

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE – MESTRADO

BRUNA SCHUMAKER SIQUEIRA

**IMPACTO DA ESPLENECTOMIA ASSOCIADA À VAGOTOMIA SOBRE O
CONTEÚDO DE TECIDO ADIPOSEO E O CONTROLE SECRETOR DE INSULINA
EM RATOS WISTAR**

CASCAVEL-PR

Março/2019

BRUNA SCHUMAKER SIQUEIRA

**IMPACTO DA ESPLENECTOMIA ASSOCIADA À VAGOTOMIA SOBRE O
CONTEÚDO DE TECIDO ADIPOSEO E O CONTROLE SECRETOR DE INSULINA
EM RATOS WISTAR**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Saúde – Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Biologia, processo
saúde-doença e políticas de saúde.

ORIENTADORA: Dr^a Sabrina Grassioli
COORIENTADORA: Dr^a Sandra L. Balbo

CASCADEL-PR

Março/2019

FICHA CATALOGRÁFICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

BRUNA SCHUMAKER SIQUEIRA

IMPACTO DA ESPLENECTOMIA ASSOCIADA À VAGOTOMIA SOBRE O CONTEÚDO DE TECIDO ADIPOSEO E O CONTROLE SECRETOR DE INSULINA EM RATOS WISTAR

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: Prof. Dr^a _____
Sabrina Grassioli - UNIOESTE

Prof. Dr^a _____
Maria Lúcia Bonfleur - UNIOESTE

Prof. Dr^o _____
Everardo Magalhães Carneiro - UNICAMP

CASCADEL-PR

Março/2019

DEDICATORIA

Aos que acreditam na educação pública de qualidade, e aos que a tornam possível.

AGRADECIMENTOS

Nada seria de nós sem nossos ilustríssimos orientadores, logo os agradecimentos iniciais pelo desenvolvimento desse estudo vão para Dr^a Sabrina Grassioli, que me deu um voto de confiança e me acolheu, fez com que a oportunidade do mestrado não ficasse apenas nos sonhos. Agradeço a sua paciência em ler e reler aquilo que já foi escrito de muitas maneiras e deixar cada vez melhor. Também a Dr^a Sandra Balbo, pelos seus conselhos sábios, colaborações na elaboração do trabalho, sua disposição em ensinar e em operar tantos animais (rs), professoras exemplares e que não medem esforços para compartilhar aquilo que sabem da melhor maneira, possível ou impossível. Gostaria de estender aqui os agradecimentos as outras professoras do mestrado que participaram desse processo, e também a professora Henriette que foi extremamente importante na minha qualificação e também me ensinando com toda paciência e boa vontade do mundo técnicas que não conhecia. Logicamente devo agradecimentos a inúmeros dos meus colegas de laboratório sem os quais não teria aprendidos as “manhas” necessárias para executar da melhor maneira os protocolos e técnicas, vale citar alguns como a Carol, Carine, Dom, Jake, Vanessa, Zoe entre outros, pessoas essenciais que tornam a jornada do mestrado menos árdua. Vale aqui lembrá-los pela importância que tiveram para meu crescimento acadêmico e pessoal. Aos meus colaboradores de iniciação científica que trabalharam muito junto comigo nas coletas de dados e também no cuidado aos animais Juliana e Karol. Ao braço de direito de todo mestrando dentro do LAFEM a técnica de laboratório Sandrinha, uma pessoa gentil, prestativa e de bom coração. E por último e extremamente importante ao meu companheiro de vida Renato, que também se inseriu nessa jornada como se fosse dele próprio, colocando a mão na “massa” ou nas caixas de maravalha, ouvindo-me repetir inúmeras apresentações, fazendo perguntas e me ajudando a entender o que eu mesma explicava. A todos, o meu muito obrigada.

RESUMO

SIQUEIRA, B.S. **Impacto da esplenectomia associada à vagotomia sobre o conteúdo de tecido adiposo e o controle secretor de insulina em ratos wistar**. 66 páginas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2019.

O nervo vago (NV) exerce efeitos importantes na secreção de insulina induzida por glicose (SIIG) e no metabolismo, um evento que pode envolver a atividade esplênica. Neste trabalho, avaliamos o efeito da vagotomia (VAG) associada ou não à esplenectomia (ESP) no metabolismo e na secreção de insulina de ratos Wistar machos. Aos 60 dias os ratos foram submetidos às cirurgias VAG, ESP, VAG+ESP ou falso operados (FO) (n = 17 ratos / grupo). Aos 149 dias, foram submetidos a teste de tolerância à glicose. O peso corporal, ingesta alimentar, peso dos depósitos de gordura, e os parâmetros bioquímicos a partir da coleta de plasma sanguíneo foram aferidos e avaliados. Além disso, as ilhotas pancreáticas foram isoladas para avaliar a SIIG, respostas autonômicas e expressão do subtipo 3 do receptor muscarínico (mAChR3) e da proteína quinase c (PKC α), realizamos a análise histológica do pâncreas e também o registro da atividade neural do NV. Foi utilizado para análise estatística Anova de duas vias, com pós-teste Tukey (p <0,05). A VAG levou a redução no peso corporal, aumentou o consumo, implicando em menor eficiência alimentar. Reduziu depósitos de tecido adiposo branco, efeito que foi atenuado no grupo VAG+ESP. A ESP reduziu a glicemia e melhorou o índice HOMA sem alterar a tolerância à glicose, já a VAG diminuiu os triglicerídeos, melhorando o índice de TyG, em contraste com o aumento nos níveis de colesterol. A SIIG foi reduzida no grupo VAG+ESP. Na presença de agonista colinérgico, a ESP potencializou o efeito inibitório da VAG reduzindo ainda mais a SIIG, sem alterar a expressão do mAChR3. Apenas a VAG alterou a expressão de PKC α levando à redução na expressão da proteína nos grupos VAG e VAG+ESP. A ESP teve efeitos reduzindo a atividade neural do vago, nos animais ESP e VAG+ESP. Além disso, a ESP aumentou o efeito inibitório da oximetazolina na redução de SIIG nos grupos ESP e VAG+ESP. Em resumo, este estudo mostrou que a ESP pode atenuar o efeito lipolítico da VAG sem impedir os efeitos vagais no metabolismo, crescimento e ingestão de alimentos. Além disso, a VAG associado ao ESP reduziu a SIIG, mas apenas o ESP diminuiu o efeito colinérgico e a atividade do NV, sem alterar a expressão de mAChR3 ou PKC α em ilhotas pancreáticas isoladas, sugerindo o papel potencial do baço na modulação do fluxo neural autonômico.

Palavras chave: nervo vago; baço; Ilhota pancreática; insulina.

ABSTRACT

SIQUEIRA, B.S. **Impact of splenectomy associated with vagotomy on adipose tissue content and insulin secretory control in wistar rats.** 66 pages. Dissertation (Master's). Postgraduate Program in Biosciences and Health, Center for Biological and Health Sciences, Cascavel Campus, Unioeste, 2019.

