



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba**

Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas –
Sociedade Brasileira de Fisiologia.

FABIANO SILBERSCHMIDT MAIA

**Efeitos a longo-prazo do tratamento neonatal com
glutamato-monossódico no dimorfismo sexual esquelético
e secreção de leptina e corticosterona**

ARAÇATUBA-SP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas –
Sociedade Brasileira de Fisiologia.

FABIANO SILBERSCHMIDT MAIA

**Efeitos a longo-prazo do tratamento neonatal com
glutamato-monossódico no dimorfismo sexual esquelético
e secreção de leptina e corticosterona em ratos**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de "Mestre em Ciências Fisiológicas".

Orientador: Prof. Tit. Dr. João Cesar Bedran de Castro – FOA/UNESP

Coorientador: Prof. Tit. Dr. José Antunes-Rodrigues – FMRP/USP

ARAÇATUBA-SP
2012

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Maia, Fabiano Silberschmidt.

M217e Efeitos a longo-prazo do tratamento neonatal com glutamato monossódico no dimorfismo sexual esquelético e secreção de leptina e corticosterona / Fabiano Silberschmidt

Maia. -Araçatuba : [s.n.], 2012

69 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: João Cesar Bedran de Castro

Coorientador: José Antunes Rodrigues

1. Osso e ossos 2. Caracteres sexuais 3. Glutamato de sódio
4. Leptina 5. Corticosterona

CDD 612

Dedico esta dissertação especialmente a Deus que me iluminou, me deu tranquilidade e muita paciência para que pudesse fazer tudo o que me comprometi permitindo-me desta forma obter resultados os quais utilizarei para uma publicação de importância para nossa área de pesquisa.

Dedico a minha família pelo apoio que me dá para que eu continue a estudar, minha mãe Raquel Silberschmidt, meu irmão Kleber Rodrigo Silberschmidt Maia e meu padastro João Batista Pereira.

Dedico também a amigos da pós-graduação a Doutoranda Rita de Cássia Alves Nunes e mestrandas Talita de Melo e Silva, Simone Regina Potje, Lígia Arnedo Perassa e Ariana Aparecida Ferreira Pereira, Leandro Figueiredo dos Santos, Monique Patricio Singulani que quando puderam também estiveram me auxiliando na realização do projeto e na interpretação dos dados. Agradeço aos demais pós-graduandos Camila Tami Stringhetti Garcia, Ângela Cristina de Nicola, que foram como os demais citados grandes amigos conquistados neste período da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos são feitos as pessoas que dediquei este trabalho reiterando a importância de cada um para que eu chegasse até aqui inclusive a Deus por permitir-me estar aqui para defender e obter meu título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Reafirmo o agradecimento a minha família por ser tão compreensiva e especial em minha vida.

Agradeço também a equipe do Laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, bem como ao meu co-orientador Prof. Emérito José-Antunes Rodrigues por ceder o espaço no laboratório, seu tempo e também auxílio financeiro para que o trabalho fosse concluído.

Agradeço também ao Prof. Ass. Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada por ceder seu tempo e seu laboratório para análises biomecânicas ósseas, a Prof^a Ass. Dr^a Ana Cláudia Stevanato Nakamune por fazer parte da minha banca de qualificação e por ceder seu laboratório para uso durante os experimentos bioquímicos, a Prof^a Adj. Rita de Cássia Menegatti Dornelles por ceder parte dos kits necessários para análises bioquímicas.

Este trabalho recebeu auxílio financeiro da CAPES através da
concessão de bolsa de estudos

“Não é digno de saborear o mel, aquele que se afasta da colmeia com medo das picadas das abelhas”

(DESCONHECIDO)

SILBERSCHMIDT-MAIA, F. Efeitos a longo-prazo do tratamento neonatal com glutamato monossódico no dimorfismo sexual e secreção de leptina e corticosterona. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Departamento de Ciências Básicas, Laboratório de Fisiologia – Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas – SBFis, Araçatuba, 2012.

RESUMO

Este estudo investigou os efeitos da lesão hipotalâmica induzida por glutamato monossódico (MSG) na programação do dimorfismo sexual em parâmetros somatométricos e propriedades biofísicas do osso durante a fase pré-pubere, púbere e adulto jovem. Além disto, nós avaliamos se a alteração hipotalâmica induzida por este modelo pode influenciar nos níveis séricos de leptina e corticosterona nestes animais. A lesão com MSG foi realizada por injeção subcutânea de glutamato monossódico (dose de 4 mg/g de peso corporal, Sigma, St. Louis, MO) em ratos neonatos no 2º, 4º, 6º, 8º e 10º dia de vida. Os grupos controle foram tratados da mesma forma utilizando solução salina 0,9%. Os ratos foram submetidos a eutanásia aos 20, 40, 80, 120 e 150 dias de vida. O peso corporal foi mensurado aos 20, 40, 80, 120 e 150 dias de vida e amostras sanguíneas e fêmures foram coletados. O comprimento femural e a geometria crosseccional da diáfise femural foram medidos e a densidade mineral óssea areal (DMOa) foi determinada por densitômetro de dupla emissão de raio-X (DXA). O teste biomecânico de ensaio de flexão de três pontos foi utilizado para avaliar força máxima, rigidez óssea e tenacidade. Amostras sanguíneas foram submetidas a ensaios bioquímicos para estimar os níveis de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, leptina e corticosterona no plasma. Ganho de peso, DMOa e propriedades biomecânicas aumentam rapidamente com relação a idade de todos os grupos. Nos animais controle o dimorfismo sexual esquelético, concentração de leptina e padrões de dimorfismo sexual de corticosterona foram evidentes após a puberdade. No entanto, nós demonstramos que a destruição de neurônios sensíveis ao MSG pode eliminar a diferença sexual no desenvolvimento esquelético, visto que machos-MSG apresentaram a mesma mudança que fêmeas-MSG. Uma melhor compreensão de como estes distúrbios induzidos por MSG no período crítico da vida, onde há

mudanças no desenvolvimento do organismo, será essencial para designar terapias neuroendócrinas em distúrbios neuromusculares.

Palavras-chave: Dimorfismo Sexual. Glutamato Monossódico. Osso. Leptina. Corticosterona.

SILBERSCHMIDT-MAIA, F. Long-term effects of neonatal monosodium glutamate treatment on sexual dimorphism in bone development, leptin and corticosterone secretion. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Departamento de Ciências Básicas, Laboratório de Fisiologia – Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas – SBFis, Araçatuba, 2011.

ABSTRACT

This study investigated the effects of neonatal MSG-induced hypothalamic lesions on the programming of sexual dimorphism in somatometric parameters and the biophysical properties of bone during childhood, puberty, and adulthood. Furthermore, we evaluated whether hypothalamic changes induced by this model may influence leptin and corticosterone serum concentrations in these animals. MSG-lesion was performed by daily subcutaneous injections of monosodium glutamate (at a dose of 4 mg/g of body weight, Sigma, St. Louis, MO) to newborn rats at 2nd, 4th, 6th, 8th and 10th day of life. The control groups were treated in the same manner with saline solution 0,9%. Rats were euthanized at 20, 40, 80, 120 or 150 postnatal days. Body weight was also measured at 20, 40, 80, 120 and 150 days of age, and blood samples and femurs were collected. The femur length and femoral diaphyseal cross-sectional geometry were measured and the areal bone mineral density (areal BMD) was determined by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). Biomechanical three-point bending testing was used to evaluate bone breaking strength, energy to fracture, and extrinsic stiffness. Blood samples were submitted to a biochemical assay to estimate calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, leptin, and corticosterone levels. Weight gain, areal BMD and bone biomechanical properties increased rapidly with respect to age in all groups. In control animals, skeletal sexual dimorphism, leptin concentration, and dimorphic corticosterone concentration patterns were evident after puberty. However, we demonstrated that destruction of MSG-sensitive neurons during the critical period of sexual differentiation of the brain causes a long-lasting modification in biophysical bone properties and serum leptin and corticosterone concentrations. This suggested that neonatal MSG treatment could eliminate the sex-dependent difference in skeletal development, since we found changes in males to the same extent as in females. A

better understanding of how these MSG-induced disturbances in a critical period earlier in life change the organism's development, will be essential for designing neuroendocrine-based therapy in neuroskeletal imbalance.

Keyword: Sexual Dimorphism. Monosodium Glutamate. Bone. Leptin. Corticosterone.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Modelo de Curva Força-Deslocamento (modificado de Turner e Burr, 1993) | 27 |
| Figura 2 | Área Crosseccional Diafisária Femural | 28 |
| Figura 3 | Representação esquemática das áreas corticais e femurais | 45 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|-----------|--|----|
| Gráfico 1 | Desenvolvimento do peso corporal nas diferentes fases | 34 |
| Gráfico 2 | Desenvolvimento do conteúdo mineral ósseo em diferentes fases | 37 |
| Gráfico 3 | Desenvolvimento da área total óssea em diferentes fases | 38 |
| Gráfico 4 | Desenvolvimento da densidade mineral óssea em diferentes fases | 39 |
| Gráfico 5 | Dados de força máxima nas diferentes fases da vida | 41 |
| Gráfico 6 | Dados da rigidez óssea em diferentes fases da vida | 42 |
| Gráfico 7 | Dados de tenacidade em diferentes fases da vida | 43 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Comprimento femural e área femural diafisária crosseccional | 35 |
| Tabela 2 | Radioimunoensaio e análises bioquímicas | 48 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AFP: α -fetoproteína

AR: androgen receptor (receptor androgênico)

ARKO: androgen receptor alpha-knockout

ACE: área cortical da elipse

AME: área medular da elipse

ATE: área total da elipse

ATO: área total óssea

CEEA: Comitê de Ética na Experimentação Animal

CMO: conteúdo mineral ósseo

DXA: densitômetro de dupla emissão de raios-X

DMOa: densidade mineral óssea areal

DS = dimorfismo sexual

EPM: erro padrão da média

ER: *estrogen receptor* (receptor de estrógenos)

ER α : estrogen receptor alfa (receptor de estrógeno tipo alfa)

ER β : estrogen receptor beta (receptor de estrógeno tipo beta)

ER α KO = estrogen receptor alpha-knockout

ER β KO = estrogen receptor beta-knockout

FAT: fosfatase alcalina total

GH: *growth hormone* (Hormônio do crescimento)

GHRH: *growth hormone-releasing hormone* (Hormônio liberador do hormônio do crescimento)

HPA = *hypothalamus-pituitary-adrenal* (Hipotálamo-Hipófise-Adrenais)

HPG = *hypothalamus-pituitary-gonadal* (Hipotálamo-Hipófise-Gônadas)

IGF-1: *insulin-like growth factor – 1* (fator de crescimento semelhante a insulina)

MSG: glutamato monossódico

Narq: núcleo arqueado

NPV: núcleo paraventricular

SNS: sistema nervoso simpático

SND-POA: *sexually dimorphic nucleus of the preoptic area* (núcleo sexualmente dimórfico da área pré-óptica medial)

SM: síndrome metabólica

SUMÁRIO

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Introdução | 18 |
| 1.1 | Modelo de Indução de Obesidade por Lesão Hipotalâmica com Glutamato Monossódico | 18 |
| 1.2 | Incidência de Fraturas Associadas a Obesidade | 19 |
| 1.3 | Diferenciação Sexual Cerebral | 19 |
| 1.4 | Importância dos Esteróides Sexuais e sua Interação com Corticosterona e Leptina | 21 |
| 2 | Objetivos | 23 |
| 3 | Material e Métodos | 24 |
| 3.1 | Animais | 24 |
| 3.2 | Modelo de Indução de Obesidade por Glutamato Monossódico | 24 |
| 3.3 | Protocolo Experimental | 24 |
| 3.4 | Parâmetros Avaliados | 25 |
| 3.4.1 | Biometria | 25 |
| 3.4.1.1 | Massa Corporal | 25 |
| 3.4.1.2 | Medida do Comprimento Femural | 25 |
| 3.4.2 | Parâmetros Biofísicos | 25 |
| 3.4.2.1 | Densidade Óssea Mineral Areal | 26 |
| 3.4.2.2 | Ensaio Mecânico | 26 |
| 3.4.2.3 | Área Diafisária Femural Crossecional | 27 |
| 3.4.3 | Parâmetros Bioquímicos | 29 |
| 3.4.3.1 | Cálcio (mg/dL) | 29 |
| 3.4.3.2 | Fósforo Plasmático (mg/dL) | 29 |
| 3.4.3.3 | Fosfatase Alcalina (U/L) | 30 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.4.4 | Radioimunoensaio | 30 |
| 3.4.4.1 | Leptina (ng/dL) | 30 |
| 3.4.4.2 | Corticosterona (ng/dL) | 30 |
| 4 | Análises Estatísticas | 32 |
| 5 | Resultados | 33 |
| 5.1 | Parâmetros Biométricos | 33 |
| 5.1.1 | Massa Corporal | 33 |
| 5.1.2 | Comprimento Ósseo | 34 |
| 5.2 | Parâmetros Biofísicos | 36 |
| 5.2.1 | Densidade Mineral Óssea Areal | 36 |
| 5.2.2 | Ensaio Mecânico | 40 |
| 5.2.3 | Área Crosseccional Diafisária Femural | 44 |
| 5.3 | Parâmetros Bioquímicos | 46 |
| 5.3.1 | Cálcio | 46 |
| 5.3.2 | Fósforo | 46 |
| 5.3.3 | Fosfatase Alcalina Total | 46 |
| 5.4 | Radioimunoensaio | 47 |
| 5.4.1 | Leptina | 47 |
| 5.4.2 | Corticosterona | 47 |
| 6 | Discussão | 49 |
| 6.1 | Comparação dos ratos machos e fêmeas submetidos ao tratamento neonatal com MSG | 49 |
| 6.2 | Modulação hormonal sobre o desenvolvimento dos parâmetros somatométricos | 53 |
| 6.3 | Alterações no dimorfismo sexual esquelético e secreção hormonal dos ratos tratados com MSG | 55 |
| 7 | Conclusão | 57 |
| 8 | Referências | 58 |
| 9 | Anexo | 68 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Modelo de indução de obesidade por lesão hipotalâmica com glutamato monossódico

A obesidade no mundo tem aumentado drasticamente desde 1980. Estima-se que em 2008 mais de 1,5 bilhões de adultos acima dos 20 anos apresentam sobrepeso, onde 200 milhões de homens e 300 milhões de mulheres já são obesos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). No Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (BRASIL, 2003), a taxa de prevalência de excesso de peso em adultos é de 40,2% da população, sendo 40,8% destes em homens e 39,4% em mulheres. Não obstante, há um alarmante aumento da obesidade entre crianças (ROCCHINI, 2002), e sua prevalência dobrou nas duas últimas décadas em muitos países sendo considerado problema mundial de Saúde Pública (LOBSTEIN et al., 2004; ONIS BLOSSNER, 2000). A obesidade por si predispõe crianças e adultos a inúmeros problemas como aumento do risco de doenças cardiovasculares, diabetes e hipertensão (FREEDMAN et al., 1999). Saffari et al. (2012) relataram em seus estudos com crianças obesas ou em sobrepeso, que 80% destas apresentaram associação de várias anormalidades como resistência a insulina, hiperglicemia, aumento de triglicerídeos, hipertensão, aumento da circunferência abdominal. A associação destas anormalidades foi descrita por Salazar (2011) como Síndrome Metabólica (SM). Weiss et al, (2004) realizaram estudo com 439 crianças e adolescentes obesos e constataram que a SM está diretamente relacionada com a obesidade. Em modelos experimentais, a obesidade pode ser induzida em animais por alterações genéticas, neuroendócrinas ou por dieta (York, 1996). Alterações neuroendócrinas que promovam obesidade podem ser causadas pelo uso de glutamato monossódico (MSG) (OLNEY; SHARPE, 1969; OLNEY et al., 1971; TANAKA, et al., 1978). Embora o glutamato seja classicamente utilizado como indutor de obesidade à décadas, as propriedades ósseas no modelo obesidade-MSG durante a fase inicial de desenvolvimento em modelos experimentais ainda não está bem esclarecida. O MSG é um sal de ácido glutâmico produzido naturalmente em muitos alimentos e utilizado como intensificador de sabor (FLEGAL et al., 2002; ZEMEL, 2004), pode ser produzido comercialmente através do melaço,

cana de açúcar e fermentação do açúcar da beterraba (FOOD STANDARDS AUSTRÁLIA NEW ZEALAND, 2003; WALKER; LUPIEN, 2000). Em 1969, Olney foi o primeiro pesquisador a descrever o MSG como uma neurotoxina que produz lesões nos corpos celulares do núcleo arqueado do hipotálamo, quando administrado em animais como ratos. Esta lesão neuronal por MSG neonatal é devido a barreira hemato-encefálica dos animais estar imatura (LARSEN et al., 1994). Gao et al., (1994) demonstraram o efeito neurotóxico transplacentário do MSG lesionado o núcleo arqueado (Narq) e hipotalâmico ventro-medial. Olney (1969) também observou retardo de crescimento ósseo e esterilidade em fêmeas associado a obesidade no modelo-MSG.

