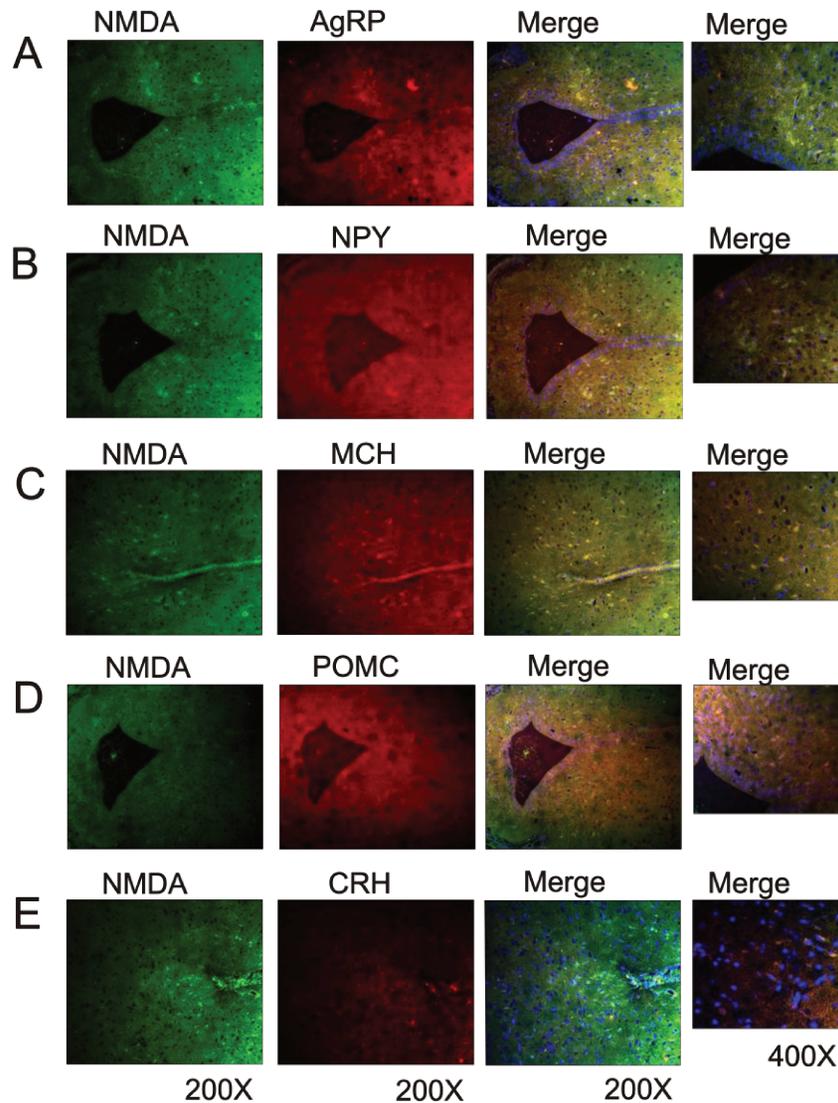
Torsoni, M.A., Carnevalheira, J.B., Pereira-Da-Silva, M., de Carvalho-Filho, M.A., Saad, M.J. & Velloso, L.A. (2003) Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **285**, E216-223.

van de Sande-Lee, S., Pereira, F.R., Cintra, D.E., Fernandes, P.T., Cardoso, A.R., Garlipp, C.R., Chaim, E.A., Pareja, J.C., Geloneze, B., Li, L.M., Cendes, F. & Velloso, L.A. (2011) Partial reversibility of hypothalamic dysfunction and changes in brain activity after body mass reduction in obese subjects. *Diabetes*, **60**, 1699-1704.