The vagus nerve (VN) exerts important effects on glucose-induced insulin secretion (GIIS) and on metabolism, an event that may involve splenic activity. In this work, we evaluated the effect of vagotomy (VAG) associated or not to splenectomy (SPL) on the metabolism and insulin secretion of male Wistar rats. At 60 days the rats were submitted to VAG, SPL, VAG+SPL or false operated (SHAM) surgeries (n =17 rats /group). At 149 days, they were submitted to glucose tolerance test. Body weight, dietary intake, weight of fat deposits, and biochemical parameters from the collection of blood plasma were assessed and evaluated. In addition, pancreatic islets were isolated to evaluate GIIS, autonomic responses and expression of muscarinic receptor subtype 3 (mAChR3) and protein kinase c (PKC α), we performed the histological analysis of the pancreas and also recorded VN neural activity. Anova two-way analysis, with Tukey post-test (p <0.05). VAG led to reduction in body weight, increased consumption, implying lower feed efficiency. Reduced deposits of white adipose tissue, an effect that was attenuated in the VAG+SPL group. SPL reduced blood glucose and improved HOMA index without altering glucose tolerance, and VAG decreased triglycerides, improving TyG, in contrast to increased cholesterol levels. The GIIS was reduced in the VAG+SPL group. In the presence of a cholinergic agonist, SPL potentiated the inhibitory effect of VAG, further reducing GIIS, without altering mAChR3 expression. Only the VAG altered the expression of PKC α leading to the reduction in protein expression in the VAG and VAG+SPL groups. SPL had effects reducing the neural activity of the vagus in SPL and VAG+SPL animals. In addition, SPL increased the inhibitory effect of oxymetazoline on the reduction of GIIS in the SPL and VAG+SPL groups. In summary, this study showed that SPL can attenuate the lipolytic effect of VAG, without impeding the vagal effects on metabolism, growth and food intake. In addition, VAG associated with SPL reduced GIIS, but only SPL decreased cholinergic effect and VN activity, without altering the expression of mAChR3 or PKC α in isolated pancreatic islets, suggesting the potential role of the spleen in modulating neural flow autonomic.

Keywords: vagus nerve; spleen; pancreatic islets; insulin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Esquema de sinalização da secreção de insulina pela célula β (AHRÉN, 2000).....	22
Figura 2 Comunicação do SNA e Baço (HUSTON et al., 2006)	29

LISTA DE ABREVIATURA

A7nAChR: Receptor nicotínico alfa 7

ACh: Acetilcolina

AcetilCoA: Acetil Coenzima A

ADP: Adenosina Difosfato

Ampc: Adenosina 3-5-monofosfato cíclico

ATP: Adenosina Trifosfato

CCh: Carbacol

DAG: Diacilglicerol

DM1: Diabetes Mellitus do tipo 1

DM2: Diabetes Mellitus do tipo 2

ESP: Esplenectomia

FADH2: Flavina Adenina Dinucleotídeo

FO: Falso-Operado

G6P: Glicose-6-fosfato

GLUT 2: Transportador de glicose do tipo 2

GLUT 4: Transportador de glicose subtipo 4

IFN- γ : Interferon gama

IL1: Interleucina 1

IL 2: Interleucina 2

IL 4: Interleucina 4

IL 6: Interleucina 6

IL 10: Interleucina 10

IL12: Interleucina 12

IP3: Inositol 1-4-5-trifosfato

K⁺: Potássio (íon)

LAFEM: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo

LPS: Lipopolissacarídeos

M: Muscarínico

M3: Receptores muscarínicos subtipo 3

MSG: Glutamato monossódico

N: Nicotínico

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NE: Norepinefrina

NV: Nervo vago

Oxy: Oximetazolina

PKA: Proteína quinase A

PKC: Proteína quinase C

PLA2: Fosfolipase A2

PLC: Fosfolipase C

RI: Resistência à Insulina

SNA: Sistema Nervoso Autônomo

SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: Sistema Nervoso Parassimpático

SNS: Sistema Nervoso Simpático

SIIG: Secreção de Insulina Induzida por Glicose

TNF- α : Fator de necrose tumoral- α

TyG: Índice Triglicerídeos e Glicose

UNIOESTE: Universidade Estadual do Oeste do Paraná

VAG: Vagotomia

VAG+ESP: Vagotomia e esplenectomia

VMH: Ventro-medial Hipotalâmica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 Nervos Vago	18
3.2 Nervos Vago e o pâncreas endócrino	19
3.3 A relação entre o baço e o pâncreas	25
3.4 Nervos Vago e atividade Esplênica	28
5 REFERENCIAS	31
ARTIGO CIENTÍFICO	36
FIGURES AND TABLES	56
ANEXO A: Autorização do CEUA	64

1. INTRODUÇÃO

A homeostase energética resulta do equilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético, processo intensamente regulado pelo Sistema Nervoso Autônomo (SNA). Sendo esse composto por duas subdivisões, o Sistema Nervoso Simpático (SNS) e o Sistema Nervoso Parassimpático (SNP), ambos com ações modulatórias, frequentemente antagônicas sobre a maioria das funções fisiológicas, como o controle das funções digestivas, do sistema cardiovascular, do sistema respiratório, bem como a regulação de grande parte das secreções e mecanismos metabólicos (CORK, 2018; MASI; VALDÉS-FERRER; STEINBERG, 2018; ROHNER-JEANRENAUD; HOCHSTRASSER; JEANRENAUD, 1983; SCOMPARIN et al., 2009; WANG et al., 2003).

A subdivisão parassimpática exerce um efeito importante na função visceral digestiva e secretória (BERTHOUD, 2008; GILON; HENQUIN, 2001). O nervo vago (NV), X par craniano, inerva grande parte do trato digestivo (do esôfago à metade do intestino grosso), além de importantes órgãos para o metabolismo, tais como o fígado e o pâncreas. Deste modo, a ativação dos neurônios vagais e a consequente liberação do seu principal neurotransmissor, Acetilcolina (ACh), têm marcantes efeitos sobre a proliferação das células pancreáticas e na secreção de insulina (CHEN et al., 2018; GILON; HENQUIN, 2001; JI et al., 2014; KIBA et al., 1996)

Interessantemente, o NV é um nervo misto, no qual o componente aferente conduz importantes informações periféricas para o Sistema Nervoso Central (SNC) que acabam modulando o eixo hipotálamo-hipófise, a ingestão alimentar e o gasto energético, além da participação no reflexo imunológico. (BERTHOUD, 2008; LUBACZEUSKI et al., 2015; ROHNER-JEANRENAUD; HOCHSTRASSER; JEANRENAUD, 1983; SHIKORA et al., 2013; YAMATANI et al., 1998).

Nesse sentido, uma das importantes respostas regulatórias vagais

acontece na sinalização pancreática, sendo a inervação vagal responsável pela proliferação celular, bem como sobre a secreção de insulina pela célula β em condições estimulatórias de glicose (GILON; HENQUIN, 2001; KIBA et al., 1996).

As células β pancreáticas atuam como sensores da concentração plasmática de nutrientes, em particular da glicose, gatilho para secreção de insulina, podendo ser modulada, por exemplo, pela administração de agonista colinérgico carbacol (CCh). Em camundongos, isso leva à hiperinsulinemia e consequente queda na glicemia sanguínea, logo, quando realizado o bloqueio colinérgico com atropina nesses animais, houve supressão dessa resposta ao CCh (LUNDQUIST, 1982).

Corroborando essa ideia, a estimulação elétrica do NV em situação inflamatória aguda também levou ao aumento na secreção de insulina acompanhada de redução de carboidratos no sangue (SAKAGUCHI; YAMAGUCHI, 1980). A ação da ACh nas células β pancreáticas tem, portanto, um efeito de ampliar e complementar a secreção de insulina, isso acontece pela ligação da ACh a receptores muscarínicos do subtipo 3 (M3) presentes no tecido pancreático (AHRÉN, 2000; BOSCHERO et al., 1995; GAUTAM et al., 2007; GILON; HENQUIN, 2001).