1.2 Incidência de fraturas associadas a obesidade

Lazar-Antman e Leet (2012), em seu trabalho citam que crianças e adolescentes obesos apresentam maior risco de fraturas. Chevalley et al. (2011) demonstraram em crianças e adolescentes que a idade média de fraturas ocorre aos 15.2 anos e está relacionada a fraturas femurais e tibiais. Quanto ao fêmur observaram uma relação de fraturas com baixa densidade óssea no colo femural, enquanto na tíbia observaram diminuição do trabeculado com menor rigidez e carga de ruptura. Baldwin et al. (2011) por sua vez, observaram que pacientes obesos com fraturas em ossos longos do membro pélvico apresentavam maior tempo de recuperação com maiores custos na reabilitação quando comparados com pacientes em mesma condição, porém não obesos. Co-morbidades foram associadas em maior quantidade quando os obesos apresentavam fratura diafisária de fêmur em relação a fraturas tibiais. Estes dados nos remetem a importância de análises biomecânicas ósseas em modelo experimental de indução de obesidade buscando determinar o risco de fratura associado a obesidade.

1.3 Diferenciação sexual cerebral

Ahmed (1991), demonstrou que a área preóptica medial (POA) possui diferenças morfológicas neuronais intersexuais, evidenciando que este grupamento é de 3 a 7 vezes maior nos machos e que a manipulação hormonal pode reverter

estas diferenças. Desta forma, eles determinaram esta região como núcleo do dimorfismo sexual da POA (SND-POA). A importância de androgênios sexuais já fora proposta por Phoenix et al. (1959) que demonstraram efeitos organizacionais/ativacionais promovidos por estes no desenvolvimento e diferenciação cerebral de mamíferos na fase perinatal. Desta forma, McCarty (2004) descreve que a hipótese organizacional/ativacional é um conceito que descreve a ação hormonal sexual exercendo no início da vida efeitos organizacionais, modulando a arquitetura neuronal que então é ativada na fase adulta (efeito ativacional). Barraclough e Gorski (1961) avaliaram o efeito do dimorfismo sexual na fisiologia reprodutiva e comportamental. Estes autores, seguindo a hipótese organizacional/ativacional, alegaram que o cérebro de mamíferos se diferencia de acordo com o hormônio ao qual ele é exposto em períodos críticos do desenvolvimento, fase determinada entre 19^o dia de gestação até o 7^o dia pós-parto. O desenvolvimento feminino ocorre sem necessidade de exposição a nenhum hormônio, visto que ratas não secretam quantidades importantes de estrógeno até o sétimo dia de vida e o estrógeno obtido passivamente pelas gônadas e placenta materna ligam-se com alta afinidade a α -fetoproteína (AFP), uma glicoproteína produzida em grande quantidade pelo fígado dos fetos, e que indisponibiliza grande parte do hormônio para sua ação cerebral. No entanto, em ratos machos a testosterona secretada pela células de Leydig não possui afinidade por esta proteína, atravessando a membrana plasmática neuronal. No SND-POA há altas concentrações de aromatase convertendo a testosterona em estradiol podendo então masculinizar e defeminizar os substratos neuronais, caracterizando assim, a masculinização comportamental. (BARRACLOUGH; GORSKI, 1961). McEwen et al. (1975), confirmam a importância desta proteína na diferenciação cerebral. Gorski et al., (1991) demonstraram que a diferenciação influencia outras regiões neuronais hipotalâmicas afetando os mecanismos homeostáticos. Diferenças na concentração de neurotransmissores como dopamina, noradrenalina, serotonina bem como na expressão de seus receptores hipotalâmicos e amigdalóides demonstraram o efeito direto dos andrógenos no desenvolvimento organizacional realizado por neurotransmissores (ORENSANZ et al., 1982; SIDDIQUI; GUILMORE, 1988; VACCARI, 1980). Estas diferenças são importantes pois a resposta hormonal depende da sensibilidade e responsividade de um mesmo hormônio numa determinada concentração; sua resposta portanto, varia entre diferentes tecidos na

dependência da maquinaria celular bem como da expressão de seus receptores (CARVALHO, 2009) o que explica a diferença no desenvolvimento de diferentes núcleos hipotalâmicos expostos a um mesmo hormônio.

1.4 Importância dos hormônios no desenvolvimento ósseo

Durante toda a vida, o tecido ósseo está em contínuo processo de formação e reabsorção, processo denominado remodelação óssea e que ocorre através da atividade de osteoblastos e osteoclastos respectivamente e são modulados principalmente por ação hormonal (FROST et al., 1969; MOSLEY, 2000). O tecido ósseo tem a capacidade de adaptar a sua composição material e estrutural conforme os estímulos aos quais é submetido (SEEMAN, 1997).

Becú-Villalobos et al. (1997) em linhas gerais, demonstraram que a regulação e secreção de gonadotrofinas difere entre os sexos, influenciando desta forma diferentemente o crescimento do animal bem como o desenvolvimento da massa óssea. Portanto, os hormônios sexuais também são considerados como os principais mediadores no dimorfismo sexual esquelético. Embasando-se em mais detalhes, Callewaert et al. (2010a) e Vanderschueren et al. (2004) descreveram que a ação dos esteróides sexuais no tecido ósseo é complexa, principalmente em machos, já que a testosterona ativaria não somente receptores de andrógenos (AR), mas após serem aromatizados em 17β -estradiol, ativariam receptores de estrógenos (ER α e/ou ER β). A presença de AR e ER α são fundamentais para o desenvolvimento cortical. Em outro estudo também utilizando camundongos knockout, Callewaert et al. (2009) demonstraram uma redução na massa óssea cortical em camundongos AR-ER α KO quando comparados a camundongos knockout para apenas receptores AR ou ER α . A importância desta aromatização androgênica na formação cortical é observada em humanos, onde adolescentes com deficiência na expressão da aromatase apresentam redução da espessura cortical (BOUILLON et al., 2004). Miskowiak et al. (1993) já haviam demonstrado em modelo obesidade-MSG, que ratos machos tem diminuição de testosterona. Em 1999 novo estudo de Miskowiak et al. demonstraram também que em fêmeas há diminuição de estrógeno em modelo MSG. Desta forma é importante o estudo longitudinal do desenvolvimento esquelético em ratos de ambos os sexos com o uso de glutamato monossódico neonatal.

Não obstante, os hormônios sexuais influenciam outros inúmeros hormônios. Como por exemplo, hormônios sexuais masculinos e femininos possuem efeitos ativacionais sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) durante a idade adulta, atuando diretamente nas adrenais (PANAGIOTAROPOULOS et al., 2004; PINILLA et al., 1999; VIAU, 2002). Por sua vez, o eixo HPA pode inibir a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadas (HPG) em nível hipotalâmico. Por outro lado, na fase adulta a leptina modula o eixo HPA (HEIMAN et al., 1997), influenciando a função reprodutiva durante toda a vida do indivíduo via hipotálamo e hipófise (YU et al., 1997). Porém existem poucos estudos investigando os efeitos organizacionais dos esteróides sexuais sobre o eixo HPA e secreção de leptina em modelo de lesão hipotalâmica.

2 OBJETIVOS

Portanto, este estudo foi realizado para avaliar os efeitos a longo prazo da administração neonatal de glutamato monossódico sobre o dimorfismo sexual esquelético, bem como secreção de leptina, corticosterona, e análise da biomecânica óssea em animais pré-púberes, púberes e adulto-jovens.

O objetivo parte da hipótese de que a lesão neonatal do núcleo arqueado interfere irreversivelmente nas funções hipotalâmicas primordiais para atividade organizacional/ativacional do dimorfismo sexual em vista de sua interferência sobre hormônios bem como sobre catecolaminas na fase neonatal que é primordial para diferenciação sexual.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*) neonatos, cedidos pelo Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - FOA-UNESP. Os mesmos foram mantidos em temperatura $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo de luz 12h/12h, e, após o desmame realizado aos trinta (30) dias, foram separados por sexo e alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da UNESP-Araçatuba (Protocolo 2010-01268).

3.2 Modelo de indução de obesidade por Glutamato Monossódico

Todos os grupos tratados-MSG (machos e fêmeas) receberam uma dose de 4 mg/g de peso corporal no 2º, 4º, 6º, 8º e 10º dia de vida. A droga administrada foi ácido-L-glutâmico (Sigma®) na concentração de 20% ou 200 mg/ml. Os grupos controle de machos e fêmeas receberam solução de cloreto de sódio a 0,9% em volume calculado seguindo o padrão de volume final dos respectivos grupos tratados.

3.3 Protocolo Experimental

As ninhadas foram separadas por sexo logo após o nascimento em quatro grupos experimentais (n = 6-8 por grupo):

- a. Fêmeas controle;
- b. Fêmeas-MSG;
- c. Machos controle;
- d. Machos-MSG.

Os animais foram pesados aos 20, 40, 80, 120 e 150 dias e submetidos a anestesia dissociativa (cloridrato de ketamina – 0,01mL/g de peso corporal e cloridrato de xilazina - 0,05mL/100g de peso corporal) para exposição e canulação da jugular externa de acordo com técnica descrita por Harms e Ojeda (1974). Vinte e quatro horas após o procedimento, os animais completaram 20, 40, 80, 120 e 150

dias de vida, foram pesados, seus respectivos sangues coletados as 14h00minh em tubos de ensaio heparinizado para centrifugação a 2500 rpm por 15 minutos e 2°C em Centrífuga (Beckman – modelo J-6M, USA) para extração de plasma. Este foi acondicionado em duas alíquotas de 1ml e mantido em temperatura -20° C.

Após as coletas sanguíneas os grupos foram submetidos à eutanásia por dose excessiva de 55 mg/kg de anestésico geral tiopental sódico (Tiopentax – Cristalia® - SP-Brasil) para indução de plano anestésico profundo capaz de promover parada cardiorrespiratória irreversível. Os fêmures direitos foram imediatamente desarticulados, dissecados e armazenados em tubos criogênicos contendo solução fisiológica (NaCl 0.9%) conservados a -20°C até o momento das análises.

3.4 Parâmetros Avaliados

3.4.1 Biometria

3.4.1.1 Massa Corporal

Durante o período de estudo, os animais foram pesados semanalmente para o acompanhamento da evolução da massa corporal, bem como da saúde e crescimento dos mesmos; os dados de peso avaliados foram os que representam as idades estudadas.

3.4.1.2 Medida do comprimento femural

As medidas foram realizadas com ajuda de um paquímetro (precisão de 0,05mm) tomando como referência para o comprimento a distância entre a *pars cranialis* do *trochanter major* e o *condylus medialis*.

3.4.2 Parâmetros Biofísicos

Aproximadamente doze horas antes do início dos processos de preparação para realização dos ensaios biofísicos, os fêmures foram retirados da temperatura

de -20°C e mantidos refrigerados por duas horas (2 a 5° C). Após refrigeração, foram mantidos em temperatura ambiente para análises.

3.4.2.1 Densidade mineral óssea areal

A massa óssea foi analisada pelo método de densitometria mineral óssea areal (DMOa) (BIERING-SORENSEN et. al., 1988; DEMIREL et. al., 1998), obtida por meio de um densitômetro de dupla emissão de raios-X (DXA), modelo Lunar DPX Alpha (Madison – USA), com software especial para pequenos animais, pertencente ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP. Foram determinados o conteúdo mineral ósseo em gramas (g) - CMO, área óssea total (cm²) - ATO e densidade mineral óssea areal (g/cm²) – DMOa, dos fêmures direito dos animais.

3.4.2.2 Ensaio Mecânico

Após a realização do DXA, os fêmures foram submetidos ao ensaio mecânico, utilizando máquina universal de ensaio, modelo EMIC[®] - DL 3000 (São José dos Pinhais – Brasil), pertencente ao Departamento de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Unesp. A distância de vão de apoio foi de 20 mm e a célula de carga utilizada de 2000 N com carga aplicada à velocidade de 5 mm/min até o momento de fratura do osso. Os ossos dos animais de 20 dias possuíam menor comprimento que 20 mm e foram apoiados pela suas respectivas diáfises. A força aplicada e o deslocamento do travessão da máquina foram monitorados e registrados através de um software próprio do equipamento. A partir destes dados foram obtidas as curvas força-deslocamento para os diversos ensaios e determinados os parâmetros biomecânicos demonstrados na Figura 3.