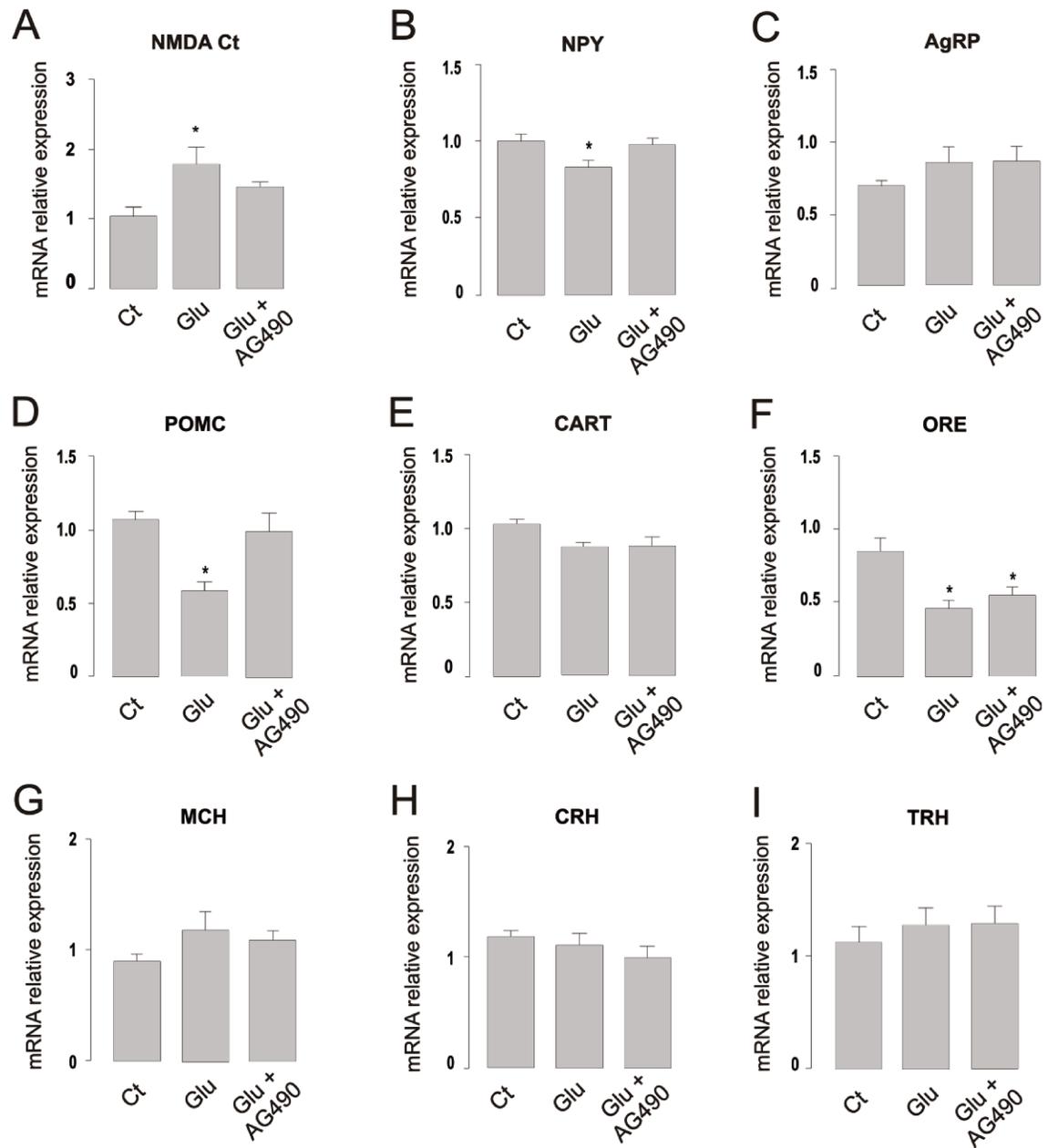
Velloso, L.A. & Schwartz, M.W. (2011) Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)*.

Villanueva, E.C. & Myers, M.G., Jr. (2008) Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Int J Obes (Lond)*, **32 Suppl 7**, S8-12.

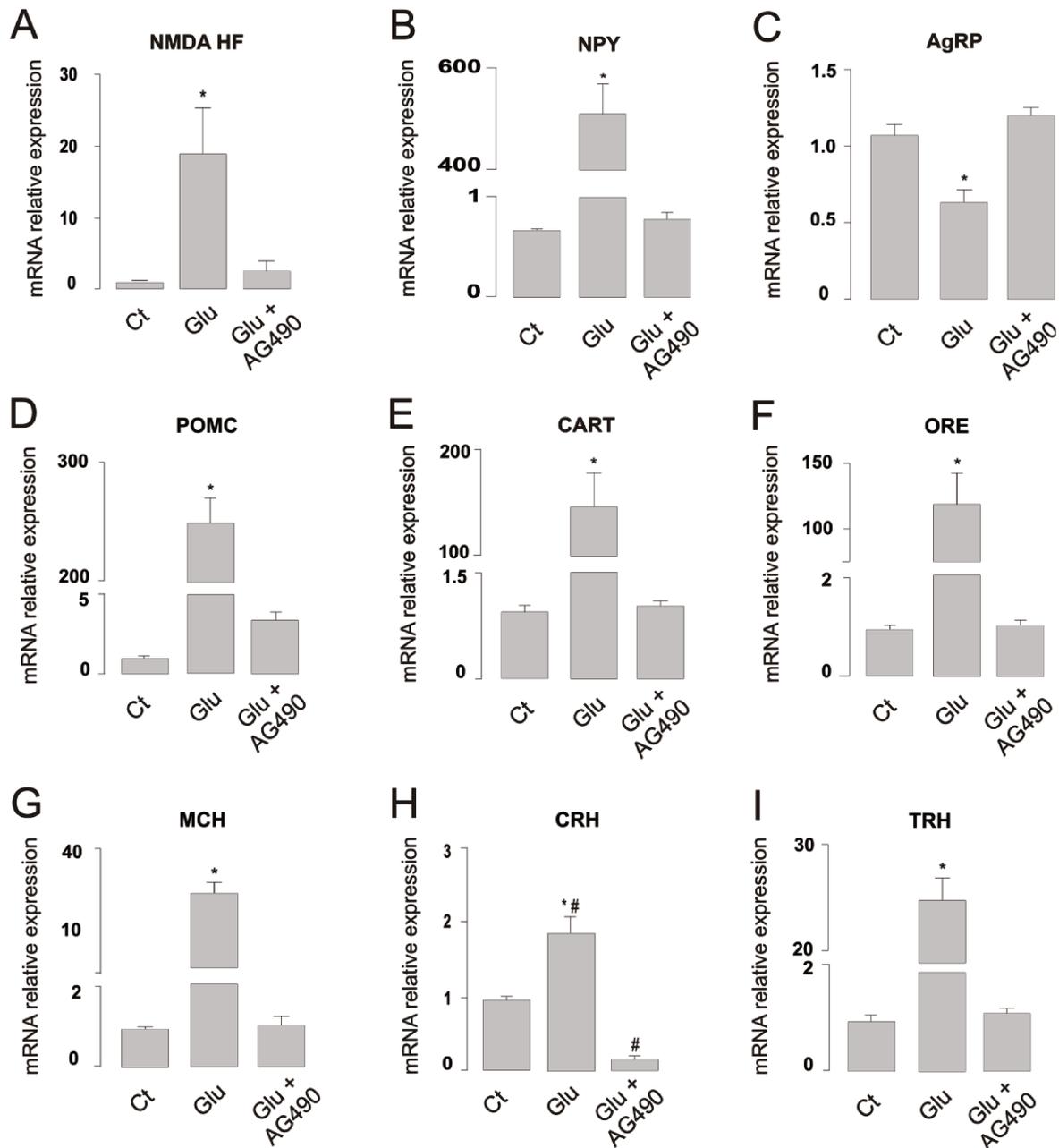
Zhang, X. & Fogel, R. (2002) Glutamate mediates an excitatory influence of the paraventricular hypothalamic nucleus on the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Neurophysiol*, **88**, 49-63.