Desarranjos autonômicos, que levam a alterações no controle da secreção de insulina induzida por glicose (SIIG), são percebidos em alguns modelos de animais. Em animais que foram submetidos à situação de hiperglicemia prolongada (infusão de glicose durante 48 horas), a atividade simpática se mostrou reduzida e a parassimpática aumentada, logo, ao fim da infusão de glicose e também seis horas após a infusão. A secreção de insulina desses animais em resposta à sobrecarga de glicose após 6 horas da infusão foi drasticamente aumentada nos animais submetidos à hiperglicemia prolongada, entretanto, essa hipersensibilidade da célula β em animais que passaram pela infusão foi atenuada tanto pela secção do NV, vagotomia (VAG), quanto pela administração de agonista colinérgico oxymetasolina (Oxy) (N'GUYEN et al., 1994).

Resultado semelhante foi observado em animais obesos hipotalâmicos que também apresentam hiperatividade parassimpática, resultando em hiperinsulinemia, resistência à insulina e tolerância à glicose. A VAG nesses animais reduz a hiperinsulinemia e melhora a tolerância glicose (BALBO et al.,

2007). Neste mesmo modelo, Lubaczeuski *et al.* (2015) observaram redução em depósitos de gordura e melhora na homeostase glicêmica dos animais com VAG, acompanhada de redução da ingesta alimentar e na SIIG.

Em humanos, o bloqueio vagal intermitente também já foi realizado por meio de equipamento, que regula a sinalização na região abdominal, implantado em portadores de obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (DM2), apresentou efeitos na redução do peso corporal e controle glicêmico além da redução na pressão arterial (SHIKORA *et al.*, 2013).

O papel da atividade vagal na modulação das vias anti-inflamatórias tem surgido nas últimas décadas como um possível elo entre sistema imunológico e metabolismo endócrino. Diferentes autores têm demonstrado que o NV poderia modular aspectos da resposta inflamatória, efeito anteriormente atribuído apenas à subdivisão do SNS, podendo afetar órgãos importantes para manutenção da homeostase metabólica como pâncreas endócrino e fígado (EDVELL; LINDSTRÖM, 1998; HUSTON *et al.*, 2006; JI *et al.*, 2014; ROSAS-BALLINA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2010).

Assim, importante ação anti-inflamatória vagal é observada em situações como a sepse, na qual o estímulo vagal reduz a produção de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) no plasma, acompanhada de diminuição na expressão hipotalâmica do RNA mensageiro para IL-6, melhorando o quadro inflamatório (SCHWEIGHÖFER *et al.*, 2016). Similarmente, ativação elétrica do NV em situação inflamatória aguda resulta em redução sérica de IL-6, TNF- α e redução no número de células inflamatórias no pulmão e baço (YAMAKAWA *et al.*, 2013).

A estimulação do NV também aumenta a produção de ACh no baço, esse mecanismo descrito na literatura ocorre por meio de um estímulo nervoso para células T residentes no baço que são capazes de produzir a ACh. Os autores defendem que sinais colinérgicos oriundos do NV, ao atingir o gânglio celíaco e mesentérico superior, comunicam-se com neurônios agora simpáticos e via nervo esplênico ativam linfócitos T produtores de ACh no baço, via receptor alfa 7 nicotínico ($\alpha 7nAChR$) diminuindo a produção de TNF- α (HUSTON *et al.*, 2006; ROSAS-BALLINA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2003).

A participação do baço na ação anti-inflamatória vagal vem sendo amplamente explorada, pois trata-se de um órgão que participa ativamente na

resposta inflamatória, ora cedendo células que migram do baço para atuar em tecidos que sofreram lesão, ora através de sinalizadores e citocinas anti-inflamatórias (BRONTE; PITTET, 2013; DRAGOMIR et al., 2016; GOTOH et al., 2017; WU et al., 2014)

Curiosamente alterações esplênicas também estão envolvidas no risco de desenvolver doença relacionadas ao metabolismo endócrino e lipídico. Pacientes submetidos à esplenectomia apresentaram risco duas vezes maior em desenvolver DM2, além disso, em pacientes portadores de esteatose hepática não alcoólica foi observada esplenomegalia e aumento nas concentrações plasmáticas de IL-6 (DRAGOMIR et al., 2016; TARANTINO et al., 2011; WU et al., 2014).

A partir disso, buscamos explorar a possível interação bi-direcional entre NV e resposta esplênica, seus efeitos sobre o metabolismo e pâncreas endócrino. Alguns estudos têm demonstrado haver efeitos do baço sobre o pâncreas endócrino. Dados de Wang et al., (2010) mostraram que a esplenectomia (ESP) em Camundongos com alinfoplasia reduz a expressão de células CD4 T, CD8 T e linfócitos B no tecido pancreático, sugerindo que a esplenectomia neste caso ameniza a pancreatite por meio da redução do infiltrado inflamatório.

Em ratos Wistar, a introdução de dieta rica em gordura em animais esplenectomizados resultou em prejuízo da função pancreática. Nesse estudo de Gotho et al. (2012), mostraram efeito direto da ESP sobre o pâncreas endócrino, na ausência do baço, houve agravamento da resposta inflamatória pancreática a dieta rica em gordura. Esses autores também observaram maior deposição de gordura na forma de triglicerídeos após ESP, com elevação da produção de sinalizadores pró-inflamatórios capazes de desenvolver pancreatite e disfunção pancreática, além de hipertrofia e fibrose das ilhotas. Para esses pesquisadores, a ausência de Interleucina10 (IL10), importante citocina anti-inflamatória, cuja fonte principal seria o tecido esplênico, estaria envolvida nestes efeitos.

Em humanos, a retirada do baço também mostrou efeitos que confirmam a importância do órgão para manutenção da atividade imunológica, pois, após a esplenectomia, observaram aumento na susceptibilidade a diversas patologias como complicações vasculares, hipertensão pulmonar e sepse (BRONTE;

PITTET, 2013; DRAGOMIR et al., 2016; GOTOH et al., 2017).

O baço ainda é considerado fonte de células-tronco que podem se diferenciar em ilhotas pancreáticas dentre outros subtipos celulares, essa ação é induzida por lesões que ocorrem no tecido alvo, que induz as células-tronco esplênicas da linhagem Hox11 a regularem fatores de transcrição embrionários e migrarem para lesão fazendo essa substituição celular (FAUSTMAN; DAVIS, 2010).

Recentemente, Shimojo et al., (2019) mostraram, em animais com endotoxemia, que a resposta anti-inflamatória vagal que ocorre durante o tratamento com exercício físico depende da presença do baço, atenuando a produção de TNF α , esse efeito não ocorreu nos animais esplenectomizados.

Assim, nosso objetivo é esclarecer se há ligação funcional entre a resposta esplênica e o pâncreas endócrino, cujo principal mediador possa ser o NV via ACh.

A atividade autonômica sendo moduladora da resposta imunológica do baço por uma via que ainda não é totalmente conhecida pode vir a esclarecer alguns pontos desta ligação (HUSTON et al., 2006).

Considerando esses achados, avaliamos a influência da VAG associada ou não à ESP sobre o controle secretor de insulina pelo pâncreas endócrino.