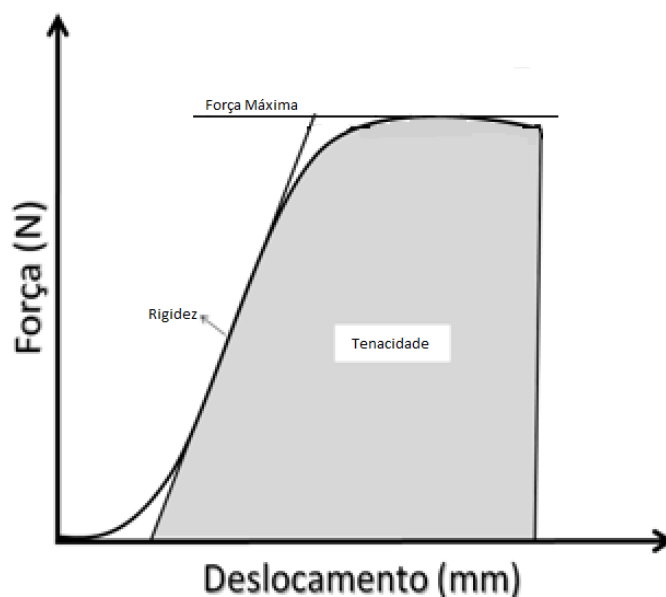


FIGURA 1 – Modelo de Curva Força-Deslocamento (modificado de Turner e Burr, 1993).

Onde de acordo com Turner e Burr (1993):

Força Máxima (N): Evidencia à maior força aplicada durante o ensaio, seguido da fratura do osso.

Rigidez (N/mm): Determinada através da inclinação da reta ajustada aos pontos da curva força-deformação na fase elástica.

Tenacidade (N.mm): Corresponde a área sob a curva força-deformação até o ponto de ruptura óssea, obtida através de integração numérica.

3.4.2.3 Área Diafisária Femural Crosseccional

Para calcular a área cortical e medular, foi necessário calcular os diâmetros diafisários externo e interno tanto ântero-posterior, quanto médio-lateral. Para o cálculo destes respectivos diâmetros, procedeu-se o corte da área diafisária média dos ossos direitos utilizando disco de carborundun acoplado a motor de baixa rotação. O fragmento obtido foi visualizado colocando-o sobre uma lâmina em microscópio estereoscópico Stemi 2000-C (Zeiss®) no aumento de 24 vezes

acoplado a uma câmara digital AxioCam MRc5 (Zeiss®). As imagens foram transferidas e analisadas no programa AxioVision Rel. 4.5 (Zeiss®). Os diâmetros foram mensurados conforme ilustração da figura 1. Após o cálculo dos diâmetros procedeu-se o cálculo de área, conforme explicado abaixo.

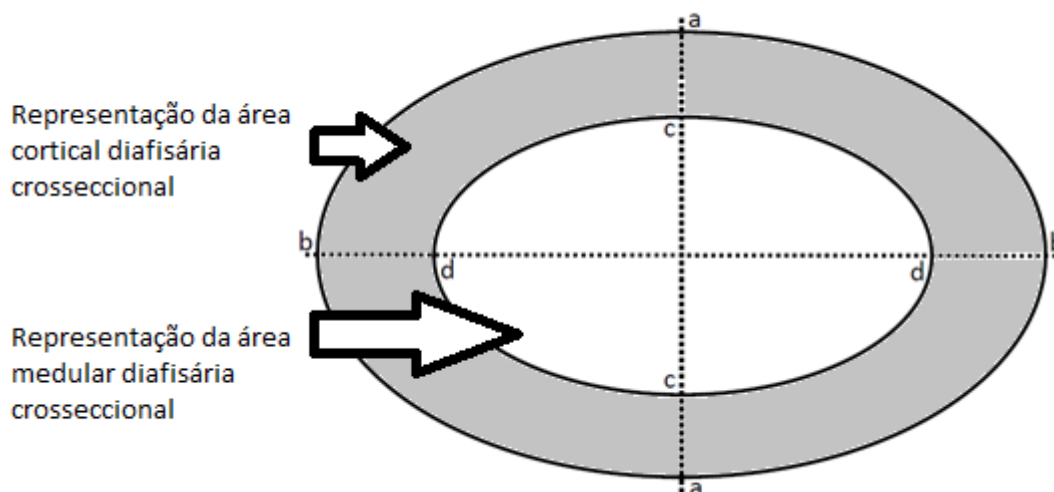


FIGURA 2. A figura mostra um esquema representando o corte diafisário femoral para obtenção das mensurações dos diâmetros ósseos externos (a e b) e internos (c e d) bem como a área crosseccional diafisária femoral cortical (em tom de cinza) e medular (em branco): a, diâmetro externo anteroposterior; b, diâmetro externo mediolateral; c, diâmetro interno anteroposterior; d, diâmetro interno mediolateral.

$$\text{Área total da elipse (ATE)} = \pi \times a' \times b'$$

Onde temos:

$$a' = \text{Diâmetro externo antero-posterior}/2 \text{ ou } [\text{Dex}_{a'}/2]$$

$$b' = \text{Diâmetro externo médio-lateral}/2 \text{ ou } [\text{Dex}_{b'}/2]$$

Ou seja:

$$\text{ATE} = \pi \times ([\text{Dex}_{a'}/2] \times [\text{Dex}_{b'}/2])$$

Área medular da elipse (AME) = $\pi \times c' \times d'$

Onde temos:

c' = Diâmetro interno ântero-posterior/2 ou $[Din_{c'}/2]$

d' = Diâmetro interno médio-lateral/2 ou $[Din_{d'}/2]$

Portanto temos:

$AME = \pi \times ([Din_{c'}/2] \times [Din_{d'}/2])$

A Área cortical da elipse (ACE) por sua vez, representa a diferença entre ATE e AME. Desta forma:

$ACE = ATE - AME$

Os dados de área utilizados foram ACE e AME, ou seja, área cortical e área medular respectivamente.

3.4.3 Parâmetros Bioquímicos

Foram realizadas análises bioquímicas para verificação da atividade celular do metabolismo ósseo.

3.4.3.1 Cálcio (mg/dL)

As determinações de cálcio plasmático foram realizadas através de método espectrofotométrico (Kit marca Labtest cat. 90). O cálcio reage com a púrpura de ftaleína em meio alcalino, formando um complexo de cor violeta. A absorbância foi determinada em 570 nm com limite de detecção fotométrica de 0,06 mg/dL correspondendo a uma absorbância de 0,001.

3.4.3.2 Fósforo Plasmático (mg/dL)

As determinações de fósforo foram realizadas através do método espectrofotométrico de Daly e Ertingshausen (1972) modificado (kit marca Labtest cat. 12). O fósforo inorgânico reage com o molibdato de amônio na presença de ácido sulfúrico, resultando na formação de um complexo fosfomolibdato não reduzido, que será determinado em 340 nm com limite de detecção fotométrica de 0,02 mg/dL correspondendo a uma absorbância de 0,001.

3.4.3.3 Fosfatase alcalina (U/L)

A fosfatase alcalina foi determinada por método de Roy (1970) modificado (Kit da marca Labtest Cat. 40), através de reação de ponto final, utilizando como substrato timolftaleína monofosfato com sensibilidade no ensaio de 2,4 U/L.

3.4.4 Radioimunoensaios

3.4.4.1 Leptina (ng/dL)

A concentração de leptina no plasma foi determinada através do método de radioimunoensaio, sendo utilizado o Rat leptin RIA kit 250 tubes (Cat. # RL-83K – MILLIPORE - USA). Foi utilizado iodo radioativo. O método baseia-se na competição, para a ligação com o anticorpo anti-leptina e leptina marcada radioativamente. A radioatividade no precipitado é determinada com o auxílio de um contador beta (LS 6500 – Beckman, Beckman Instrumento Inc., Fullerton, CA, USA) pertencente ao Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Os valores foram calculados utilizando-se uma curva padrão de leptina de ratos, sendo expressos em ng/dL.

3.4.4.2 Corticosterona (ug/dL)

A corticosterona plasmática foi determinada pelo método de Vecsei (1979), que utiliza extração do esteróide com etanol. Utiliza-se um anticorpo anti-corticosterona (Ab-cort-17984), preparado em coelhos, com o hormônio conjugado à albumina bovina. A corticosterona [1,2-3(H)] (Nem England Nuclear) é utilizada como hormônio marcado. Na separação das frações livre e ligada, utilizamos solução de

carvão-dextran 0,5/0,05%, respectivamente. A radioatividade (do iodo) no precipitado é determinada com o auxílio de um contador beta (LS 6500 – Beckman, Beckmann Instruments Inc., Fullerton, CA, USA) pertencente ao Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Os valores foram calculados utilizando-se uma curva padrão de corticosterona de ratos, sendo expressos em ug/dL.

4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Graph Pad Prism (versão 3.0) e expressas em médias \pm EPM para apresentação dos resultados. As comparações múltiplas dos resultados foram realizadas por análise de variância (one-way ANOVA test) seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de $P < 0,05$ para todas as comparações.

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros Biométricos

5.1.1 Massa corporal

O gráfico 1 representa as variações de peso ao longo das diferentes idades. Notamos que não há diferença aos 20 e 80 dias de vida. Aos 40 dias de vida os grupos-MSG apresentam menor peso do que os grupos controle. Aos 120 dias os machos-MSG apresentam maior peso do que todos os grupos e os machos controle apresentam maior peso corporal que ambos os grupos de fêmeas. Aos 150 dias o resultados dos 120 dias de vida se repetem e além disso as fêmeas tratadas apresentam maior peso corporal do que as fêmeas controle.

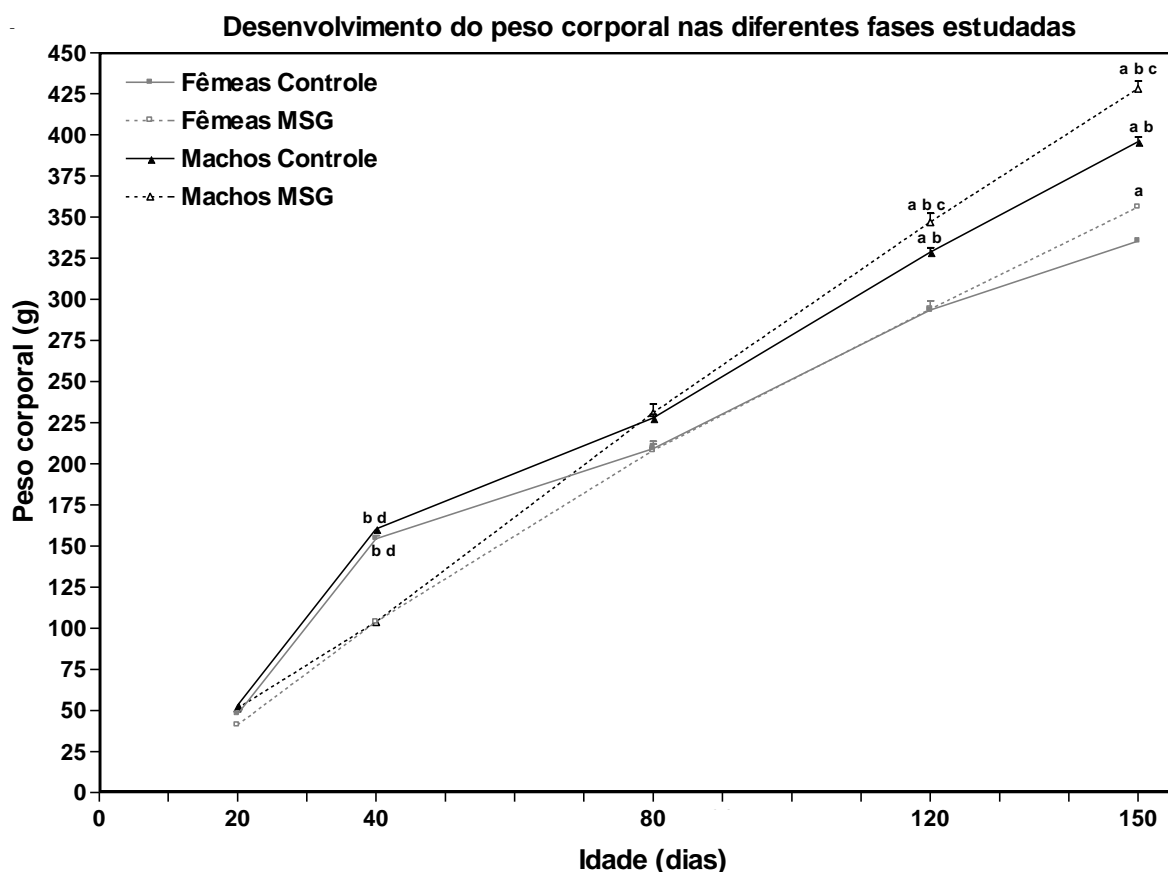


GRÁFICO 1. Evolução do peso corporal nos diferentes grupos estudados aos 20; 40; 80; 120 e 150 dias de vida. Os dados foram expressos como média \pm EPM e a comparação intergrupo foi analisada pelo teste one-way ANOVA seguido de pós-teste Tukey-Kramer, considerando $p < 0.05$ como significativo. Abreviações: a, $p < 0.05$ vs. fêmeas controle; b, $p < 0.05$ vs. fêmeas tratadas com MSG; c, $p < 0.05$ machos controle; d, $p < 0.05$ vs. machos tratados com MSG.

5.1.2 Comprimento ósseo

Quando avaliamos o comprimento femural representado na tabela 1, observamos que aos 20 dias de vida não há diferença no comprimento. Aos 40 dias as fêmeas tratadas-MSG apresentam fêmures mais curtos que machos controle. Aos 80 dias machos controle apresentam maior comprimento em relação a todos os grupos. Aos 120 e 150 dias o resultado se repete e as fêmeas controle apresentam maior comprimento ósseo em relação aos dois grupos tratados.

| Tabela 1 – Comprimento femural e Área Femural Diafisária Crossecional | | | | | |
|--|----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| Idade | Parâmetros | Grupos Experimentais | | | |
| | | Fêmeas Controle | Fêmeas tratadas com MSG | Machos Controle | Machos tratados com MSG |
| 20 dias de vida | Comprimento femural (mm) | 15.81±0.2187 | 14.83±0.9932 | 16.04±0.5039 | 15.30±0.3494 |
| | Área medular (mm ²) | 0.0027±0.0003 ^c | 0.0042±0.0005 ^c | 0.0150±0.0035 | 0.0021±0.0003 ^c |
| | Área cortical (mm ²) | 0.0472±0.0049 | 0.0489±0.0032 | 0.0558±0.0076 | 0.0347±0.0030 ^c |
| 40 dias de vida | Comprimento femural (mm) | 24.64±0.3945 | 23.46±0.5010 ^c | 25.41±0.1169 | 24.24±0.2859 |
| | Área medular (mm ²) | 0.0087±0.0012 | 0.0090±0.0016 | 0.0103±0.0015 | 0.0065±0.0020 ^c |
| | Área cortical (mm ²) | 0.0524±0.0073 | 0.0614±0.0073 | 0.0792±0.0058 | 0.0786±0.0087 |
| 80 dias de vida | Comprimento femural (mm) | 33.66±0.5343 ^c | 32.16±0.2562 ^c | 36.69±0.8279 | 31.56±0.3926 ^c |
| | Área medular (mm ²) | 0.0138±0.0022 ^{c d} | 0.0162±0.0019 ^{c d} | 0.0347±0.0024 | 0.0386±0.0037 |
| | Área cortical (mm ²) | 0.0804±0.0056 ^c | 0.0608±0.0040 ^{c d} | 0.1051±0.0057 | 0.0943±0.0074 |
| 120 dias de vida | Comprimento femural (mm) | 35.75±0.3687 ^c | 32.68±0.3251 ^{a c} | 38.84±0.5204 | 32.86±0.3765 ^{a c} |
| | Área medular (cm ²) | 0.0174±0.0029 | 0.0241±0.0045 | 0.0286±0.0037 | 0.0223±0.0022 |
| | Área cortical (cm ²) | 0.1052±0.0091 | 0.0834±0.0038 | 0.0944±0.0083 | 0.0848±0.0035 |
| 150 dias de vida | Comprimento femural (mm) | 36.25±0.7192 ^c | 33.06±0.4318 ^{a c} | 40.16±0.2966 | 33.46±0.4581 ^{a c} |
| | Área medular (mm ²) | 0.0259±0.0051 | 0.0132±0.0029 ^c | 0.0342±0.0035 | 0.0122±0.0019 ^c |
| | Área cortical (mm ²) | 0.1051±0.0055 ^c | 0.0699±0.0051 ^{a c} | 0.1317±0.0075 | 0.0847±0.0085 ^c |

Dados foram expressos como média ± EPM e a comparação intergrupo foi analisada pelo teste one-way ANOVA seguido de pós-teste Tukey-Kramer, considerando p<0.05 como significante. Abreviações: a, p<0.05 vs. fêmeas controle; b, p<0.05 vs. fêmeas tratadas com MSG; c, p<0.05 machos controle; d, p<0.05 vs. machos tratados com MSG.