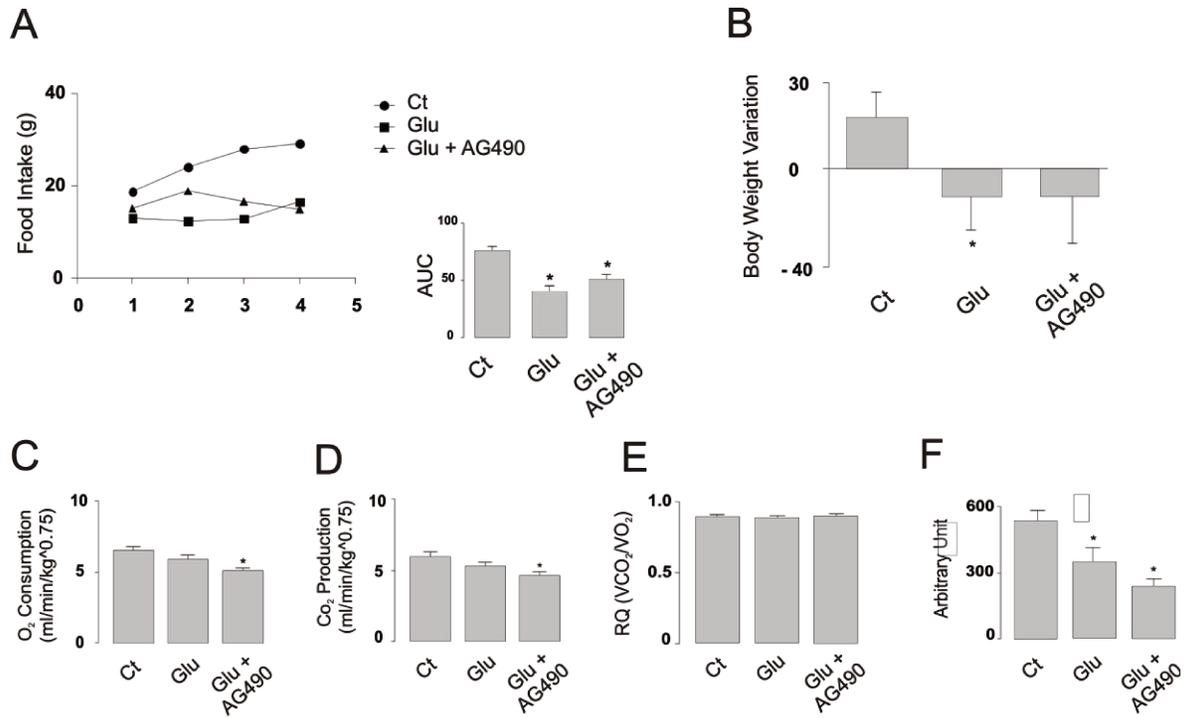
**Figure 1.** Cellular distribution of NMDA receptors in the hypothalamus of rats. Five  $\mu\text{m}$  sections of hypothalamic specimens obtained from male Wistar rats were stained using an anti-NMDA receptor antibody in parallel with anti-AgRP (A), anti-NPY (B), anti-POMC (C), anti-MCH (D) or anti-CRH (E) primary antibodies. FITC- (for NMDA) and rodhamine- (for the remaining neurotransmitters) conjugated secondary antibodies were used. Nuclear staining was obtained with DAPI. In all assays, sections obtained from the anterior, intermediate and posterior hypothalamus were evaluated. Panels are representative of three independent assays for each pair of antibodies.