Estabelecer se existe influência do NV via baço sobre a função endócrina pancreática abre novos caminhos para o entendimento de patologias, tais como o diabetes, cujo processo inflamatório com perda da liberação de insulina resulta em rompimento da homeostase glicêmica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto da esplenectomia (ESP) associada à vagotomia (VAG) no controle secretor de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos Wistar machos.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer se a VAG e/ou ESP modificam o peso corporal, a ingestão alimentar, o crescimento e a adiposidade em ratos Wistar adultos;
- Comparar a influência da VAG e/ou ESP sobre os parâmetros plasmáticos de jejum, glicemia, insulina, triglicerídeos e colesterol total em ratos Wistar adultos;
- Investigar se a VAG e/ou ESP modificam a Tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina em ratos Wistar adultos;
- Estabelecer se a secreção de insulina induzida por glicose, bem como o efeito colinérgico insulinoatrópico são modificados pela VAG e/ou ESP em ratos Wistar adultos;
- Avaliar o impacto da VAG e/ou ESP sobre a histomorfometria do pâncreas endócrino e a expressão dos receptores muscarínicos subtipo 3 e suas vias em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos Wistar adultos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Nervo Vago

Responsável pelo controle de diversas funções corporais, o SNP é parte do SNA juntamente ao SNS. Ambas as subdivisões funcionam por meio de reflexos viscerais que aferem aos centros regulatórios situados no hipotálamo, medula espinal ou tronco cerebral, para retornar como respostas eferentes vegetativas, que resultam na manutenção da homeostase corporal (MASI; VALDÉS-FERRER; STEINBERG, 2018; MESSINA et al., 2013; N'GUYEN et al., 1994).

As respostas eferentes autonômicas dependem da liberação dos neurotransmissores e da presença de receptores específicos nos tecidos. O principal neurotransmissor liberado pelos terminais neurais vagais é a acetilcolina (ACh), que age em receptores muscarínicos (M) ou nicotínicos (N), já nos terminais simpáticos, a norepinefrina (NE) atua via receptores adrenérgicos do tipo alfa ou beta (NANCE; SANDERS, 2007).

O NV – X par craniano - é o principal ramo de inervação parassimpática, suas fibras têm origem no tronco encefálico e descendem para inervar as vísceras por dois ramos principais: anterior e posterior, que se dividem novamente em quatro ramos: hepático, celíaco, gástrico anterior e gástrico posterior (LEGROS; GRIFFITH, 1969). Sendo o gânglio celíaco responsável pela inervação das principais vísceras abdominais como: intestino, fígado, pâncreas e ainda participar na inervação para o baço. As funções dessa sinalização eferente são responsáveis pela manutenção da homeostase juntamente às aferências vagais (JI et al., 2014; ROSAS-BALLINA et al., 2011; SHARKEY; WILLIAMS; DOCKRAY, 1984).

As aferências vagais são fontes de informação para o SNC essenciais

para controle dos centros de saciedade e fome, respostas inflamatórias, controle do metabolismo endócrino e lipídico (BERTHOUD, 2008; LUBACZEUSKI et al., 2015; ROHNER-JEANRENAUD; HOCHSTRASSER; JEANRENAUD, 1983; YAMATANI et al., 1998).

Camundongos obesos por dieta, mutados para ausência do receptor N, $\alpha 7nAChR$, apresentaram maior acúmulo de lipídios no fígado, acompanhado de esteatose e fibrose hepática, além do comprometimento na via de sinalização da insulina e infiltrado inflamatório hepático, esses efeitos foram suprimidos quando realizada a ativação farmacológica do receptor N, confirmando a importância da sinalização colinérgica na proteção do organismo contra doença gordurosa não alcoólica no fígado (LI et al., 2018).

O controle da fome e saciedade, por exemplo, é extremamente dependente da integridade dessa sinalização, pois sinais oriundos do trato digestivo responsáveis pelo controle da ingesta alimentar trafegam via NV para centros de controle hipotalâmicos e retornam como eferências para diversos órgãos que participam na manutenção da homeostase, como o pâncreas endócrino (CORK, 2018).

Neste sentido, a insulina produzida por células β no pâncreas é um importante hormônio para a manutenção da homeostase glicêmica, e a inervação vagal tem potentes efeitos na proliferação dessas células, bem como sobre a sua secreção, além de alterar a sensibilidade periférica a insulina (BALBO et al., 2007; EDVELL; LINDSTRÖM, 1998; GILON; HENQUIN, 2001; KIBA et al., 1996).

3.2 Nervos Vago e o pâncreas endócrino

O pâncreas é uma glândula mista, tendo efeitos sobre a digestão de lipídios, carboidratos e gorduras, além de contribuir para a homeostase desses elementos após a absorção. O tecido pancreático apresenta um componente exócrino, os ácinos, responsáveis pela produção do suco pancreático, e um componente endócrino, as ilhotas pancreáticas, responsáveis pela produção de dois principais hormônios, a insulina e o glucagon (MONTENEGRO; CHAVES;

FERNANDES, 2016).

As ilhotas pancreáticas que caracterizam o pâncreas endócrino são compostas pelo agrupamento de pelo menos três tipos celulares principais: as células alfa, secretoras de glucagon, as quais correspondem a 10% da ilhota, as células delta que secretam somatostatina, e correspondem a 5% da ilhota, e mais expressivamente, 80% da ilhota composta por células β responsáveis pela secreção de insulina (GILON; HENQUIN, 2001).

As células β pancreáticas atuam como sensores da concentração plasmática de nutrientes em particular da glicose. A glicose é o principal sinalizador da via de produção da insulina. Quando os níveis circulantes de glicose aumentam, a glicose atravessa a membrana das células β , com auxílio de um transportador de glicose, esse transportador possui diferentes subtipos que são distribuídos conforme a especificidade dos tecidos, por exemplo, em tecidos insulino-dependentes como músculo e tecido adiposo observamos o transportador de glicose do tipo 4 (GLUT 4), já em tecidos que não dependem da insulina para realizar a internalização da glicose como pâncreas e tecido hepático temos o subtipo 2 (GLUT2) (BELL et al., 1990).

Uma vez no citosol da célula β , a glicose sofrerá ação da enzima glicoquinase, resultando em Glicose-6-fosfato (G6P), grande parte dessa G6P segue pela via da glicólise, formando piruvato que dentro da mitocôndria sob ação da enzima Piruvato Desidrogenase gera Acetil-Coenzima A (AcetilCoA). O AcetilCoa, via ciclo do Ácido Tricarboxílico leva a formação de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH) e Flavina Adenina Dinucleotídeo (FADH₂), os quais serão os carreadores de elétrons para a Fosforilação Oxidativa culminando em síntese de Adenosina Trifosfato (ATP). O ATP mitocondrial é transportado para o citosol da célula β promovendo a elevação da razão ATP em relação à adenosina difosfato (ADP) ATP/ADP. A célula β apresenta em sua membrana plasmática canais de Potássio (K⁺) regulados por ATP (K⁺-ATP). Portanto, o aumento do ATP intracelular promove o fechamento destes canais K⁺-ATP, impedindo efluxo de K⁺, resultando em despolarização da membrana e abertura de canais de Cálcio (Ca⁺²) voltagem dependentes, gerando elevação do Ca⁺² citosólico. Este evento ativa a maquinaria exocitótica e resulta em secreção de vesículas contendo insulina. (ASHCROFT, 2006; BOSCHERO, 1996; HABER et al., 2001).

A secreção de insulina induzida por glicose (SIIG) é modulada pela ação de agentes potencializadores e inibidores, garantindo concentrações plasmáticas de insulina, apropriadas à demanda fisiológica. Deste modo, o controle glicêmico é realizado por intrincadas relações metabólicas com estreita relação com o SNA em particular com a via colinérgica vagal (HABER et al., 2001)

As ilhotas pancreáticas são densamente inervadas pelos terminais vagais, sendo a ACh o mais importante agente insulínico de origem neural (GILON; HENQUIN, 2001).