5.2 Parâmetros Biofísicos

5.2.1 Densidade mineral óssea areal

Quando avaliamos a densidade mineral óssea areal, temos dois dados importantes, o conteúdo mineral ósseo e a área total óssea, pois a relação entre CMO/ATO representa a DMOa e mostra qual(is) fator(es) varia(m) influenciando a DMOa final. No gráfico 2 observamos que aos 20 e 40 dias de vida o CMO não apresenta diferença estatística significativa entre grupos. Aos 80 dias de vida o CMO de fêmeas tratadas é menor do que o CMO de machos tratados. Aos 120 dias de vida o CMO de machos tratados é menor do que todos os grupos. Por fim aos 150 dias de vida o CMO de ambos os grupos tratados é menor do que os grupos controle, além disto as fêmeas controle apresentam CMO menor do que os machos controle.

No gráfico 3 observamos que a ATO dos grupos de 20; 40 e 80 dias de vida não apresentam diferença estatística. Aos 120 dias de vida os machos controle apresentam mais ATO do que todos os grupos e por fim aos 150 dias de vida ambos os grupos tratados apresentam menor ATO do que os grupos controle, bem como o grupo controle de fêmeas apresenta menor ATO do que o grupo controle de machos.

No gráfico 4 notamos a DMOa de todos os grupos, onde não há diferença estatística aos 20 e 40 dias de vida. Aos 80 dias os machos controle apresentam maior DMOa em relação a ambos os grupos de fêmeas. Aos 120 dias os machos tratados apresentam menor DMOa em relação a todos os grupos e finalmente aos 150 dias de vida ambos grupos tratados apresentam menor DMOa que ambos os grupos controle.

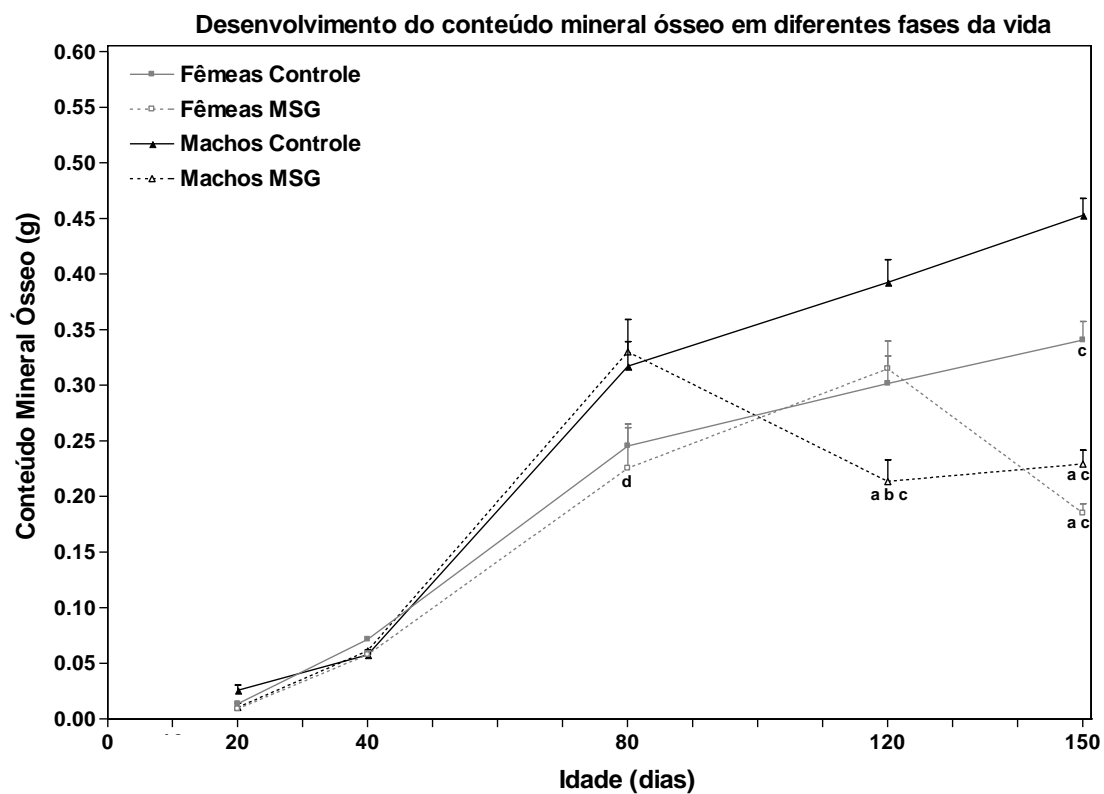


GRÁFICO 2. Análise do conteúdo mineral ósseo dos fêmures dos grupos de 20; 40; 80; 120 e 150 dias de vida. Os dados foram expressos como média \pm EPM e a comparação intergrupo foi analisada pelo teste one-way ANOVA seguido de pós-teste Tukey-Kramer, considerando $p < 0.05$ como significativo. Abreviações: a, $p < 0.05$ vs. fêmeas controle; b, $p < 0.05$ vs. fêmeas tratadas com MSG; c, $p < 0.05$ machos controle; d, $p < 0.05$ vs. machos tratados com MSG.

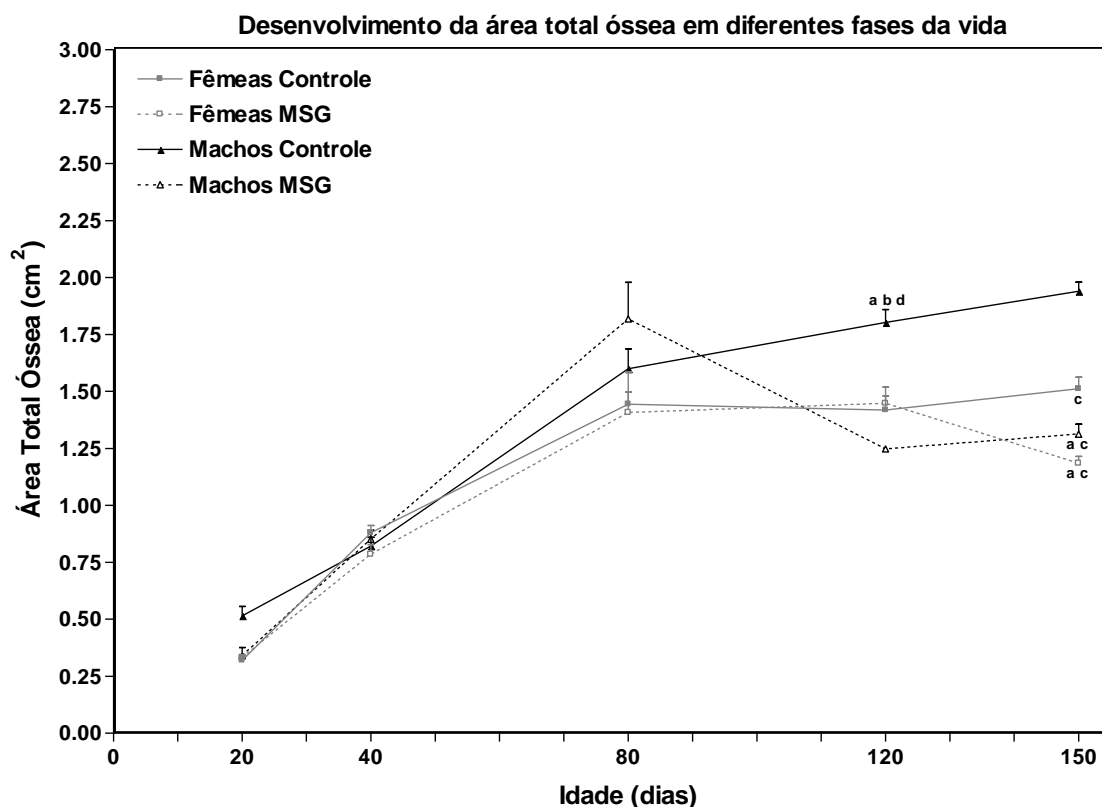


GRÁFICO 3. Análise da área total óssea dos fêmures dos grupos de 20; 40; 80; 120 e 150 dias de vida. Os dados foram expressos como média \pm EPM e a comparação intergrupo foi analisada pelo teste one-way ANOVA seguido de pós-teste Tukey-Kramer, considerando $p < 0.05$ como significante. Abreviações: a, $p < 0.05$ vs. fêmeas controle; b, $p < 0.05$ vs. fêmeas tratadas com MSG; c, $p < 0.05$ machos controle; d, $p < 0.05$ vs. machos tratados com MSG.

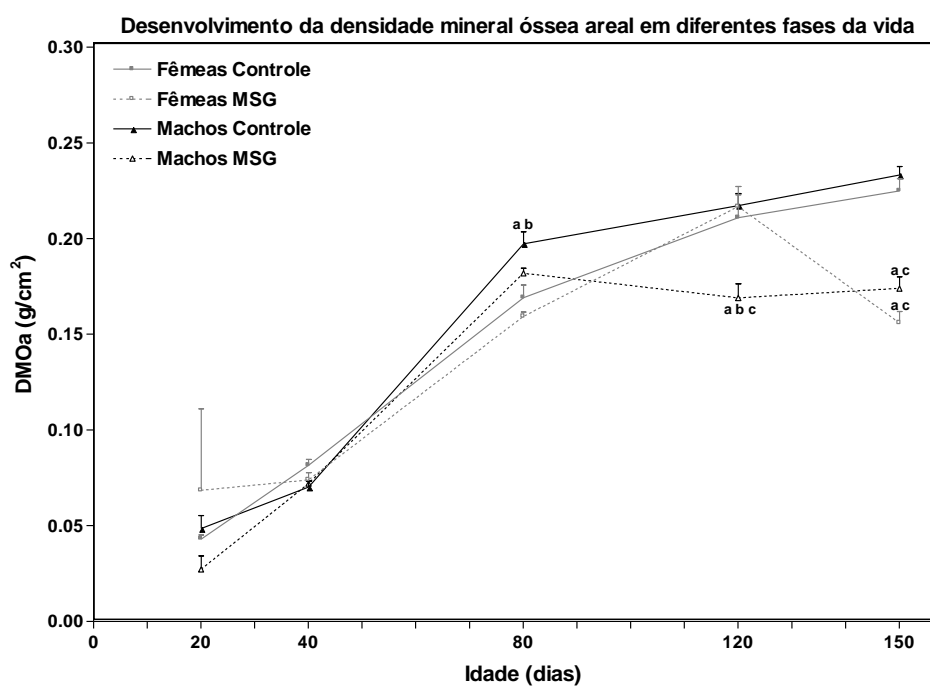


GRÁFICO 4. Análise da Densidade Mineral Óssea Areal dos fêmures dos grupos de 20; 40; 80; 120 e 150 dias de vida. Os dados foram expressos como média \pm EPM e a comparação intergrupo foi analisada pelo teste one-way ANOVA seguido de pós-teste Tukey-Kramer, considerando $p < 0.05$ como significativa. Abreviações: a, $p < 0.05$ vs. fêmeas controle; b, $p < 0.05$ vs. fêmeas tratadas com MSG; c, $p < 0.05$ machos controle; d, $p < 0.05$ vs. machos tratados com MSG.

5.2.2 Ensaio Mecânico

Os resultados do teste de flexão de três pontos, que analisa as propriedades mecânicas da porção cortical dos fêmures são mostrados nos gráficos 5; 6 e 7 que avaliam força máxima, rigidez e tenacidade respectivamente. Observamos nos gráfico 5 que aos 20 dias a força máxima dos machos controle é maior do que todos os grupos. Aos 40 e 120 dias não há diferença. Aos 80 dias de vida, machos controle apresentam maior valor em relação a ambos os grupos de fêmeas. Aos 150 dias os grupos tratados apresentam menor força máxima em relação aos grupos controle. Além disto, aos 150 dias os machos controle possuem maior força máxima em relação a fêmeas controle.

Nos gráfico 6 a rigidez não varia aos 20; 40 e 120 dias de vida. Aos 80 dias de vida os machos tratados apresentam maior rigidez que ambos os grupos de fêmeas. Finalmente, aos 150 dias de vida ambos os grupos controle possuem maior rigidez do que ambos os grupos tratados.

Por fim, ao analisar a tenacidade no gráfico 7, aos 20 e 40 dias ambos os grupos de fêmeas é menor do que os grupos de machos. Aos 80 dias não foram identificadas diferenças. Aos 120 e 150 dias os machos controle apresentam maior tenacidade do que todos os grupos e as fêmeas controle apresentam maior tenacidade do que seu grupo tratado.