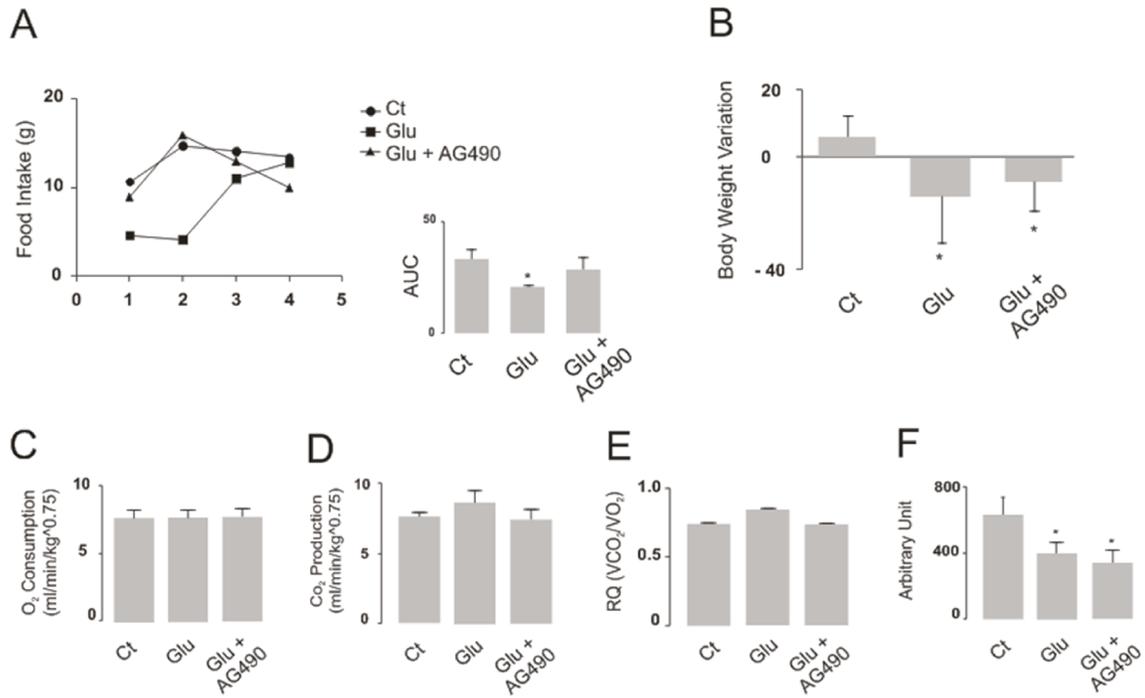
**Figure 2.** Effects of glutamate and JAK2 inhibition on NMDA and hypothalamic neurotransmitter expression in lean rats. Icv cannulated lean rats were treated twice a day for five days with saline (2.0  $\mu$ L) (Ct), glutamate (2.0  $\mu$ L, 30 nM) (Glu) or AG490 + glutamate (2.0  $\mu$ L, 10 nM and 30 nM, respectively) (AG490+Glu) and, on the sixth day, hypothalami were obtained for RNA preparation for real-time PCR for NMDA2B (A), NPY (B), AgRP (C), POMC (D), CART (E), orexin (F), MCH (G), CRH (H) and TRH (I). In all experiments, n=5, \*<0.05 vs. Ct.



**Figure 3.** Effects of glutamate and JAK2 inhibition on NMDA and hypothalamic neurotransmitter expression in obese rats. Icv cannulated obese rats were treated twice a day for five days with saline (2.0  $\mu$ L) (Ct), glutamate (2.0  $\mu$ L, 30 nM) (Glu) or AG490 + glutamate (2.0  $\mu$ L, 10 nM and 30 nM, respectively) (AG490+Glu) and, on the sixth day, hypothalami were obtained for RNA preparation for real-time PCR for NMDA2B (A), NPY (B), AgRP (C), POMC (D), CART (E), orexin (F), MCH (G), CRH (H) and TRH (I). In all experiments, n=5, \* $<$ 0.05 vs. Ct.

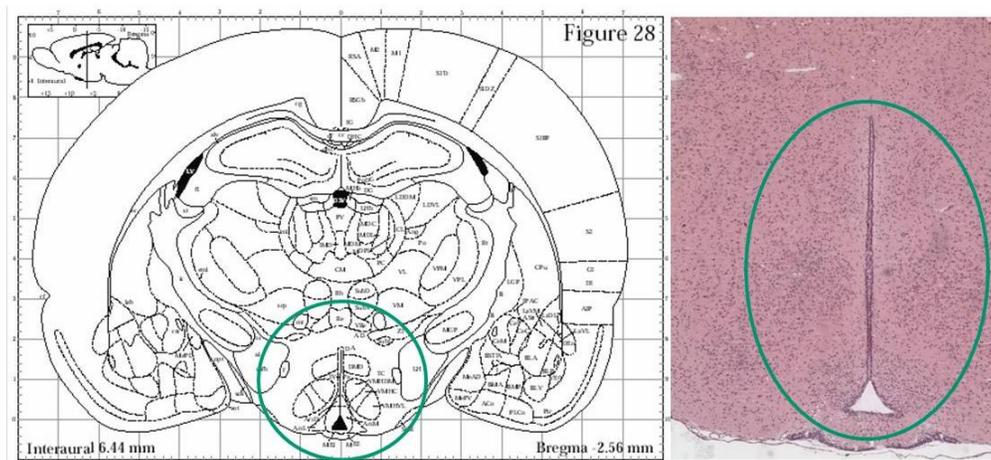


**Figure 4.** Effects of glutamate and JAK2 inhibition on metabolic parameters of lean rats. Icv cannulated lean rats were treated twice a day for five days with saline (2.0  $\mu$ L) (Ct), glutamate (2.0  $\mu$ L, 30 nM) (Glu) or AG490 + glutamate (2.0  $\mu$ L, 10 nM and 30 nM, respectively) (AG490+Glu). During the four initial days food intake was measured (A) and cumulative intake is presented in the inset (A). Body mass variation during the experimental period was calculated (B). On the fifth day indirect calorimetry was performed to obtain oxygen consumption (C), carbon dioxide production (D) and respiratory quotient (RQ) (E). Also, on the fifth day, spontaneous activity was measured (F). In all experiments n = 5, \* $<0.05$  vs. Ct.