A ação da ACh nas células β pancreáticas de roedores depende da presença de receptor M, subtipo 3 (M3). A não expressão de M3 na ilhota pancreática de camundongos provoca queda na liberação de insulina e prejuízo na tolerância a glicose (GAUTAM et al., 2007).

A associação da ACh ao M3 estimula a proteína G, tipo Go/i, resultando em ativação isoformas da fosfolipase C (PLC) a qual, via degradação de fosfoinosídeos de membrana, promove a formação de diacilglicerol (DAG) e inositol 1-4-5 trifosfato (IP3), dois segundos mensageiros celulares. O IP3, ao se ligar em receptores do retículo endoplasmático, libera Ca^{+2} de depósitos intracelulares para o citosol, enquanto DAG ativa a proteína quinase C (PKC), que fosforila elementos do citoesqueleto. Ambos os processos modificam a maquinaria exocitótica, favorecendo a migração, a fusão e a liberação de grânulos contendo insulina. (AHRÉN, 2000; BOSCHERO et al., 1995; GILON; HENQUIN, 2001) (Figura 1).

Adicionalmente a ACh, via receptor nicotínico parece promover despolarização parcial da membrana, ativando canais de Na^{+} que ajudam a manter o acréscimo intracelular de Ca^{+2} , e também por intermédio da fosfolipase A2 (PLA2) capaz de estimular a geração ácido araquidônico, que também podem participar na exocitose de vesículas de insulina (KONRAD et al., 1992).

Diversos estudos têm explorado a importância da inervação vagal para o pâncreas endócrino e o controle adequado da liberação de insulina, com decorrente impacto sobre a homeostase glicêmica. Além disso, muitas condições de rompimento do metabolismo são caracterizadas por desajuste da atividade vagal (BALBO et al., 2007; SHIKORA et al., 2013; SILVA et al., 2012)

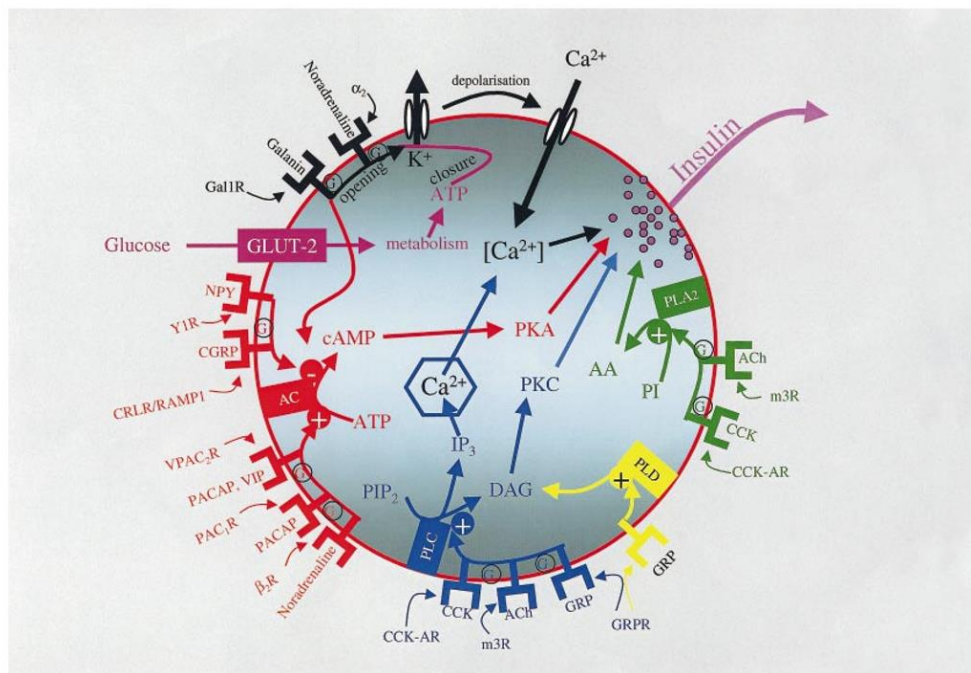


Figura 1. Esquema de sinalização da secreção de insulina pela célula β .

Imagem extraída do artigo de Ahrén, (2000), ilustrando a ativação da maquinaria excitatória da célula beta com ênfase nas vias reguladas pela sinalização parassimpática.

Em estudo realizado por Lundquist, (1982), a administração de agonista colinérgico como CCh, ACh e pilocarpina em camundongos levou à hiperinsulinemia e consequente queda na glicemia sanguínea, de modo dose-dependente, logo, o bloqueio colinérgico realizado com atropina neste caso suprimiu essa resposta ao CCh impedindo a hiperinsulinemia.

Para isolar o efeito da ação parassimpática, concentrações plasmáticas de insulina e glicose foram testadas em ratos com ausência das adrenais. Neste caso, a VAG pancreática diminuiu a insulina plasmática, e a estimulação vagal elétrica do ramo pancreático aumentou a secreção de insulina e reduziu carboidratos no sangue (SAKAGUCHI; YAMAGUCHI, 1980).

N'guyen *et al.* (1994) mostraram a participação do tônus parassimpático em ratos Wistar submetidas à infusão de glicose durante 48 horas. Nesta condição de hiperglicemia prolongada, ocorre aumento do tônus vagal. Quando realizado teste de tolerância a glicose após 6 horas da infusão, animais que

foram submetidos à situação de hiperglicemia prolongada apresentaram hipersensibilização da ilhota pancreática, possivelmente causada pela elevação do tônus parassimpático, pois quando realizada a VAG nesses animais esse efeito foi atenuado, assim como quando realizada a administração de agonista adrenérgico Oxymetasolina (Oxy).

A hiperatividade vagal também é responsável pela hiperinsulinemia em alguns modelos de obesidade, em animais com obesidade por lesão hipotalâmica por glutamato monossódico (MSG) ela leva a intolerância à glicose e a resistência à insulina. A VAG, nesses animais, resulta em melhora na insulina em jejum e na tolerância à glicose (BALBO et al., 2007).

Em ratos Wistar, geneticamente obesos, foi demonstrado que existe um desequilíbrio precoce na regulação dos eixos aferentes e eferentes vagais, onde sinais eferentes oriundos do NV para o pâncreas não são controlados pelos sinais aferentes supressores do ramo hepático vagal. Este desajuste entre aferências e eferências resulta em hipersecreção de insulina e RI (YAMATANI et al., 1998).

Em humanos, o bloqueio vagal intermitente também foi eficaz, realizado por meio de equipamento que regula essa sinalização na região abdominal, implantado em portadores de obesidade e DM2, apresentou efeitos na redução do peso corporal e controle glicêmico, além da redução na pressão arterial (SHIKORA et al., 2013).

O NV também regula a proliferação das células β pancreáticas. Em animais com lesão hipotalâmica ventromedial (VMH) ocorre hiperatividade vagal, e maior proliferação de células β pancreáticas, bem como das células acinares no pâncreas, um evento bloqueado pela VAG. Neste modelo, a VAG também reduz a insulina plasmática e o consumo alimentar, resultando em perda de peso (KIBA et al., 1996). Similares resultados foram obtidos em animais geneticamente obesos submetidos à VAG, tais como o ratos Zucker (fa/fa) e o camundongo ob/ob (EDVELL; LINDSTRÖM, 1998).