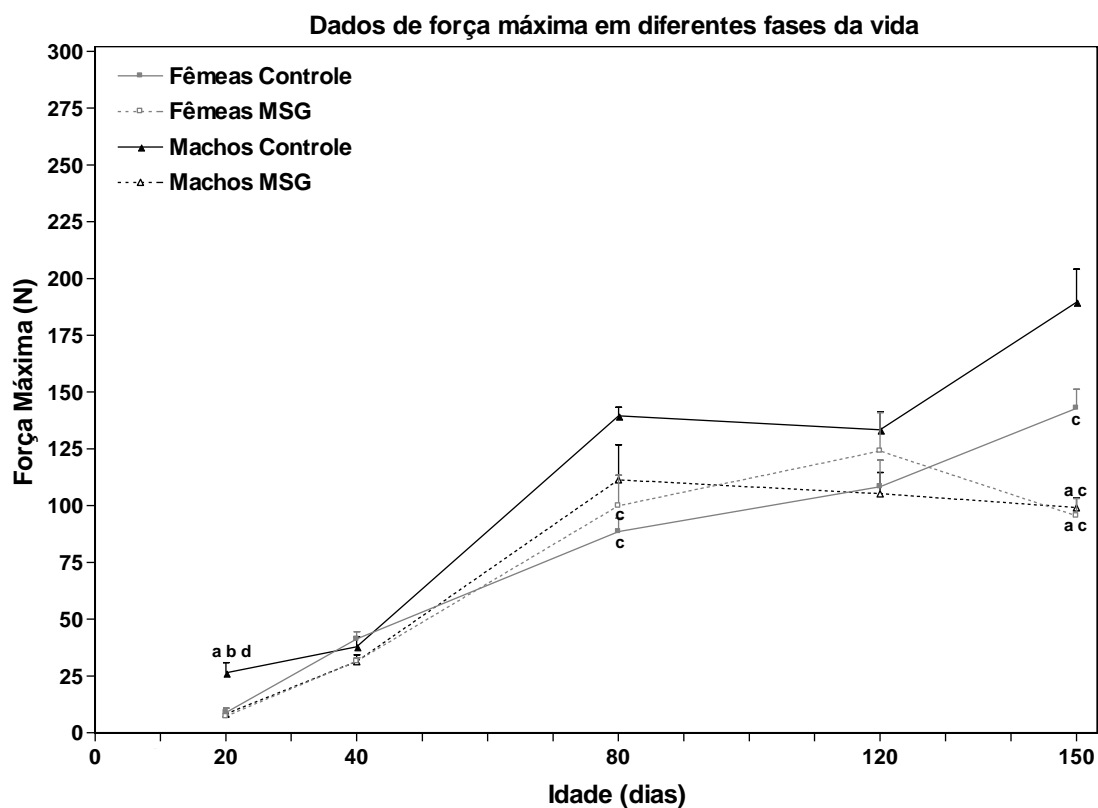


GRÁFICO 5. Dados de Força máxima de todos os grupos nas idades de 20; 40; 80; 120 e 150 dias de vida. Os dados foram expressos como média \pm EPM e a comparação intergrupo foi analisada pelo teste one-way ANOVA seguido de pós-teste Tukey-Kramer, considerando $p < 0.05$ como significante. Abreviações: a, $p < 0.05$ vs. fêmeas controle; b, $p < 0.05$ vs. fêmeas tratadas com MSG; c, $p < 0.05$ machos controle; d, $p < 0.05$ vs. machos tratados com MSG.

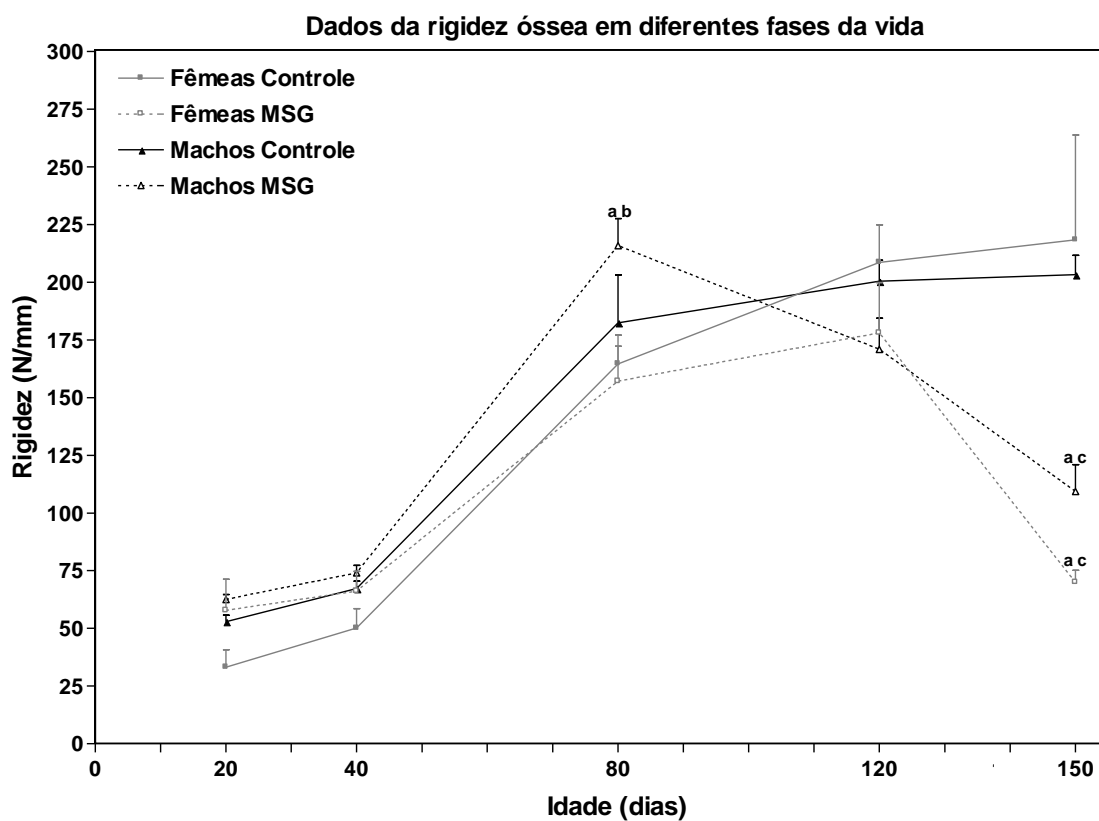


GRÁFICO 6. Dados de Rigidez óssea de todos os grupos nas idades de 20; 40; 80; 120 e 150 dias de vida. Os dados foram expressos como média \pm EPM e a comparação intergrupo foi analisada pelo teste one-way ANOVA seguido de pós-teste Tukey-Kramer, considerando $p < 0.05$ como significante. Abreviações: a, $p < 0.05$ vs. fêmeas controle; b, $p < 0.05$ vs. fêmeas tratadas com MSG; c, $p < 0.05$ machos controle; d, $p < 0.05$ vs. machos tratados com MSG.

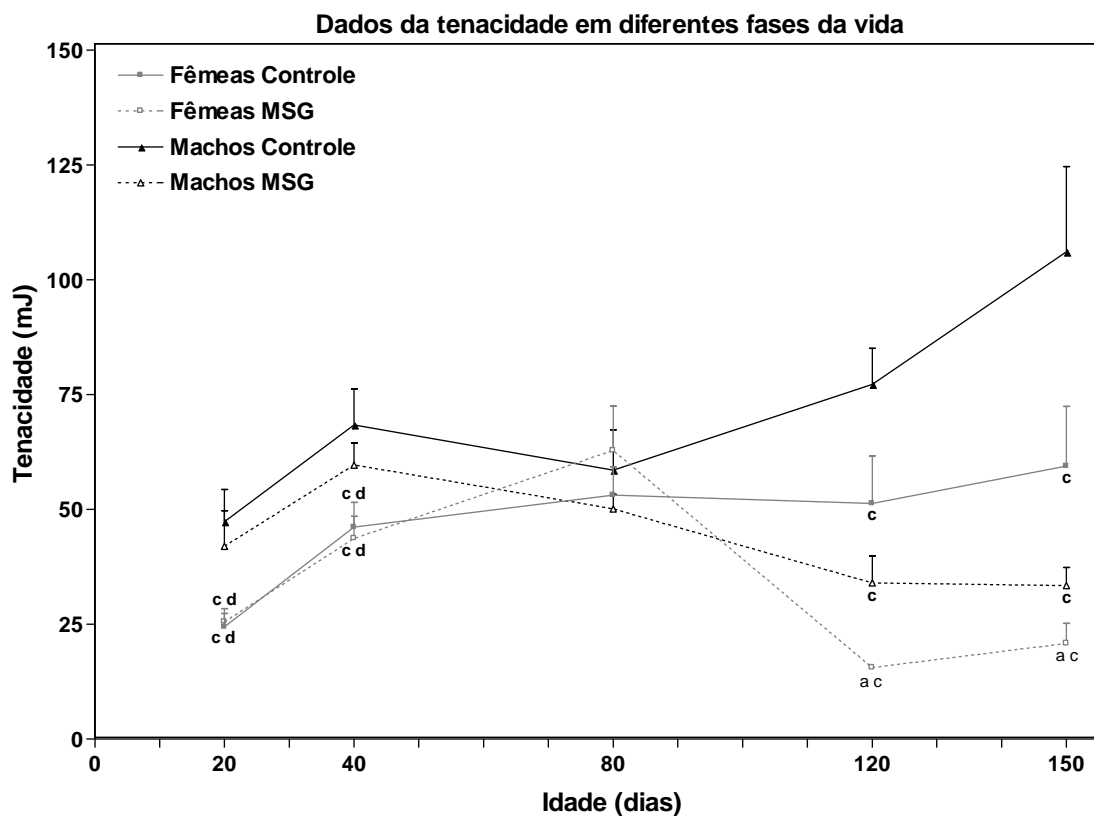


GRÁFICO 7. Dados de Tenacidade de todos os grupos nas idades de 20; 40; 80; 120 e 150 dias de vida. Os dados foram expressos como média \pm EPM e a comparação intergrupo foi analisada pelo teste one-way ANOVA seguido de pós-teste Tukey-Kramer, considerando $p < 0.05$ como significativo. Abreviações: a, $p < 0.05$ vs. fêmeas controle; b, $p < 0.05$ vs. fêmeas tratadas com MSG; c, $p < 0.05$ machos controle; d, $p < 0.05$ vs. machos tratados com MSG.

5.2.3 Área crosseccional diafisária femural

A área cortical e medular estão representadas esquematicamente na figura 3 e os dados estão expressos na tabela 1. Aos 20 dias de vida a área medular dos machos controle é maior do que outros grupos e a área cortical dos machos controle é maior do que dos machos tratados. Aos 40 dias não houve diferença nas áreas cortical e medular. Aos 80 dias as áreas cortical e medular de machos controle é maior do que as áreas de ambos os grupos de fêmeas. As áreas cortical e medular do grupo de machos tratado é maior do que do grupo tratado de fêmeas. Aos 120 dias de vida não houve diferença significcativa entre as áreas. Aos 150 dias de vida, a área medular de machos controle é maior do que a de machos e fêmeas tratadas, enquanto a área cortical de machos controle é maior do que todos os grupos e a área cortical das fêmeas controle é maior do que a de fêmeas tratadas.

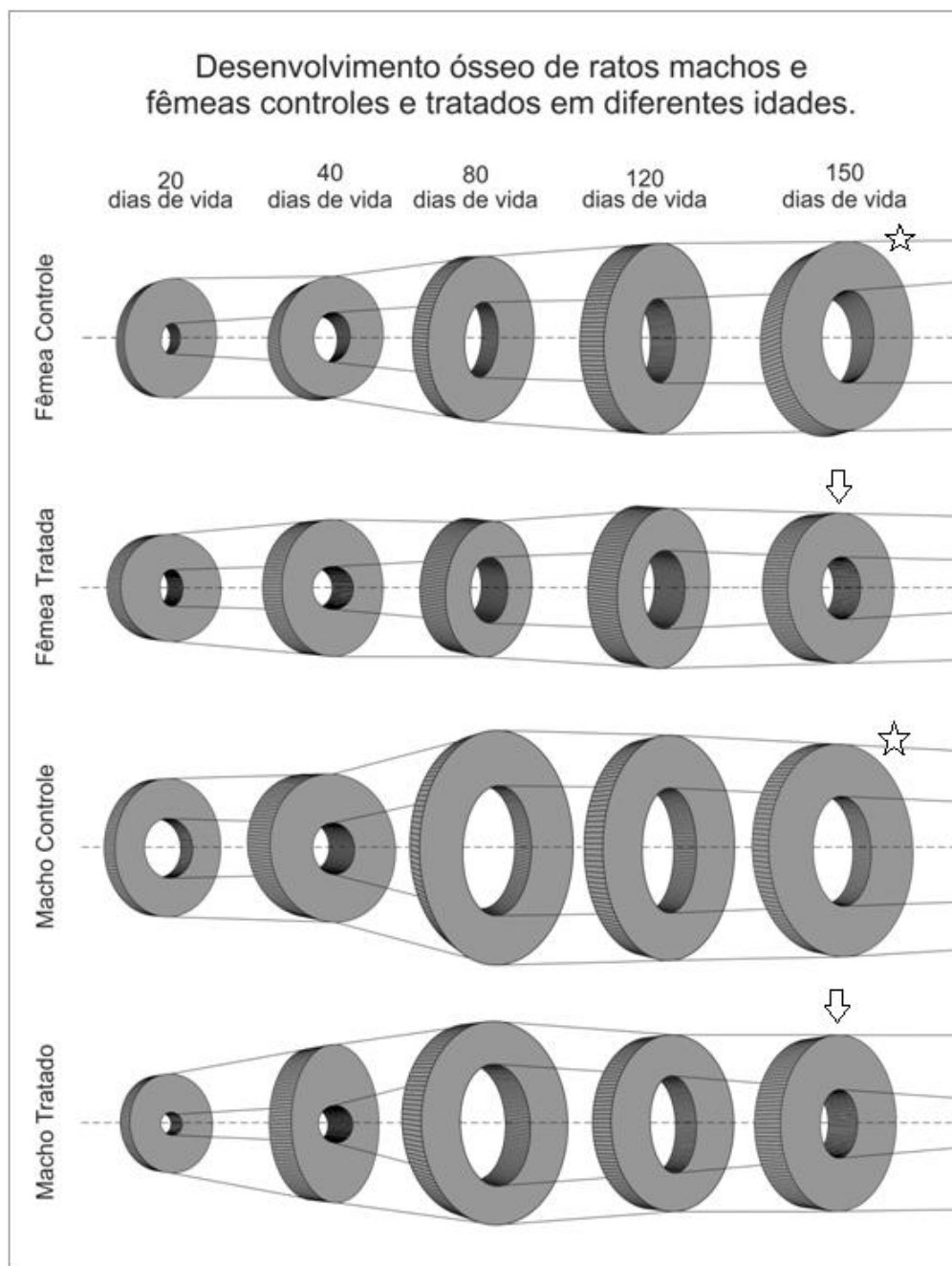


FIGURA 3. Representação esquemática das áreas corticais e medulares de todos os grupos avaliados nas diferentes idades (20; 40; 80; 120 e 150 dias de vida). As médias dos diâmetros foram utilizadas no programa Corew Draw 9.0 para confecção do desenho, aumentando o valor obtido em 100 vezes tendo desta forma imagens que representem as reais áreas mantendo suas relações entre os diferentes grupos. As estrelas representam a diferença entre os grupos controle aos 150 dias de vida demonstrando o dimorfismo sexual esquelético cortico-medular. As setas demonstram por sua vez, que o tratamento com MSG abole o dimorfismo sexual esquelético promovendo uma feminilização da geometria óssea dos ratos machos (ver tabela 1).

5.3 Parâmetros Bioquímicos

Os parâmetro bioquímicos estão expressos na tabela 2.