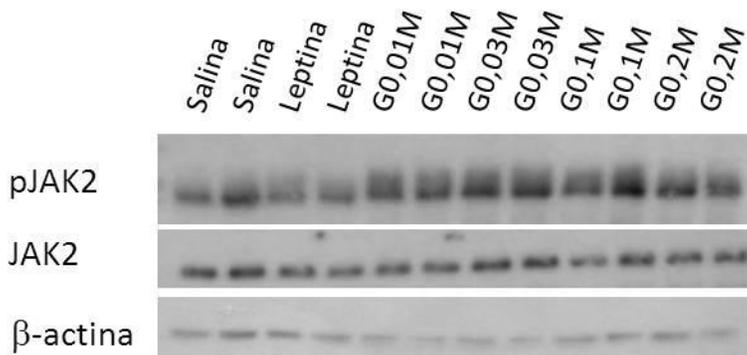


**Figure 5.** Effects of glutamate and JAK2 inhibition on metabolic parameters of obese rats. Icv cannulated obese rats were treated twice a day for five days with saline (2.0  $\mu$ L) (Ct), glutamate (2.0  $\mu$ L, 30 nM) (Glu) or AG490 + glutamate (2.0  $\mu$ L, 10 nM and 30 nM, respectively) (AG490+Glu). During the four initial days food intake was measured (A) and cumulative intake is presented in the inset (A). Body mass variation during the experimental period was calculated (B). On the fifth day indirect calorimetry was performed to obtain oxygen consumption (C), carbon dioxide production (D) and respiratory quotient (RQ) (E). Also, on the fifth day, spontaneous activity was measured (F). In all experiments  $n = 5$ ,  $* < 0.05$  vs. Ct.

#### 4 – RESULTADOS COMPLEMENTARES



**Figura 1:** Hipotálamos de ratos Wistar corados por hematoxilina-eosina (H.E). À esquerda, esquema do Atlas de Coordenadas Estereotáxicas Paxinos & Watson, com o círculo indicando a região do terceiro ventrículo, utilizada como parâmetro anatômico para localização do hipotálamo lateral. À direita, corte histológico corado com hematoxilina-eosina. O círculo evidencia a região do terceiro ventrículo.



**Figura 2:** Análise por Western Blott da pJAK2 no hipotálamo. Ratos wistar foram anestesiados e receberam, pela veia cava abdominal, as seguintes drogas: salina, leptina  $10^{-6}$ M e glutamato (0,01; 0,03; 0,1 e 0,2M). Observa-se que o glutamato aumenta a fosforilação de pJAK2 no hipotálamo. JAK2 e  $\beta$ -actina foram utilizadas como controle endógeno

## 5 – CONCLUSÕES

Nossos resultados mostram que:

- O receptor NMDA co-localiza-se com neurônios AgRP, NPY e MCH do núcleo hipotalâmico orexigênico e com neurônios POMC e CRH do núcleo hipotalâmico anorexigênico.

- A administração via intracerebroventricular de glutamato modula a expressão relativa do RNA mensageiro de neurotransmissores hipotalâmicos orexigênicos e anorexigênicos em animais submetidos à dieta padrão e dieta rica em lipídeos. Essa modulação é revertida quando a proteína da via da leptina JAK2 é inibida.

- Os animais que receberam glutamato apresentaram menor ingestão alimentar e diminuição de peso, sem alteração no consumo de O<sub>2</sub> e produção de CO<sub>2</sub>.

Concluimos assim que a administração de glutamato via intracerebroventricular reduz a ingestão alimentar e o peso dos animais. Ainda, modula a expressão de neurotransmissores hipotalâmicos por meio da ativação do receptor ionotrópico NMDA, de maneira parcialmente dependente da via da leptina, através da proteína JAK2.

## 6 - REFERÊNCIAS

Baskin, ML; Ard, J; Franklin, F; Allison, DB. *Prevalence of obesity in the United States*. *Obes Rev* 2005; 1:5-7.

De Souza, CT; Pereira-da-Silva, M; Araujo, EP; Morari, J; Alvarez-Rojas, F; Bordin, S; Moreira-Filho, DC; Carvalheira, JB; Saad, MJ; Velloso, LA. *Distinct Subsets of Hypothalamic Genes Are Modulated by Two Different Thermogenesis-inducing Stimuli*. *Obesity* 2008; 6:1239-47.

Flier, JS: *Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic*. *Cell* 2004; 116:337-350.

Friedman, JM; Halaas, JL. *Leptin and the regulation of body weight in mammals*. *Nature* 1998; 395:763-770.

Gore, AC; Wu, TJ; Rosenberg, JJ and Roberts, JL. *Gonadotropin-Releasing Hormone and NMDA Receptor Gene Expression and Colocalization Change during Puberty in Female Rats*. *The Journal of Neuroscience* 1996; 17:5281-5289.

Grzêda, E; Wioeniewska, RJ; Wioeniewski, K. *Effect of an NMDA receptor agonist on T-maze and passive avoidance test in 12-week streptozotocin-induced diabetic rats*. *Pharmacological Reports* 2007; 59:656-663.

Hardingham, GE. *Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events*. *Biochem. Soc. Trans.* 2009; 37:1147-1160.

Kopelman, PG. *Obesity as a medical problem*. *Nature* 2000; 404:635-43.

Kopelman, PG. *Health risks associated with overweight and obesity*. *Obesity reviews* 2007; 8:13-17.

Lam, CKL; Chari, M; Su, B; Cheung, GW; Kokorovic, A; Yang, CS; Wang, PYT; Lai, TYY and Lam, TKT. *Activation of N-Methyl-D-aspartate (NMDA) Receptors in the Dorsal Vagal Complex Lowers Glucose Production*. The Journal of Biological Chemistry 2010; 285:21913-21921.

MacDermott, AB; Mayer, ML; Westbrook, GL; Smith, SJ; Barker, JL. *NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cords neurones*. Nature 1986; 321:519-522.