Interessantemente, os efeitos vagais sobre o pâncreas têm uma importante via aferente. Neste sentido, estudo realizado com animais Sprague-Dawley submetidos a VAG subdiafragmática aos 10, 30 e 60 dias foi observado diminuição drástica na sinalização aferente vagal e enfraquecimento da sinalização sináptica para o NTS, este efeito desencadeia a remodelação

transitória dos terminais aferentes vagais, as quais parecem ser reestabelecidas aos 60 dias após a cirurgia. Segundo os autores, visto que o NTS é importante regulador da ingesta alimentar, isso pode explicar, mesmo que parcialmente, os efeitos na perda de peso em pacientes pós-bariátricos submetidos à técnica bypass gástrico (PETERS et al., 2013).

A influência do NV sobre o metabolismo é evidente. Todavia, estudos têm relacionado a atividade parassimpática à atividade esplênica, explorando principalmente seu efeito anti-inflamatório, que, em algumas situações, podem afetar o pâncreas endócrino e parecem estar relacionados a uma via de comunicação entre sistema imune e metabolismo endócrino (HUSTON et al., 2006; JI et al., 2014; ROSAS-BALLINA et al., 2011; WANG et al., 2010).

O risco de desenvolvimento de diabetes mellitus (DM) do tipo 2 (DM2), doença relacionada a problemas na secreção ou produção de insulina pelo pâncreas, já se mostrou aumentado em indivíduos esplenectomizados, além disso, em animais obesos foi demonstrado que a retirada do baço pode reduzir a secreção de insulina (LEITE et al., 2015; WU et al., 2014).

Disfunções autonômicas e inflamação estão presentes também no diabetes mellitus tipo 1 (DM1). Redução da inervação autonômica e paralelo aumento do processo inflamatório têm sido observados na progressão da morte de células β pancreáticas em modelos de DM1, agonistas nicotínicos reduzem a incidência do DM1 em roedores por modular o balanço das respostas inflamatórias pancreáticas, alterando o perfil de citocinas de Th1 (pró-inflamatórias) para Th2 (anti-inflamatórias) (MABLEY et al., 2002)

Estudo recente de Gupta *et al.* (2018) revelou que os mesmos receptores colinérgicos esplênicos $\alpha 7nACh$, são responsáveis pela sobrevivência e pelos efeitos anti-inflamatórios nas células β pancreáticas de ratos DM1.

Deste modo, há indícios de que uma interação bidirecional SNA-baço possa ter repercussões sobre o pâncreas endócrino alterando a secreção de insulina.

3.3 A relação entre o baço e o pâncreas

O baço é um órgão que pertence ao sistema linfático e imunológico, sua função consiste na remoção de células danificadas da circulação e seu papel na resposta imunológica não está em apenas capturar antígenos, mas também em iniciar a resposta inflamatória (BRONTE; PITTET, 2013).

Três regiões do baço são descritas na literatura: a polpa vermelha, que abriga um grande número de macrófagos, a polpa branca que contém linfócitos B e T e a zona marginal, que abriga linfócitos B, células dendríticas e macrófagos (BRONTE; PITTET, 2013; GUYTON; HALL, 2011; TARANTINO et al., 2011).

Por seu intenso papel imunológico, o baço em condições fisiológicas normais exerce importantes efeitos para a resposta inflamatórias, seja como fonte de células inflamatórias que migram do baço para o tecido, ou através de sinalizadores e citocinas anti-inflamatórias. Além disso a retirada do baço em humanos, favorece a susceptibilidade a diversas patologias relacionadas inclusive ao metabolismo endócrino, como complicações vasculares, hipertensão pulmonar e DM2 (BRONTE; PITTET, 2013; DRAGOMIR et al., 2016; GOTOH et al., 2017; WU et al., 2014).

Alteração esplênica, também foi percebida em doença relacionada ao metabolismo lipídico, sendo que o aumento do órgão, chamada de esplenomegalia, foi observada em pacientes portadores de esteatose hepática não alcoólica, bem como aumento nas concentrações plasmáticas de fator inflamatório IL-6 (TARANTINO et al., 2011).

Entretanto, ao avaliar o efeito do baço sobre o desenvolvimento de pancreatite aguda em camundongos com alinfoplasia, após esplenectomia, a expressão de células CD4 T, CD8 T e linfócitos B no tecido pancreático reduziram em comparação aos falso operados, sugerindo que a esplenectomia pode amenizar a pancreatite através da redução do infiltrado inflamatório nesse caso (WANG et al., 2010).

Interessantemente, na obesidade são observadas alterações esplênicas

que podem explicar o desequilíbrio do controle inflamatório do baço, e seu possível impacto negativo sobre o metabolismo. Em ratos Sprague Dawley, alimentados com dieta hiperlipídica ocorreu aumento no volume do baço, caracterizado pela dilatação em sinusóides esplênicos e depósitos extracelulares de lipídios e hemosiderina. Segundo esses autores, a obesidade seria a causadora da esplenomegalia, com aumento da presença de células necróticas observada em cortes histológicos do órgão (ALTUNKAYNAK; OZBEK; ALTUNKAYNAK, 2007).

Importante lembrar, que a obesidade é acompanhada de alterações do estado imunológico, sendo frequentemente acompanhada de uma inflamação crônica de baixo grau. Dentro desse contexto, diversos estudos tem mostrado que a atividade esplênica pode também colaborar para o desequilíbrio inflamatório presente na obesidade que é caracterizado por uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias como: interleucina 1 (IL1), IL6, TNF- α , leptina, entre outras, em contraste com a menor produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como interleucina 2 (IL2), interferon gama (IFN- γ) e IL10 (GOTOH et al., 2012; HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; KERSHAW; FLIER, 2004; LAMAS; MARTI; MARTÍNEZ, 2002; OUCHI et al., 2011; SOMM et al., 2005).

Wu et al. (2013), apontam que o baço é a principal fonte para recrutamento de linfócitos B, que se infiltram no tecido adiposo visceral e lá produzem IL10, potente citocina anti-inflamatória. Porém em camundongos obesos por dieta, foi observada a redução da expressão destes linfócitos B pelo baço, prejudicando a atividade anti-inflamatória devido à queda na produção da IL10, quando submetidos a esplenectomia estes roedores apresentaram uma piora na resistência à insulina.

Em estudo de Gotho et al. (2012), destaca-se efeito direto da esplenectomia sobre o pâncreas endócrino, ressaltando que o agravamento na resposta inflamatória pancreática, causada por deposição de gordura na forma de triglicerídeos após esplenectomia, favorece a produção de sinalizadores pró-inflamatórios capazes de desenvolver pancreatite e disfunção pancreática, além de hipertrofia e fibrose das ilhotas. Para estes pesquisadores, os efeitos prejudiciais da esplenectomia sobre o pâncreas endócrino são decorrentes da drástica queda de IL10 e, portanto, prejuízo na atividade anti-inflamatória

produzida pelo baço causada pela obesidade.

Enquanto os estudos de Gotho et al. (2012) e Wu et al. (2013) retiram o baço e depois incluem a dieta hiperlipídica, outros autores têm retirado o baço depois que a obesidade já está instalada. Por exemplo, a esplenectomia em ratos com obesidade induzida por lesão hipotalâmica MSG reduziu a ingestão alimentar, os depósitos de gordura visceral, porém apresentou aumento na gordura subcutânea e tecido adiposo marrom, diminuiu a secreção de insulina e os níveis de glicose, melhorando a sensibilidade a insulina, reduziu também a hipertrofia nos adipócitos e ilhotas pancreáticas. Interessantemente houve aumento nos níveis de triglicerídeos e colesterol em animais controle e MSG esplenectomizados, e redução SIIG de animais MSG esplenectomizados, em situações hiperestimulatórias de glicose (16,7mmol) (LEITE et al., 2015).