5.3.1 Cálcio

Aos 20 dias os níveis de cálcio das fêmeas tratadas é maior do que das fêmeas tratadas. Aos 40 e 120 dias não há diferença. Aos 80 dias o nível de cálcio das fêmeas controle é maior do que de todos os outros grupos e o nível de cálcio das fêmeas tratadas é maior do que dos machos tratados. Aos 150 dias de vida os níveis de cálcio de ambos os grupos controle é maior do que dos dois grupos tratados.

5.3.2 Fósforo

Os níveis de fósforo aos 20 e 40 dias não variam estatisticamente. Aos 80 dias o nível de fósforo do grupo de machos tratados é maior do que de todos os outros grupos. Aos 120 dias os grupos controle de fêmeas e tratados de machos apresentam maiores níveis de fósforo em relação ao grupo controle de machos. Por fim, aos 150 dias os níveis de fósforo do grupo controle de machos é maior do que todos os outros grupos, sendo que as fêmeas controle apresentam maiores níveis em relação aos machos tratados.

5.3.3 Fosfatase alcalina total (FAT)

Aos 20 dias de vida, os níveis de FAT de machos tratados é maior do que todos outros grupos e as fêmeas tratadas apresentaram maior nível de FAT em relação a fêmeas controle. Aos 40 dias os níveis de FAT de machos tratados se mantêm como previamente descrito. Aos 120 dias a FAT de fêmeas controle é maior do que de machos controle. Finalmente, aos 150 dias a FAT de ambos os grupos de fêmeas é maior em relação aos grupos de machos. Além disto, os machos tratados apresentam maior FAT do que machos controle.

5.4 Radioimunoensaio

Os dados de leptina e corticosterona estão expressos conjuntamente com os parâmetros bioquímicos na tabela 2.

5.4.1 Leptina

Aos 20 dias de vida o nível de leptina é maior no grupo de fêmeas tratadas em relação a todos os grupos. Aos 40 dias não há diferença significativa entre grupos. Aos 80 dias o controle de machos é maior do que o controle de fêmeas. Aos 120 dias o nível de leptina de machos tratados é maior do que os outros grupos e os níveis de leptina de fêmeas tratadas é maior do que machos e fêmeas controle. Os resultados aos 150 dias se repetem, porém os níveis de leptina das fêmeas tratadas estão mais elevados nesta fase.

5.4.2 Corticosterona

Dos 20 aos 80 dias os níveis de corticosterona não variam significativamente. Aos 120 e 150 dias os níveis de corticosterona dos grupos de fêmeas e do grupo tratado de machos é maior do que dos machos controle.

| Tabela 2 – Radioimunoensaio e análises bioquímicas | | | | | |
|--|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Idade | Parâmetros | Grupos Experimentais | | | |
| | | Fêmeas controle | Fêmeas tratadas com MSG | Machos controle | Machos tratados com MSG |
| 20 dias de idade | Leptina (ng/dL) | 1.606±0.173 ^b | 4.561±1.056 | 1.657±0.278 ^b | 1.228±0.147 ^b |
| | Corticosterona (µg/dL) | 8.581±1.214 | 7.747±1.573 | 8.247±1.408 | 6.624±0.870 |
| | Cálcio (mg/dL) | 10.170±0.922 ^b | 13.130±0.704 | 11.320±0.689 | 11.820±0.606 |
| | Fósforo (mg/dL) | 8.044±0.716 | 6.965±0.677 | 9.960±0.870 | 8.703±0.865 |
| | Fosfatase alcalina total (U/L) | 51.720±2.130 ^{b,d} | 78.330±10.620 ^d | 68.280±6.696 ^d | 115.500±5.702 |
| 40 dias de idade | Leptina (ng/dL) | 1.950±0.291 | 3.189±0.724 | 1.590±0.310 | 2.462±0.786 |
| | Corticosterona (µg/dL) | 7.695±1.696 | 8.329±0.442 | 9.268±1.099 | 7.953±1.324 |
| | Cálcio (mg/dL) | 8.328±0.395 | 7.825±0.444 | 8.818±0.820 | 9.487±1.092 |
| | Fósforo (mg/dL) | 10.560±1.341 | 13.030±0.536 | 10.930±1.592 | 14.020±1.320 |
| | Fosfatase alcalina total (U/L) | 58.510±9.965 ^d | 66.020±1.973 ^d | 68.250±6.819 ^d | 139.290±3.493 |
| 80 dias de idade | Leptina (ng/dL) | 1.477±0.263 ^c | 1.693±0.168 | 2.554±0.118 | 2.368±0.109 |
| | Corticosterona (µg/dL) | 8.367±1.062 | 9.568±1.699 | 8.596±1.446 | 7.695±1.016 |
| | Cálcio (mg/dL) | 13.060±0.835 | 9.478±0.618 ^a | 8.792±0.430 ^a | 6.423±0.836 ^{ab} |
| | Fósforo (mg/dL) | 5.115±0.450 ^d | 9.661±1.661 ^d | 8.025±1.110 ^d | 14.920±1.552 |
| | Fosfatase alcalina total (U/L) | 29.970±5.882 | 29.140±1.577 | 26.830±6.745 | 28.430±8.155 ^b |
| 120 dias de idade | Leptina (ng/dL) | 1.165±0.083 ^{bd} | 4.610±0.293 ^d | 1.957±0.103 ^{bd} | 34.105±1.389 |
| | Corticosterona (µg/dL) | 16.091±0.961 | 17.881±1.065 | 9.489±0.236 ^{ad} | 15.195±1.236 |
| | Cálcio (mg/dL) | 7.824±0.975 | 9.700±0.963 | 7.841±0.500 | 8.698±0.795 |
| | Fósforo (mg/dL) | 10.600±0.734 | 7.524±0.750 | 4.536±0.335 ^{ad} | 10.310±0.882 |
| | Fosfatase alcalina total (U/L) | 37.220±4.892 | 45.190±4.472 | 26.320±5.874 ^a | 28.790±5.225 |
| 150 dias de idade | Leptina (ng/dL) | 1.422±0.119 ^{bd} | 10.218±2.422 ^d | 2.424±0.245 ^{bd} | 32.204±3.674 |
| | Corticosterona (µg/dL) | 13.061±0.676 | 12.997±0.566 | 8.645±0.834 ^{ad} | 12.639±0.998 |
| | Cálcio (mg/dL) | 10.490±0.904 | 4.540±0.500 ^{a,c} | 9.231±1.367 | 4.575±0.169 ^{a,c} |
| | Fósforo (mg/dL) | 9.790±0.431 ^c | 7.720±0.516 ^c | 17.750±1.976 | 5.170±1.017 ^{a,c} |
| | Fosfatase alcalina total (U/L) | 44.500±2.316 | 55.540±4.153 | 25.600±2.054 ^{a,b,d} | 32.620±3.493 ^{a,b} |

Dados foram expressos como média ± EPM e a comparação intergrupo foi analisada pelo teste one-way ANOVA seguido de pós-teste Tukey-Kramer, considerando p<0.05 como significante. Abreviações: a, p<0.05 vs. fêmeas controle; b, p<0.05 vs. fêmeas tratadas com MSG; c, p<0.05 machos controle; d, p<0.05 vs. machos tratados com MSG.

6 DISCUSSÃO

6.1 Comparação dos ratos machos e fêmeas submetidos ao tratamento neonatal com MSG

A obesidade é um distúrbio de saúde para homens e mulheres, abrangendo todas as faixas etárias e todas as origens étnicas e socioeconômicas. Existem diversas abordagens para o controle do peso corporal, e uma das chaves é o balanço energético (MILLER, 1991). Em 1969, foi relatado pela primeira vez ganho de peso corporal em machos e fêmeas de ratos aos quatro meses de vida com sobredose de MSG imediatamente na fase neonatal, mesmo com os controles apresentando maior consumo de alimentos (OLNEY, 1969). Takeda et al. (2002), utilizando ratos promoveram lesão neurotóxica em núcleos específicos e demonstraram que lesões isoladas no núcleo arqueado (Narq) e paraventricular (NPV) promovem aumento da ingestão de alimentos culminando com aumento de peso corporal. Esses dados corroboram nossos resultados que demonstram ganho de peso em ratos tratados com glutamato monossódico ao final de 150 dias, tanto em machos quanto em fêmeas (gráfico 1). Redding et al., (1971) demonstraram que ratos-MSG aos 40 dias de vida apresentam comprimento nasoanal e peso corporal menor do que ratos controle, sendo este segundo dado observado também em nosso estudo (gráfico 1). Abe et al. (1990) demonstraram que a lesão por glutamato leva a diminuição da concentração de neurônios NPY no Narq e NPV, e definem esta alteração como principal causa de distúrbios metabólicos em ratos-MSG. McMinn et al. (2000) demonstraram que neurônios NPY estão presentes em diferentes regiões cerebrais, no entanto, os neurônios NPY do Narq são os únicos sensíveis a mudança da ingestão de alimento sinalizada pela leptina. Seo et al. (2010), utilizando a dose de 3 g/Kg de MSG com sonda orogástrica através de tratamento crônico por sete semanas, demonstraram que os ratos apresentaram diminuição de apetite. Contrariamente, Diniz et al. (2005) utilizando ratos machos observaram aumento na ingestão de alimentos associado a aumento de níveis de leptina, quando tratados com dieta suplementada com MSG por um período mais curto de 45 dias de tratamento.

O osso está em contínuo processo de formação e reabsorção durante a vida do indivíduo, processo denominado remodelação óssea e que ocorre através da

atividade de osteoblastos e osteoclastos respectivamente (Frost et al., 1969). O aumento ou a perda da massa óssea depende do balanço entre esses dois processos (MOSLEY, 2000) que são regulados sistematicamente por hormônios, dentre eles os hormônios hipofisários (Yeh et al., 1997). Esteves et al. (2010) ao analisarem o comprimento do fêmur em ratos tratados com MSG, observaram redução do comprimento do fêmur, ou seja, houve uma redução na taxa de crescimento longitudinal óssea nestes animais (MAITER et al., 1991). Uma hipótese provável é a deficiência crônica de Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento (GHRH), ocasionada pelo tratamento com MSG, resultando numa inibição da secreção de GH e deficiência de IGF-1 (BRANDOLIS, 2009; REDDING et al., 1971; WAKABAYASHI et al., 1986). Esses resultados corroboram nossas observações, onde identificamos uma redução do comprimento femural a partir dos 80 dias em ambos os sexos (tabela 1). Gao J et al. (1994), também relataram que animais tratados com MSG desenvolvem uma síndrome caracterizada por perda neural, anormalidades neuroendócrinas, retardo do crescimento esquelético e obesidade acompanhada de hipofagia. Em nosso estudo não mensuramos o consumo de ração para comparar a ingestão.

Brandolis (2009), complementa que ratos tratados com MSG tiveram menor tamanho femural aliado a uma baixa densidade mineral óssea e redução da diáfise e metáfise em decorrência a uma deficiência neuroendócrina induzida por MSG com déficit de GH, conseqüentemente IGF-1 como já discutido inclusive associado a déficit de hormônios tireoideanos. O crescimento longitudinal do osso é o resultado do processo de ossificação endocondral, o qual é regulado por fatores de crescimento e hormônios, dentre eles o GH-IGF-1, confirmando novamente a hipótese (KOVÁCS et al., 1995; LOVERIDGE et al., 1995). O GH biotransformado em IGF-1 é conhecido por estimular a formação do perióstio e do osso cortical (CHEN; YEH; ALOIA 1997; KOVACS et al., 1995). Nossos dados apresentam diminuição de DMOa em ratos-MSG com 150 dias, sendo observado uma diminuição nos machos já a partir dos 120 dias de vida (gráfico 4). Complementando os dados, é descrito em humanos que a deficiência de GH está associada à baixa estatura e densidade mineral óssea (BARONCELLI et al., 2003).

O CMO, a ATO e a DMOa femural apresentam variação durante toda vida em ratos (BANU et al., 2002), no entanto, estas variações servem para adaptação do tecido a esforços mecânicos via remodelação óssea. Desta forma a massa óssea é

ajustada dentro de limites que suportem tensões mecânicas geradas inclusive pelo próprio peso corporal (FROST et al., 1969). Teranishi et al. (1998) já relataram que ossos de ratos tratados-MSG apresentam menor comprimento, menor diâmetro diafisário femural e menor densidade mineral óssea aos 12 meses. A DMOa de nossos ratos tratados aos 150 dias de vida esteve diminuída por apresentar menor CMO e ATO nesta fase em ambos os sexos e aos 120 dias somente nos machos (gráfico 2; 3 e 4). Nossos dados demonstram, que neste modelo de indução de obesidade-MSG os grupos em idade adulto-jovem de 150 dias apresentam um osso de menor qualidade pelo fato de seu comprimento ósseo, área cortical diafisária (tabela 1), ATO, CMO e DMOa femural serem significativamente menores quando comparados ao seus grupos controle. Corroborando estes resultados Jepsen (2009), enfatiza que a forma e tamanho dos ossos determinam sua força. A diáfise femoral em seres humanos é sede de fraturas por estresse e Baldwin et al. (2011) demonstraram que a tenacidade e a resistência à flexão são indicadores da qualidade óssea neste tipo de fratura.

Pesquisas em seres humanos trazem resultados controversos sobre a leptina e a massa óssea. Alguns estudos transversais não demonstraram correlação entre a leptina e CMO medido em vários sítios do esqueleto (BORA, 2003), ou entre a leptina e os marcadores da remodelação óssea. Cornish et al. (2002) evidenciaram que a leptina tem efeito osteoblastogênico em cultivo de células de ratos além de efeito anti-osteoclastogênico em cultivo de células de camundongos, fatores positivos para aumento de massa óssea. Além disto, avaliaram *in vivo* e observaram que a administração intravenosa de leptina em camundongos adultos machos levam a diminuição da fragilidade óssea. Quando foram avaliados estudos em cultura primária de osteoblastos humanos, Reseland et al. (2001) observaram dados semelhantes e mostraram que a leptina é expressa e secretada pelos osteoblastos e está presente na fase de formação também dos osteócitos. Esse resultados em camundongos, ratos e humanos demonstram um efeito positivo na formação de osteoblastos bem como na mineralização da matriz óssea destes quando da ação da leptina via corrente sanguínea. Nossos dados, no entanto apresentam ratos-MSG adulto-jovens com aumento de leptina (tabela 2) e alterações ósseas não condizentes com resultados supracitados. No entanto, Takeda et al. (2002) promoveram lesão neurotóxica em núcleos específicos e demonstraram que lesões isoladas no núcleo arqueado apresentam aumento de leptina. Olney (1969) já

relatara tanto aumento de leptina, quanto corticosterona em modelos de camundongos-MSG. Recentemente Seo et al. (2010) usando MSG cronicamente também evidenciaram aumento de cortisol. O hipercortisolismo favorece a osteoporose por inibição da formação óssea (AHIMA et al., 1999; REID, 1997). Nossos resultados demonstram perda óssea e mineral na fase de hipercortisolismo, no entanto, não é suficiente afirmar que o aumento de cortisol foi o único responsável pelas alterações ósseas nos ratos adulto-jovens, visto a falha do eixo hipotalâmico para produção de GH; além disto, neste modelo o cortisol e a leptina periférica na corrente sanguínea, não são fatores exclusivos de ação óssea já que a leptina não está atuando centralmente via SNS a partir do Narq. Kristova et. al., (1998) verificaram que lesão do Narq com mesma dose utilizada em nosso trabalho diminui a atividade vasomotora no tronco encefálico de ratos adultos; isso demonstra a diminuição da resposta noradrenérgica central após perfusão de noradrenalina em doses de 0.01 a 1 micrograma. Com lesão por MSG a leptina não se liga adequadamente no Narq e a via Narq-SNS fica menos ativa diminuindo a atividade osteoblastogênica. Portanto nossos dados demonstram que o cortisol não é a principal influência nas alterações densitométricas e bioquímicas que se apresentam em ratos-MSG como hipocalcemia aos 150 dias associada a diminuição de DMOa. Estes ratos-MSG podem apresentar uma deficiência na absorção de cálcio não influenciada pela dieta, mas por diminuição da absorção intestinal, ou inclusive podem perder cálcio pelos rins favorecendo inclusive a lesões renais a curto prazo. No entanto, não foi dosado cálcio na urina para compreendermos o efeito do tratamento. Além disto o paratormônio, produzido pela paratireóide pode estar aumentado a longo prazo sequestrando cálcio do osso para o sangue, o que leva finalmente a perda de cálcio pelos rins pela saturação deste íon, o que leva em última situação uma queda de cálcio no sangue.