Miller, BH; and Gore, AC. *N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunit Expression in GnRH Neurons Changes during Reproductive Senescence in the Female Rat*. Endocrinology 2002; 143:3568-3574.

Navon, H; Bromberg, Y; Sperling, O; Shani, E. *Neuroprotection by NMDA Preconditioning Against Glutamate Cytotoxicity is Mediated Through Activation of ERK 1/2, Inactivation of JNK, and by Prevention of Glutamate-Induced CREB Inactivation*. J Mol Neurosci 2011; Published online, May.

Sahu, A. Minireview: *A Hypothalamic Role in Energy Balance with Special Emphasis on Leptin*. Endocrinology 2004; 145:2613-2620.

Schwartz, MW; Woods, SC; Porte, Jr. D; Seeley, RJ; Baskin, DG. *Central nervous system control of food intake*. Nature 2000; 404:661-71.

Spiegelman, BM; Flier, JS. *Obesity and the regulation of energy balance*. Cell 2001; 104:531-43.

Stanley BG, Urstadt KR, Charles JR, Kee T. *Glutamate and GABA in lateral hypothalamic mechanisms controlling food intake*. Physiol Behav. 2011; 104:40-6.

Stein, CJ; Colditz, GA. *The epidemic of obesity*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2004; 89:2522-5.

Tritos, NA; Vicent, D; Gillette, J; Ludwig, DS; Flier, ES; Maratos-Flier, E. *Functional interactions between melanin-concentrating hormone, neuropeptide Y, and anorectic neuropeptides in the rat hypothalamus.* Diabetes 1998; 47:1687-92

Tritos. NA; Mastaitis, JW; Kokkotou, E; Maratos-Flier, E. *Characterization of melanin concentrating hormone and preproorexin expression in the murine hypothalamus.* Brain Res. 2001; 895:160-6.

Van den Pol, AN; Kogelman, L; Ghosh, P; Liljelund, P; and Blackstone, C. *Developmental Regulation of the Hypothalamic Metabotropic Glutamate Receptor mGluR1.* The Journal of Neuroscience 1994; 6: 36163634.

Velloso, LA and Schwartz, MW. *Altered hypothalamic function in diet-induced obesity.* International. Journal of Obesity 2011; (1-11).

Vincent, HSC and Lipton, SA. *The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists.* Journal of Neurochemistry 2006; 97:1611-1626.

Wright, J; Campos, C; Herzo, T; Covasa, M; Czaja, K and Ritter, RC. *Reduction of food intake by cholecystikinin requires activation of hindbrain NMDA-type glutamate receptors.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2011; Articles in Press, May.

Zhang, Y; Proença, R; Maffei, M; Barone, M; Leopold, L; Friedman, JM. *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.* Nature 1994; 372:425-32.

Zukin, SR; Bennett, MVL. *Alternatively spliced isoforms of the NMDAR I receptor subunit.* Trends Neurosci. 1995; 7:18-7.

## 7 – ANEXOS: Materiais e Métodos

*Modelo animal.* Ratos Wistar, machos, com 8 semanas de vida e com peso de aproximadamente 250g foram agrupados randomicamente em dois grupos alimentados com dieta padrão para roedores ou dieta rica em gordura saturada, ambas de acordo com as recomendações nutricionais para roedores estabelecidas pela AIN (Tabela 1). Após 08 semanas nas respectivas dietas os animais foram utilizados nos procedimentos experimentais.

**Tabela 1 – Composição das dietas**

<b>Ingredientes</b>	<b>Controle (g)</b>	<b>Hiperlipídica rica em saturados (g)</b>
Amido	467,5	115,5
Caseína	200,0	200,0
Amido de Milho dextrinizado	132,0	132,0
Sacarose	100,0	100,0
Óleo de soja	40,0	40,0
Banha de porco	-	312,0
Celulose microfibras (fibra)	50,0	50,0
Mistura de minerais	35,0	35,0
Mistura de vitaminas	10,0	10,0
L-cistina	1,8	1,8
Bitartarato de colina	2,5	2,5
<b>Total</b>	<b>1000,0</b>	<b>1000,0</b>

*Cirurgia Estereotáxica.* Ratos Wistar machos de 8 semanas de idade (250-300g) foram previamente anestesiados com uma mistura 2:8 de diazepam (5,0 mg/ml) e cloridrato de cetamina (50 mg/ml) por via intraperitoneal. Depois de testados os reflexos corneano e pedioso os animais foram posicionados no aparelho de estereotaxia para a colocação de uma cânula no ventrículo lateral, tendo como parâmetros as coordenadas do atlas Paxinos-Watson (Paxinos et al,

1980). As coordenadas utilizadas foram AP: 0,2 mm; Lateral: 1,5 mm; Profundidade: 4 mm. Após a cirurgia os animais receberam analgesia com paracetamol (3 gotas diluídas em 250ml de água) por 3 dias.

*Infusão Intracerebroventricular (ICV).* Após uma semana de recuperação da cirurgia estereotáxica, o correto posicionamento das cânulas foi verificado pela resposta à ingestão hídrica, subsequente ao tratamento com angiotensina II (2,0 µL de solução  $10^{-6}$ M). Os animais com resposta positiva à angiotensina II foram selecionados e receberam 2,0 µL ICV das seguintes soluções: salina (controle); glutamato (30nM) e AG490 (10nM) + glutamato (30nM). Os animais foram tratados 2X/dia por 5 dias. Para infusão ICV das soluções foi utilizada uma seringa Hamilton (50 µL) acoplada, por meio de uma cânula plástica, a uma agulha 30G, de modo a ultrapassar o comprimento da cânula metálica (0,1 – 0,2 mm) e garantir a entrada do líquido no ventrículo lateral.