O baço ainda é considerado fonte de células-tronco que podem se diferenciar em ilhotas pancreáticas, dentre outros subtipos celulares, essa ação é induzida por lesões que ocorrem no tecido alvo, que induz as células-tronco esplênicas da linhagem Hox11 a regularem fatores de transcrição embrionários e migrarem para lesão, fazendo essa substituição celular (FAUSTMAN; DAVIS, 2010).

Nos últimos anos, a participação do baço na inflamação, bem como as comunicações nervosas responsáveis por sua modulação têm sido exploradas, sendo essa função não mais atribuída apenas ao SNS e sim, mesmo que de maneira indireta, também ao SNP (ELENKOV et al., 2000; HUSTON et al., 2006; NANCE; SANDERS, 2007; ROSAS-BALLINA et al., 2011).

Compartilhando do mesmo receptor colinérgico encontrado no tecido esplênico, o receptor $\alpha 7nAChR$ tem importante função na manutenção e na sobrevivência de células β no pâncreas durante o DM1, a administração de agonista nicotínico agiu atenuando o mecanismo relacionado à apoptose e ainda melhorou o perfil inflamatório local (GUPTA et al., 2018).

Em conjunto, esses dados sugerem que há uma ligação funcional entre a resposta imunológica do baço e o pâncreas endócrino. A atividade autonômica sendo moduladora da resposta imunológica do baço pode vir a esclarecer alguns pontos desta ligação (HUSTON et al., 2006).

3.4 Nervo Vago e atividade Esplênica

A resposta imunológica a injúrias é importante para manutenção da homeostase, uma resposta imune exacerbada pode afetar o equilíbrio entre o perfil pro e anti-inflamatório levando a dano tecidual. Um potente modulador do sistema imune é o SNA, suas fibras simpáticas e parassimpáticas enviam sinais que regulam a secreção de citocinas e outros sinalizadores, responsáveis pela manutenção do quadro inflamatório (HUSTON, 2012; MARTELLI et al., 2014; YAMAKAWA et al., 2013).

A inervação simpática está presente em todos os órgãos linfoides primários ou secundários, sendo o maior componente eferente do sistema imune, com efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores. As catecolaminas: NE e epinefrina, produtos da sinalização simpática, têm conhecido potencial na manutenção da resposta inflamatória, diminuindo a produção de fatores pró-inflamatórios como: IL-1, IL-12, TNF- α , entre outros, e aumentando os fatores anti-inflamatórios como: IL-4 e IL-10 (ELENKOV et al., 2000).

Por outro lado, o efeito colinérgico vagal sobre a função esplênica foi negada por muitos anos, em especial pela ausência da inervação direta parassimpática sobre o baço (KLEIN et al., 1982), corroborada pela ausência da atividade da acetilcolinesterase, a principal enzima responsável pela degradação da ACh (BELLINGER et al., 1993).

Porém, diferentes grupos têm explorado a importância do reflexo anti-inflamatório colinérgico na resposta imune e sua relação com a atividade esplênica (HUSTON et al., 2006; JI et al., 2014; ROSAS-BALLINA et al., 2008; YAMAKAWA et al., 2013).

Neste sentido, conforme descreve estudo de Huston et al., 2012, O NV parece ser sensível a pequenas alterações no perfil de citocinas local, permitindo uma resposta aferente rápida e precisa durante o quadro inflamatório (HUSTON, 2012). Adicionalmente, ativação elétrica do NV em situação de inflamatória

aguda resulta em redução sérica de IL-6, TNF- α e redução no número de células inflamatórias no pulmão e baço (YAMAKAWA et al., 2013).

Similarmente, a ativação vagal em animais submetidos a sepse por administração de lipopolissacarídeos (LPS), também reduz, TNF- α , IL-6 e leptina plasmáticas, no hipotálamo esta ativação promove menor expressão de RNA mensageiro (mRNA) para IL-6 e IL-10 (SCHWEIGHÖFER et al., 2016).

Interessantemente, a estimulação do NV também aumenta a produção de ACh no baço. Para tal, sinais colinérgicos oriundos de neurônios pré-ganglionares vagais chegam ao gânglio celíaco e mesentérico superior, no qual se comunicam com neurônios pós-granglionares simpáticos e via nervo esplênico ativam linfócitos T produtores de ACh no baço. Esta ACh local atua em receptores nicotínicos do tipo alfa 7 ($\alpha 7nACh$) expressos nos macrófagos diminuindo a produção de TNF- α . A presença desses receptores foi confirmada no tecido esplênico de ratos Lewis e a deleção dos receptores $\alpha 7nAChR$ impede o efeito anti-inflamatório esplênico da ACh. (HUSTON et al., 2006; ROSAS-BALLINA et al., 2011; WANG et al., 2003) (Figura 2).

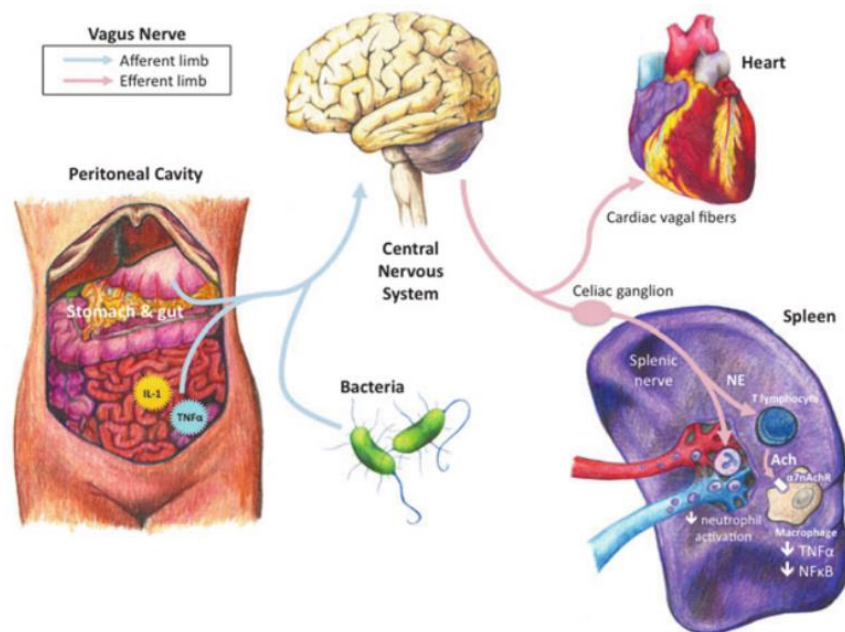


Figura 2. Esquema de comunicação entre sistema nervoso e imunológico. Imagem extraída do artigo de Huston, (2012), ilustrando a comunicação do SNA e baço.

Adicionalmente, Huston et al. (2009) demonstraram que o sinal colinérgico diminui a migração de leucócitos durante a inflamação. Segundo este estudo, esse efeito é decorrente da redução de níveis de CD11b, integrina responsável pelo recrutamento de células de defesa presente na superfície de neutrófilos.

Camundongos que foram esplenectomizados após sepse polimicrobiana apresentaram grande migração de leucócitos quando aplicado estímulo com agonista colinérgico, em contraste, animais não submetidos à esplenectomia, a migração dessas células foi diminuída pelo estímulo da ACh, confirmando a eficácia da via anti-inflamatória colinérgica para o baço sadio.