Além destes dados, foi observada diminuição do fósforo dos machos-MSG em relação aos controles e diminuição de fósforo sanguíneo de fêmeas-MSG em relação ao macho controle, com uma tendência a menores níveis em relação as fêmeas controle. É importante lembrar que o cálcio e o fósforo são necessários para a formação dos cristais de hidroxiapatita que são componentes estruturais inorgânicos que fazem parte da matriz óssea promovendo a mineralização e rigidez do tecido (JUNQUEIRA: CARNEIRO, 2006).

Além de nossos dados, Miskowiak et al. (1993) já haviam demonstrado em mesmo modelo obesidade-MSG, que ratos machos tem diminuição de testosterona. Em 1999, Miskowiak et al. demonstraram também que em fêmeas há diminuição de estrógeno. Utilizando modelo de camundongos knockout, mais recentemente Callewaert et al. 2010 demonstraram a importância da testosterona e do estrógeno para o desenvolvimento ósseo tanto em camundongos machos quanto em fêmeas, ficando claro que os hormônios sexuais são também fatores causais das alterações ósseas evidenciadas em nosso trabalho pois influenciam diretamente a mineralização e formação óssea.

Por fim, A FAT é uma enzima inespecífica e importante para o osso e fígado, com produção reduzida em outros órgãos como intestino e placenta. No presente estudo aos 150 dias de vida os grupos de fêmeas possuem maior FAT do que os grupos de machos e os machos-MSG apresentam maior FAT do que seu grupo controle. Isto demonstra nitidamente que existe um dimorfismo sexual na biodisponibilidade da enzima. Em machos tratados a FAT está mais elevada do que machos controle e percebemos que a FAT, uma enzima marcadora de formação óssea, não foi capaz de manter os níveis de cálcio e DMOa em níveis fisiológicos. Com o aumento da FAT podemos inferir indiretamente, que há aumento da fosfatase alcalina óssea a qual representa um marcador de formação óssea que pode estar aumentado na tentativa de minimizar a perda da matriz óssea relacionada com as ações hormonais. Um estudo feito por Racek et al., (2001) demonstraram que ratos com obesidade por MSG apresentam também aumento da atividade da fosfatase alcalina duodenal cronicamente. No entanto, isso representa menos do que 10% da FAT, e mesmo que a enzima duodenal pudesse estar alterada em nosso estudo, a fosfatase alcalina óssea tem maior capacidade de expressão do que a duodenal quando mensura-se a FAT, sendo portanto a FAT uma enzima de melhor escolha para avaliar a atividade óssea quando não se consegue mensurar apenas a fosfatase alcalina óssea.

6.2 Modulação hormonal sobre o desenvolvimento dos parâmetros somatométricos

Em estudo prévio realizado por Mello et al. (2012) os autores demonstram que diferenças nos parâmetros somatométricos se manifestam após a puberdade.

Vários estudos têm demonstrado que este desenvolvimento semelhante entre os dois sexos antes da puberdade ocorre porque ambos os sexos passam por um ambiente hormonalmente semelhante (TANNER et al., 1976; TERASAWA; FERNANDEZ, 2001). Neste trabalho percebemos que não houve diferença no peso corporal, comprimento femural e área cortical em ambos os grupos controle até o início da puberdade (40 dias de vida). Apenas na idade adulta que os valores passaram a ser maiores nos machos controle em relação a fêmeas controle. Isto é explicado novamente por uma maior ação do GH-IGF-1 pré-puberdade devido uma quiescência relativa do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG). Após a puberdade, o eixo HPG está mais ativo favorecendo ao dimorfismo (TANNER et al., 1976; TERASAWA; FERNANDEZ, 2001). Quanto aos níveis de leptina, corticosterona, cálcio, fósforo e fosfatase alcalina, não evidencia-se diferença entre os grupos controle até a puberdade (40 dias). Numa fase tardia da puberdade (80 dias) houve apenas diferença nos níveis de leptina das fêmeas controle que esteve menor do que os machos controle e aumento no nível de cálcio destas fêmeas em relação aos machos controle, o que pode representar uma maior atividade do eixo HPG nesta idade (TANNER et al., 1976; TERASAWA; FERNANDEZ, 2001). Nos chama atenção a variação nos níveis de corticosterona nos animais adultos, onde um padrão dimórfico é encontrado com as fêmeas controle apresentando níveis mais altos do que os machos controle. Em relação a leptina, embora evidências indiquem que quando comparados na mesma idade, machos apresentem concentrações plasmáticas maiores que fêmeas (LANDT et al., 1998, PINILLA et al., 1999), em nosso estudo não encontramos diferenças estatísticas entre machos e fêmeas controles em todos os períodos analisados com uma exceção onde fêmeas controle aos 150 dias apresentam valores maiores do que machos controle discordando de dados prévios de literatura. De acordo com estudo prévios realizados esta resposta dimórfica pode ser atribuída aos efeitos estimulatórios do estrogênio e efeitos inibitórios de testosterona no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (LANDT et al., 1998; TANNER et al., 1976; TERASAWA; FERNANDEZ, 2001).

Parte do dimorfismo sexual esquelético é evidenciado na fase pré-pubere e púbere inicial, onde as propriedades biomecânicas e biofísicas são diferentes entre grupos controle. Foi observado que o ensaio mecânico não revelou diferença na rigidez, no entanto, teste de força máxima e tenacidade apresentaram valores maiores no sexo masculino, mesmo não havendo diferença na DMOa entre este

grupos até a puberdade inicial (gráficos 5 ao 7). Nestes mesmos gráficos observa-se diferença na tenacidade entre os sexos pré-puberdade dos 20 e 40 dias de vida. Na fase adulta (120-150 dias) observamos que os machos controle apresentam maior CMO e ATO em relação as fêmeas controle, apesar de não apresentar maior DMOa (gráficos 2 ao 4). Além disto os machos apresentaram no ensaio mecânico maior força máxima e tenacidade (150 dias) não havendo diferença entre sexos na rigidez óssea (150 dias). Estes dados demonstram que a densidade mineral óssea e a força óssea aumentam durante o desenvolvimento de ambos os sexos. Em conjunto com dados de área cortical e medular (tabela 2) todos os dados sugerem que a diferença de força óssea possa ser influenciada tanto pela geometria óssea quanto pela densidade óssea. De acordo com Gilsanz et al. (1997) e Kim et al. (2003), um aumento na aposição cortical e reabsorção endocortical em machos durante a puberdade faz com que a massa óssea cortical dos machos permaneça mais longe do eixo neutro do osso do que em fêmeas, o que reflete no aumento de resistência óssea. Portanto, nosso estudo corrobora o conceito clássico da ação estimulante dos andrógenos, principalmente a testosterona, no ganho de peso e desenvolvimento masculino esquelético normal e da ação inibitória de estrogênios que limitam o crescimento linear dos ossos longos (TURNER et al., 1989). Estas diferenças promovem maior resistência a fratura óssea em machos, que pôde claramente ser provada com os dados biomecânicos observados.

6.3 Alterações no dimorfismo sexual esquelético e secreção hormonal dos ratos tratados com MSG.

Evidenciou-se aqui que a lesão neuronal causada por administração neonatal de MSG, induziu alterações acentuadas no peso corporal e comprimento do fêmur, com uma diminuição no peso corporal até o período da puberdade e um aumento do peso quando adultos se comparados com seus grupos controle (REDDING et al., 1971). Como já citado Redding et al. (1971) demonstraram que a o tratamento com MSG leva a redução dos parâmetros somatométricos em ambos os grupos tratados com 40 dias de idade. Na fase adulta, a administração de MSG neonatal levou a um aumento na alimentação e maior peso corporal, em relação aos grupos controle (CHOI; DALLAMAN, 1999). As mudanças observadas podem ser explicadas quando se leva em conta que o eixo GH-IGF-1 é um fator chave no crescimento ósseo até a

puberdade (TANNER et al., 1976; TERASAWA; FERNANDEZ, 2001). O tratamento com MSG leva a reduções significativas nas concentrações circulantes basais de GH e redução na amplitude e frequência do pulso de GH, levando a supressão nas concentrações circulantes de IGF-I (KOVÁCS et al., 1996; MAITER et al., 1991;). Tal como observado na figura 8, os machos apresentaram maior sensibilidade ao tratamento com MSG quando as áreas corticais e medulares foram analisadas. Estes parâmetros foram reduzidos, levando a um padrão de desenvolvimento feminilizado do osso dos machos – isso ocorreu diretamente por influência do MSG lesionando centralmente o *Narq*, considerando que o tratamento neonatal com MSG altera menos a função gonadal em machos do que em fêmeas (MATSUZAWA, 1979). Os resultados do presente estudo mostraram que a secreção de leptina e corticosterona foram superiores em grupos-MSG comparados com os valores encontrados para seus respectivos controles na fase adulta com exceção da corticosterona em fêmeas (CHOI; DALLMAN, 1999). Recentemente Kuznetsova et al. (2006) também demonstraram que a administração de MSG leva a um aumento na secreção de corticosterona em ambos os sexos. Esta secreção aumentada poderia prejudicar o desenvolvimento ósseo não sendo o fator primordial (AHIMA et al., 1999; REID, 1997). O dimorfismo sexual esquelético desapareceu completamente nos machos como evidenciado pelos parâmetros biofísicos. A redução da qualidade óssea com o uso de MSG pode influenciar nas propriedades mecânicas ósseas não apenas por mudança na densidade óssea. Mudanças na geometria óssea dos machos-MSG foram observadas na figura 8 (dados na tabela 1). Estas alterações justificam a fragilidade esquelética em adição a uma significativa diminuição de CMO e DMOa. Os parâmetros biomecânicos foram reduzidos nos grupos tratados-MSG, os quais mostraram menores valores de força máxima, rigidez e tenacidade em relação aos seus grupos controle. Em última análise, uma fratura clínica é um evento biomecânico, então qualquer modificação da qualidade óssea é de relevância clínica por alterar o desempenho biomecânico do osso em relação a massa óssea (VAN der MEULEN et al., 2001; WALLACH et al., 1992; WATTS, 2002).

7 CONCLUSÃO

Em resumo os dados do presente estudo demonstram que a lesão química dos neurônios hipotalâmicos sensíveis ao MSG durante o período crítico de diferenciação sexual causa modificações a longo prazo nas propriedades biofísicas ósseas e nas concentrações séricas de leptina e corticosterona. Isto sugere que o tratamento neonatal com MSG pode eliminar a diferença sexo-dependente no desenvolvimento esquelético devido encontrarmos semelhanças nas alterações ósseas de machos na mesma extensão evidenciada nas fêmeas.

Milhares de agentes químicos são adicionados intencionalmente a alimentação e consumidos diariamente em baixas concentrações. Dentre estes, o MSG é um sal de ácido glutâmico usado como intensificador de sabor, sendo um dos aditivos mais amplamente utilizados na dieta. Uma melhor compreensão dos distúrbios induzidos por MSG no período inicial da vida, o qual altera o desenvolvimento do organismo em situações patológicas específicas é essencial para desenvolver terapias neuroendócrinas específicas nos distúrbios músculo-esqueléticos. No entanto, muitos estudos serão necessários para que tais procedimentos cheguem a prática clínica.

8 REFERÊNCIAS

ABE, M.; SAITO, M.; SHIMAZU, T. Neuropeptide Y in the specific hypothalamic nuclei of rats treated neonatally with monosodium glutamate. *Brain Res. Bull.*, v. 24, n. 2, p. 289-291, 1990.

AHIMA, R. S. et al. Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development. *Endocrinology*, v. 140, n. 6, p. 2755-2762, 1999.

AHMED, II et al. Prenatal ethanol and the prepuberal sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Physiol. Behav.*, v. 49, n. 3, p. 427-32, 1991.

BALDWIN, K. D. et al. Does morbid obesity negatively affect the hospital course of patients undergoing treatment of closed, lower-extremity diaphyseal long-bone fractures? *Orthopedics*, v. 34, n. 1, p. 18, 2011.

BANU, J.; WANG, L.; KALU, D. N. Age related changes in bone mineral content and density in intact male F344 rats. *Bone*, v. 30, n. 1, p. 125-130, 2002.

BARONCELLI, G. I. et al. Acquisition of bone mass in normal individuals and in patients with growth hormone deficiency. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, v. 16, suppl. 2, 327-335, 2003.

BARRACLOUGH, C. A.; GORSKI, R. A. Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. *Endocrinology*, v. 68, p. 68-79, 1961.

BECÚ-VILLALOBOS, D. et al. Brain sexual differentiation and gonadotropins secretion in the rat. *Cell. Mol. Neurobiol.*, v. 17, n. 6, p. 699-715, 1997.

BIERING-SØRENSEN, F.; BOHR, H.; SCHAADT, O. Bone mineral content of the lumbar spine and lower extremities years after spinal cord lesion. *Paraplegia*, v. 26, n. 5, p. 293-301, 1988.

BOUILLON R. et al. Estrogens are essential for male pubertal periosteal bone expansion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 89, n. 12, p. 6025-6029, 2004.

BRANDÓLIS, R. A. M. *Modulação autonômica cardiovascular no modelo experimental de obesidade induzida por glutamato monossódico em ratos*. 97 F. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Indicadores de fatores de risco e proteção. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2010/g07_89.htm> acesso em: 09 maio 2012.