*Dissecção do hipotálamo.* Os animais foram anestesiados através da administração intraperitoneal com tiopental sódico (15mg/kg) e a perda dos reflexos pedioso e corneano foram utilizados como controle da anestesia. Após abertura do crânio para retirada do hipotálamo, este foi homogeneizado em 10 volumes de Trizol a 4° C em *Politron PTA 20S generator (Brinkmann Instruments mode PT 10/35)* com velocidade máxima por 30 segundos.

*Extração de RNA de hipotálamo.* Após a homogeneização em trizol, as amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente (15-30°C) para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Foi adicionado às amostras 0,2 mL de clorofórmio / 1 mL de Trizol agitando-se vigorosamente por 15 segundos, com posterior incubação em temperatura ambiente por 3 minutos. O material insolúvel foi precipitado por centrifugação a 12.000g, por 15 minutos, a 4 °C. Após centrifugação as amostras apresentaram duas fases: uma inferior de coloração rosada, denominada orgânica (na qual está solubilizado o DNA) e uma superior mais clara, denominada aquosa (na qual está solubilizado o RNA), e que abrange cerca de 2/3 do volume total. Houve ainda uma interface contendo

proteínas, entre a fase inferior e a superior. Dessa forma, o sobrenadante (contendo o RNA), foi transferido para outro tubo e precipitado com 0,5 ml de isopropanol por 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL de etanol 75 % e centrifugado a 7.500 g, por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de etanol 100 % e centrifugado a 7.500 g, por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (contendo RNA) foi seco à temperatura ambiente. O RNA foi eluído em 30 µL de água *RNAse-free* e quantificado em espectrofotômetro a 260nm. A integridade do RNA obtido foi verificada submetendo as amostras à eletroforese em gel de agarose 1,5 %.

*Reação de transcrição reversa.* A fita-molde de cDNA foi obtida através de uma reação de transcrição reversa. Para tanto, as amostras de RNA foram submetidas a uma seleção do RNAm, utilizando-se um oligonucleotídeo poli dT, e posteriormente à transcrição com a enzima transcriptase reversa. Para a reação, foram utilizados 2µL de *Buffer RT 10X*, 0,8µL de dNTP 25X (100mM), 2µL de *Randon primers RT*, 1µL de *Multi Scribe Reverse Transcriptase*, 8,2µL de água e 6µL de RNA. As amostras foram amplificadas em termociclador com ciclos de 25°C por 10', 2x(37°C 60'), 85°C por 10' e 4°C ∞. O cDNA obtido foi utilizado na reação do PCR em tempo real.

*PCR quantitativo (qPCR) – Real Time PCR.* As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan™ (*Applied Biosystems*), que é constituído por um par de oligonucleotídeos e uma sonda marcada com um fluoróforo. Foram utilizadas as seguintes análises:

- Gene AgRP: Rn01431703\_g1
- Gene NR2B: Rn00561364\_m1
- Gene CART: Rn00567382\_m1
- Gene Orexina: Rn00565995\_m1

- Gene CRH: Rn01462137\_m1
- Gene POMC: Rn00595020\_m1
- Gene MCH: Rn: 00561766\_g1
- Gene TRH: Rn00564880\_m1
- Gene NPY: Rn00561681\_m1

O gene *GAPD* (*TaqMan<sup>TM</sup>* - *Applied Biosystems*) foi escolhido como controle endógeno da reação, o qual serve para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. A sonda *GAPD* estava marcada com o fluoróforo VIC. Antes de iniciar o experimento de quantificação relativa da expressão dos genes acima foi feita a validação do sistema para os mesmos e para o controle endógeno (*GAPD*), para verificar se as eficiências de amplificação foram semelhantes e próximas a 100%. Esse passo é essencial para que o controle endógeno possa ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse. A validação consiste na amplificação dos cDNAs das triplicatas de 7 concentrações diferentes (diluições seriadas de 3 vezes) de uma amostra escolhida aleatoriamente, tanto com os oligonucleotídeos do gene de interesse quanto do controle endógeno.

Em seguida, foi construída uma curva padrão a partir do logaritmo da concentração das amostras pelo Ct (*Threshold Cycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção (*Threshold*), o qual é definido arbitrariamente). Nessa curva, foram obtidos os valores da inclinação (*slope*) da curva e da confiabilidade das réplicas (R2). Dessa forma, a eficiência de um sistema é calculada através da fórmula:  $E = 10^{(-1/slope)} - 1$ . Para a placa de validação dos genes foram feitas triplicatas da amostra de cDNA de hipotálamo referentes aos tratamentos citados acima em 7 concentrações diferentes.

Após o cálculo das eficiências de amplificação do gene de interesse e do controle endógeno, foi construído um gráfico de dispersão, o qual teve por

finalidade definir a amplitude de concentrações para as quais o sistema será eficiente. Para a construção do gráfico, foram utilizados os mesmos valores de logaritmo da concentração das amostras no eixo X e a diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse para cada concentração no eixo Y. A seguir, obteve-se uma linha de tendência para estes valores e a equação de reta na qual foi possível verificar o valor da inclinação desta. Para que um sistema seja considerado eficiente, o valor da inclinação deve ser menor que 0,1 (quanto mais próximo de zero for este valor, menor é a inclinação da curva e, portanto, mais constante é a diferença entre as médias dos Cts do gene de interesse e do controle endógeno). Os pontos no gráfico, correspondentes às concentrações, que estiveram mais próximos à linha de tendência foram considerados validados (o sistema tem 100% de eficiência nestas concentrações).

Para a quantificação relativa do gene em estudo, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata a partir de: 5µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix 2x*, 0,5µL da solução de oligonucleotídeo e sonda, 0,5µL de água e 4,0µL de cDNA. Os ciclos utilizados no termociclador foram: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software (Applied Biosystems)*.

*Coloração por hematoxilina-eosina.* Após desparafinização e hidratação, os hipotálamos foram submetidos à coloração por hematoxilina-eosina. Os cortes foram incubados 30 segundos com hematoxilina, passados em água destilada e incubados por mais 30 segundos com eosina, seguidos de nova passagem em água destilada e desidratação. As lâminas foram montadas com *Entellan*.

*Imunofluorescência de dupla coloração.* Os hipotálamos foram processados por 5 minutos em diferentes concentrações de álcool etílico (70%, 80%, 95% e 100%), xilol, e xilol/parafina. Foram então incluídos em bloco de

parafina, seccionados em cortes de 5,0  $\mu\text{m}$  e fixados em lâminas de microscopia previamente silanizadas. Após um repouso de aproximadamente 24h a 60°C (para completa fixação dos cortes) as lâminas foram desparafinizadas por 5 minutos com xilol, re-hidratadas em diferentes concentrações de álcool etílico e lavadas três vezes por 5 minutos com PBS 0,1M, pH 7,4. Os cortes foram tratados com Triton X-100 2% por 10 min e novamente lavados três vezes por 5 minutos com PBS 0,1M, pH 7,4. As lâminas foram incubadas por 1-2h em solução contendo leite desnatado a 5% para bloquear a ligação inespecífica do anticorpo, seguidas então pela exposição por 12-16h a 4°C, em câmara úmida, a um painel de anticorpos primários Anti-NR2B (sc-1469 goat), Anti-NPY (sc-28943 rabbit); Anti-POMC (sc-20148 rabbit); Anti-AgRP (sc-18634 rabbit); Anti-MCH (sc-28931 rabbit); Anti-CRH (sc-5543 rabbit); e, posteriormente, incubadas com anticorpos secundários FITC-conjugados ou rodamina-conjugados. Em seguida, as lâminas foram coradas com corante nuclear DAPI e montadas adequadamente para análise. As imagens foram obtidas usando o Microscópio Laser Confocal (LSM510, Zeiss, New York, NY, USA) e as análises documentadas utilizando-se o *software Leica LAS 3.6*.

*Calorimetria indireta em ratos.* O consumo de  $\text{O}_2$ , produção de  $\text{CO}_2$  e RQ foram determinados através do analisador de gases *LE405 Gas Analyser (Panlab – Harvard Apparatus)*. Os animais foram aclimatados nas câmaras do analisador de gases por 3 dias consecutivos antes das mensurações. Para análise do consumo de  $\text{O}_2$  e produção de  $\text{CO}_2$  o ar foi direcionado a uma coluna contendo ascarite e gel sílica para remoção do  $\text{CO}_2$  e da água, respectivamente, antes de chegar a um distribuidor com múltiplas saídas, o qual divide o fluxo total em quatro canais (um para cada animal). O fluxo de ar de cada respirômetro foi periodicamente checado por um fluxímetro modelo *Air Suplly & Switching (Panlab – Harvard Apparatus)* para detecção de oscilações menores que 1% durante as medições. Cada um dos 4 canais de fluxo alimenta um respirômetro, sendo que um deles faz tomadas do ar ambiente, como referência basal. Os dados coletados foram analisados através do *software Metabolism 2.2v*. Antes do início do experimento, os animais foram estabilizados nas câmaras por 1:30h. As análises

foram realizadas em triplicada durante 6 min para cada gaiola, com fluxo de ar de 0,8L/min (para ratos de aproximadamente 500g). Dessa forma, cada animal foi avaliado num tempo de 18 minutos. Os  $VO_2$  e o  $VCO_2$  foram calculados pelo programa *Metabolism 2.2v* baseados na equação de Withers e expressos como  $mL \cdot h^{-1} \cdot g^{-1} \cdot 0,75$ . O quociente respiratório (QR) foi calculado como  $VCO_2/VO_2$ .

*Imunoblotting.* Para análise da expressão protéica, ratos Wistar foram anestesiados e receberam, pela veia cava abdominal, as seguintes drogas: salina, leptina  $10^{-6}M$  e glutamato (0,01; 0,03; 0,1 e 0,2M). O hipotálamo foi retirado e processado em tampão de solubilização de proteína a 4°C [1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM fosfato de sódio, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM EDTA, 10 mM ortovanadato de sódio, 2.0 mM PMSF e 0.1 mg aprotinina/ml] com *Polytron PTA 20S generator* (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA). O material insolúvel foi removido com 40 minutos de centrifugação a 11.000 rpm a 4°C. A concentração de proteínas do sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford e alíquotas contendo 0.2 mg de proteína foram separadas por gel SDS-PAGE, transferidas e para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo primário. As bandas foram detectadas por quimioluminescência e analisadas pelo *Syngene GBox* (Imgen Technologies, Alexandria, VA, USA).

*Análise estatística.* Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Quando comparados dois grupos, foi utilizado teste t de *Student* para dados não pareados. Quando necessário foi utilizado análise de variância (ANOVA), seguido de teste *post-hoc* de Tukey para comparação múltipla de médias. Foi adotado o nível de significância  $P < 0,05$ .