CALLEWAERT, F. et al. Differential regulation of bone and body composition in male mice with combined inactivation of androgen and estrogen receptor-alpha. *Faseb J.*, v. 23, n. 1, p 232-240, 2009.

CALLEWAERT, F. et al. Skeletal sexual dimorphism: relative contribution of sex steroids, GH-IGF1, and mechanical loading. *J. Endocrinol.*, v. 207, n. 2, p. 127-134, 2010.

CARVALHO C. R. O. Mecanismos de ação hormonal. *In: CURI, R.; ARAUJO FILHO, J. P. Fisiologia Básica*. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2009. p. 673-694.

CHEN, M. M.; YEH, J. K.; ALOIA, J. F. Histologic evidence: growth hormone completely prevents reduction in cortical bone gain and partially prevents cancellous osteopenia in the tibia of hypophysectomized rats. *Anat. Rec.*, v. 249, n. 2, 163-72, 1997.

CHEVALLEY, T. et al. Fractures during childhood and adolescence in healthy boys: relation with bone mass, microstructure, and strength. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 96, n. 10, p. 3134-3142, 2011.

CHOI, S.; DALLMAN, M. F. Hypothalamic obesity: multiple routes mediated by loss of function in medial cell groups. *Endocrinology* v. 140, p. 4081-4088, 1999.

CORNISH, J. et al. Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. *J. Endocrinol.* v. 175, n. 2, p. 405-415, 2002.

DALY, J. A.; ERTINGSHAUSEN, G. Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the "CentrifiChem". *Clin. Chem.*, v. 18, n. 3, p. 263-265, 1972.

DEMIREL, G. et al. Osteoporosis after spinal cord injury. *Spinal Cord.*, v. 36, n. 12, p. 822-825, 1998.

DINIZ, Y. S. et al. Monosodium glutamate in standard and higher-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. *Nutrition*, v. 21, n. 6, p. 749-755, 2005.

ESTEVEZ, A. C. F. et al. A natação minimiza o retardo no crescimento somático e ósseo de ratos?. *Rev. Bras. Med. Esporte*, v. 16, n. 5, p. 368-372, 2010.

FLEGAL, K. M. et al. Prevalência e tendências na obesidade entre adultos nos Estados Unidos. *JAMA*, v. 288, p. 1723-1727, 2002.

FOOD STANDARDS AUSTRALIA NEW ZEALAND. Monosodium glutamate: a safety assessment. Canberra ACT, Australia: Food Standards Australia New Zealand, 2003.

FREEDMAN, D. S. et al. The relation of overweight to cardiovascular risk factors among children and adolescents: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics*, v. 103, p. 1175-1182, 1999.

FROST, H. M. et al. Tetracycline-based analysis of bone remodeling in osteoporosis. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v. 65, p. 203-217, 1969.

GAO, J. et al. Transplacental neurotoxic effects of monosodium glutamate on structures and functions of specific brain areas of filial mice. *Sheng Li Xue Bao*, v. 46, n. 1, p. 44-51, 1994.

GILSANZ, V. et al. Differential effect of gender on the sizes of the bones in the axial and appendicular skeletons. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 82, n.5, p. 1603-1607, 1997.

GORSKI, R. A. Sexual differentiation of the brain: a model for drug-induced alterations of the reproductive system. *Environ. Health Perspect.*, v. 70, p. 163-175, 1986.

HARMS, P. G.; OJEDA, S. R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J. Appl. Physiol.*, v. 36, n. 3, p. 391-392, 1974.

HEIMAN, M. L. et al. Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. *Endocrinology*, v. 138, n. 9, p. 3859-3863, 1997.

JEPSEN, K. J. Systems analysis of bone. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, v. 1, n. 1, p. 73-88, 2009.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. Tecido ósseo In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. 11. Ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 135-152.

KIM, B. et al. The structural and hormonal basis of sex differences in peak appendicular bone strength in rats. *J. Bone Miner. Res.*, v. 18, n. 1, p. 150 –155, 2003.

KOVÁCS, M. et al. Chronic administration of a new potent agonist of growth hormone- releasing hormone induces compensatory linear growth in growth hormone-deficient rats: mechanism of action. *Neuroendocrinology*, v. 64, n. 3, p. 169-176, 1996.

KOVÁCS, M. et al. Effects of continuous and repetitive administration of a potent analog of GH-RH(1-30)-NH₂ on the GH release in rats treated with monosodium glutamate. *J. Neuroendocrinol.*, v. 7, n. 9, p. 703-712, 1995.

KRISTOVA, V. V. et al. Early postnatal glutamate treatment results in altered vascular responsiveness to serotonin and noradrenaline in adult rats. *Endocr. Regul.*, v. 32, n. 3, p. 133-139, 1998.

KUZNETSOVA, E. G. et al. The effect of neonatal administration of monosodium glutamate on behavior and blood corticosterone level. *Ross. Fiziol. Zh. Im.*, v. 92, n. 6, p. 751-760, 2006.

LANDT, M. et al. Radioimmunoassay of rat leptin: sexual dimorphism reversed from humans. *Clin. Chem.*, v. 44, n. 3, p. 565-570, 1998.

LARSEN, P. J. et al. Neonatal monosodium glutamate treatment alters both the activity and the sensitivity of the rat hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J Endocrinol.*, v. 141, n. 3, p. 497-503, 1994.

LAZAR-ANTMAN, M. A.; LEET, A. Effects of obesity on pediatric fracture care and management. *J. Bone Joint Surg. Am.*, v. 94, n. 9, p. 855-861, 2012.

LOBSTEIN, T.; BAUR, L.; UAUY, R. Obesity in children and Young people: a crisis in public health. *Obes. Rev.*, v. 5, suppl. 1, p. 4-104, 2004.

LOVERIDGE, N. et al. Growth hormone and longitudinal bone growth in vivo: short-term effect of a growth hormone antiserum. *J. Endocrinol.*, v. 146, n. 1, p. 55-62, 1995.

MAITER, D. et al. Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. *Endocrinology*, v. 128, n. 2, p. 1100-1106, 1991.

MATSUZAWA, Y. Studies on reproductive endocrine function in rats treated with monosodium l-glutamate early in life. *Toxicol. Letters*, v. 4, n. 5, p. 359-371, 1979.

MCCARTHY, M. M. Hormones and the developing brain. *Adv. Mol. Cell Biol.*, v. 34, p. 259–279, 2004.

MCEWEN, B. S. et al. Role of fetoneonatal estrogen binding proteins in the associations of estrogen with neonatal brain cell nuclear receptors. *Brain Res.*, v. 96, n. 2, p. 400–406, 1975.

MELLO, W. G. et al. Effects of neonatal castration and androgenization on sexual dimorphism in bone, leptin and corticosterone secretion. *Bone*, v. 50, n. 4, p. 893-900, 2012.

MILLER, W. C. Diet composition, energy intake, and nutritional status in relation to obesity in men and women. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v. 23, n. 3, 280-4, 1991.

MISKOWIAK, B. et al. Long-term effect of neonatal monosodium glutamate treatment on reproductive system of the female rat. *Folia Morphol.*, v. 58, n. 2, p. 105-113, 1999.

MISKOWIAK, B.; LIMANOWSKI, A.; PARTYKA, M. Effect of perinatal administration of monosodium glutamate on the reproductive system of the male rat. *Endokrynol Pol.*, v. 44, n. 4, p. 497-505, 1993.

MOSLEY, J. R. Osteoporosis and bone functional adaptation: mechanobiological regulation of bone architecture in growing and adult bone, a review. *J. Rehabil. Res. Dev.*, v. 37, n. 2, p. 189-199, 2000.

OLNEY, J. W.; ADAMO N. J.; RATNER, A. Monosodium glutamate effects. *Science*. v. 172, n. 3980, p. 294, 1971.

OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*. v. 164, n. 3880, p. 719-721, 1969.

OLNEY, J. W.; SHARPE, L. G. Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science*, v. 166, 3903, p. 386-388, 1969.

ONIS, M; BLÖSSNER, M. Prevalence and trends of overweight among preschool children in developing countries. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 72, n. 4, p. 1032-1039, 2000.

ORENSANZ, L. M. et al. Sex differences in alpha adrenergic receptors in the rat brain. *Neurosci. Lett.*, v. 30, n. 3, p. 275-278, 1982.

PANAGIOTAROPOULOS, T. et al. Effect of neonatal handling and sex on basal and chronic stress-induced corticosterone and leptin secretion. *Neuroendocrinology*, v. 79, n. 2, p. 109–118, 2004.

PHOENIX, C. H. et al. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology*, v. 65, p. 369–382, 1959.

PINILLA, L. et al. Regulation of serum leptin levels by gonadal function in rats. *Eur. J. Endocrinol.*, v. 140, n. 5, p. 468-473, 1999.

REDDING, T. W. et al. Effect of monosodium glutamate on some endocrine functions. *Neuroendocrinology*, v. 8, n. 3, p. 245-255, 1971.

REID, I. R. Preventing glucocorticoid-induced osteoporosis. *N. Engl. J. Med.*, v. 337, n. 6, p. 420-421, 1997

RESELAND, J. E. et al. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of osteoblasts and promotes bone mineralization. *J. Bone Miner. Res.*, v.16, n.8, p. 1426-1433, 2001.

ROCCHINI, A. P. Childhood obesity and a diabetes epidemic. *N. Engl. J. Med.*, v. 346, n. 11, p. 854-5, 2002.

ROY, A. V. Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate. *Clin. Chem.* v. 16, n. 5, p. 431-436, 1970.

SAFFARI, F. et al. Metabolic syndrome in a sample of the 6-to 16-year old overweight or obese pediatric population : a comparison of two definitions. *Ther. Clin. Risk Manag.*, v. 8, p. 55-63, 2012.

SALAZAR, M. R. et al. Relationship among insulin resistance, obesity, diagnosis of the metabolic syndrome and cardio-metabolic risk. *Diab. Dis. Res.*, v. 8, n. 2, p. 109-16, 2011.

McMINN, J. E., et al. Leptin deficiency induced by fasting impairs the satiety response to cholecystokinin. *Endocrinology.* v. 141, n. 12, p. 4442-8, 2000.

SEEMAN, E. From density to structure: growing up and growing old on the surfaces of bone. *J. Bone Miner. Res.*, v. 12, n. 4, p. 509-521, 1997.

SEO, H. J. et al. Chronic administration of monosodium glutamate under chronic variable stress impaired hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in rats. *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, v. 14, n. 4, p. 213-221, 2010.

SIDDIQUI, A; GILMORE, D. P. Regional differences in the catecholamine content of the rat brain: effects of neonatal castration and androgenization. *Acta Endocrinol.*, v. 118, n. 4, p. 483-494, 1988.

TAKEDA, S. et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell.*, v. 111, n. 1, p. 305-317, 2002.

TANAKA, K. et al. Hypothalamic lesion induced by injection of monosodium glutamate in suckling period subsequent development of obesity. *Exp. Neurol.*, v. 62, n. 1, p. 191-199, 1978.

TANNER, J. M. et al. Relative importance of growth hormone and sex steroids for the growth at puberty of trunk length, limb length, and muscle width in growth hormone deficient children. *J. Pediatr.*, v. 89, n. 6, p 1000-1008, 1976.

TERANISHI, M. et al. Effects of neonatal administration of monosodium glutamate on bone in rats. *J. Toxicol. Pathol.*, v. 11, n. 3, p. 197-201, 1998.

TERASAWA, E.; FERNANDEZ, D. L. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr. Rev.*, v. 22, n.1, p. 111-151, 2001.

TURNER C. H.; BURR D. B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*, v. 14, n. 4, p. 595–608, 1993.

TURNER, R. T, et al. Differential effects of gonadal function on bone histomorphometry in male and female rats. *J. Bone Miner. Res.*, v. 4, n.4, p. 557-563, 1989.

VACCARI, A. Sexual differentiation of monoamine neurotransmitters. *In: Parves, H; PUYEZ, H. Biogenic amines in development. Amsterdam: Elsevier, 180. p. 327-352.*

VAN DER MEULEN, M. C.; JEPSEN, K. J.; MIKIC, B. Understanding bone strength: size isn't everything. *Bone*. v. 29, n. 2, p. 101-104, 2001.

VANDERSCHUEREN, D. et al. Androgens and bone. *Endocr. Rev.*, v. 25, n. 3, p. 389-425, 2004.

VECSEI, P. Glucocorticoids: cortical, corticosteronae and compounds. *In: JAFFE, B. M.; BERHMAN, H. R. Methods of hormone radioimmunoassay. New York: Academic Press, 1979. p. 767-792.*

VIAU, V. Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and -adrenal axes. *J. Neuroendocrinol.*, v. 14, n. 6, p. 506–513, 2002.

WAKABAYASHI, I. et al. Effects of neonatal administration of monosodium glutamate on plasma growth hormone (GH) response to GH-releasing factor in adult male and female rats. *Brain Res.*, v. 372, n. 2, p. 361-365, 1986.

WALKER, R.; LUPIEN, J. R. The safety evaluation of monosodium glutamate. *J. Nutr.*, v. 130, n. 4, p. 1049s-1052s, 2000.

WALLACH, S. et al. The bone quality problem. *Calcif. Tissue. Int.*, v. 51, n. 3, p. 169-172, 1992.

WATTS, N. Bone quality: getting closer to a definition. *J. Bone Miner. Res.*, v. 17, n. 7, p. 1148-1150, 2002.

WEISS, R. et al. Obesity and the syndrome metabolic in children and adolescents. *N. Eng. J. Med.*, v. 350, n. 23, p. 2362-74, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION Obesity and overweight. Fact Sheets <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>> acesso em 09 maio 2012.

YEH, J. K.; CHEN, M. M.; ALOIA, J. F. Effects of estrogen and growth hormone on skeleton in the ovariectomized rat with hypophysectomy. *Am. J. Physiol.*, v. 273, n. 4, p. E734-E742, 1997.

YORK, D. A. Lessons from animal models of obesity. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*, v. 25, n. 4, p. 781-800, 1996.

YU, W. H. et al. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 94, n. 3, p. 1023-1028, 1997.

ZEMEL, M. B. Role of calcium and dairy product in energy partitioning and weight management *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 79, n. 5, p. 907-912, 2004.

9 ANEXO



Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Efeitos a longo-prazo do tratamento neonatal com glutamato monossódico no dimorfismo sexual esquelético e secreção de leptina e corticosterona”, sob responsabilidade do Pesquisador **JOÃO CESAR BEDRAN DE CASTRO** e colaboração de Fabiano Silberschmidt Maia foi aprovado pelo CEUA.

CERTIFICATE

We certify that the reaserch “Long term effects of neonatal monosodium glutamate treatment on sexual dimorphism in bone development, leptin aon corticosterone secretion”, under the supervision of researcher **JOÃO CESAR BEDRAN DE CASTRO** and collaboration of Fabiano Silberschmidt Maia was approved by the CEUA.

A handwritten signature in black ink, enclosed within a thin black rectangular border. The signature is stylized and appears to be the name of the Vice-Coordinator.

Vice-Coordenador do CEUA
CEUA Vice-Coordinator