Em contrapartida, autores discordam da participação do NV no reflexo anti-inflamatório, levando em conta a falta de evidência anatômica dessa inervação em órgão linfoides e também da dependência da inervação simpática para que ele possa ocorrer, sugerindo que os efeitos anti-inflamatórios que se dizem vagais são, na verdade, decorrentes da ativação da suprarrenal e SNS (NANCE; SANDERS, 2007).

De acordo com Martelli *et al.* (2014), ao realizar o registro da atividade do nervo esplênico após desafio inflamatório com LPS, percebeu-se um forte aumento da atividade eferente desse nervo seguida de sinais inflamatórios característicos como febre e taquicardia. Nessa situação, quando o nervo vago foi seccionado bilateralmente, não houve redução na atividade do nervo esplênico e quando o nervo esplâncnico maior esquerdo foi seccionado, a atividade do nervo esplênico diminuiu e os níveis de TNF- α aumentaram em 5 vezes no plasma, curiosamente quando realizado corte do nervo esplâncnico associado à vagotomia não se observou efeito significativo. Como esperado, o corte do nervo esplâncnico deveria ter levado ao aumento do TNF, porém, quando se interrompeu a sinalização vagal, isso não ocorreu.

Logo, os efeitos anti-inflamatórios vagais, a participação esplênica e sua repercussão sobre o metabolismo são questões que ainda precisam ser exploradas. Neste contexto, há uma proximidade anatômica entre pâncreas e baço, ambos tendo suas funções influenciadas pela atividade do NV, assim seria possível que esta interação bi-direcional NV-baço possa modular a secreção de insulina pelo pâncreas endócrino?

5 REFERENCIAS

- LI, D. et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit improves energy homeostasis and inhibits inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. **Elsevier**, v. 79, p. 52–63, 2018
- SAKAGUCHI, T.; YAMAGUCHI, K. Effects of vagal stimulation, va- gotomy and adrenalectomy on release of insulin in the rat. **Journal of Endocrinology**, v. 85, p. 131–136, 1980.
- MABLEY, J.G. et al. Nicotine Reduces the Incidence od Type I Diabetes in Mice.**Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n.3, p. 876–881, 2002.
- LEGROS, G.; GRIFFITH, C.A. The abdominal vagal system in rats. An anatomical study with emphasis upon the distribution of the gastric vagi to stomach.**Journal of Surgical Research**, v. 9, n.3, p. 183–186, 1969.
- AHRÉN, B. Autonomic regulation of islet hormone secretion - Implications for health and disease. **Diabetologia**, v. 43, n. 4, p. 393–410, 2000.
- ALTUNKAYNAK, B. Z.; OZBEK, E.; ALTUNKAYNAK, M. E. A stereological and histological analysis of spleen on obese female rats, fed with high fat diet. **Saudi Medical Journal**, v. 28, p. 353–357, 2007.
- ASHCROFT, F. M. K(ATP) channels and insulin secretion: a key role in health and disease. **Biochemical Society transactions**, v. 34, n. Pt 2, p. 243–246, 2006.
- BALBO, S. et al. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. **Endocrine**, v. 31, n. 2, p. 142–148, 2007.
- BELL, G. I. et al. Molecular Biology of Mammalian Glucose Transporters. v. 13, n. 3, p. 198–208, 1990.
- BERTHOUD, H.-R. Vagal and hormonal gut–brain communication: from satiation to satisfaction. v. 20, p. 64–72, 2008.
- BOSCHERO, A C. et al. Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. **The American journal of physiology**, v. 268, n. 2 Pt 1, p. E336–E342, 1995.

- BRONTE, V.; PITTET, M. J. The spleen in local and systemic regulation of immunity. **NIH Public Access: Immunity.**, v. 39, n. 5, p. 806–818, 2013.
- CHEN, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204–7218, 2018.
- CORK, S. C. The role of the vagus nerve in appetite control: Implications for the pathogenesis of obesity. **Journal of Neuroendocrinology**, n. September, p. 1–10, 2018.
- DRAGOMIR, M. et al. Patients After Splenectomy: Old Risks and New Perspectives. **Chirurgia**, v. 111, n. 5, p. 393, 2016.
- EDVELL, A.; LINDSTRÖM, P. Vagotomy in young obese hyperglycemic mice: effects on syndrome development and islet proliferation. **The American journal of physiology**, v. 274, n. 6 Pt 1, p. E1034-9, 1998.
- ELENKOV, I. J. et al. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 595–638, 2000.
- FAUSTMAN, D. L.; DAVIS, M. Stem cells in the spleen: Therapeutic potential for Sjogren's syndrome, type I diabetes, and other disorders. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 10, p. 1576–1579, 2010.
- GAUTAM, D. et al. Role of the M3 muscarinic acetylcholine receptor in beta-cell function and glucose homeostasis. **Diabetes, obesity & metabolism**, v. 9 Suppl 2, p. 158–169, 2007.
- GILON, P.; HENQUIN, J. Mechanisms and Physiological Significance of the Cholinergic Control of Pancreatic β -Cell Function Mechanisms and Physiological Significance of the Cholinergic Control of Pancreatic α -Cell Function. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. November, p. 565–604, 2001.
- GOTOH, K. et al. Spleen-Derived Interleukin-10 Downregulates the Severity of High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1–13, 2012.
- GOTOH, K. et al. Role of spleen-derived IL-10 in prevention of systemic low-grade inflammation by obesity. **Endocrine Journal**, v. 64, n. 4, p. 375–378, 2017.
- GUPTA, D. et al. β -Cell Mass Restoration By A7-Nicotinic Acetylcholine Receptor Activation. **Journal of Biological Chemistry**, 2018.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia Médica Guyton 12a ed.pdf Tratado de Fisiologia Médica**, 2011.
- HABER, E. P. et al. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 3, p. 219–227, 2001.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1993.

HUSTON, J. M. et al. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 7, p. 1623–1628, 2006.

HUSTON, J. M. et al. Cholinergic Neural Signals to the Spleen Down-Regulate Leukocyte Trafficking via CD11b. **Journal Immunology, NIH Public Access**, v. 183, n. 1, p. 552–559, 2009.

HUSTON, J. M. The Vagus Nerve and the Inflammatory Reflex: Wandering on a New Treatment Paradigm for Systemic Inflammation and Sepsis. **Surgical Infections**, v. 13, n. 4, p. 187–193, 2012.

Jl, H. et al. Central cholinergic activation of a vagus nerve - to spleen circuit alleviates experimental colitis. **HHS Public Access**, v. 7, n. 2, p. 335–347, 2014.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548–2556, 2004.

KIBA, T. et al. Ventromedial hypothalamic lesion-induced vagal hyperactivity stimulates rat pancreatic cell proliferation. **Gastroenterology**, v. 110, n. 3, p. 885–893, 1996.

KLEIN, R. L. et al. Opioid peptides and noradrenaline co-exist in large dense-cored vesicles from sympathetic nerve. **Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 2255–2261, 1982.

KONRAD, R. J. et al. Carbachol stimulation of phospholipase A2 and insulin secretion in pancreatic islets. **Biochem J**, v. 287 (Pt 1, p. 283–290, 1992.

LAMAS, O.; MARTI, A.; MARTÍNEZ, J. Obesity and immunocompetence. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. S42–S45, 2002.

LEITE, N. D. C. et al. Splenectomy attenuates obesity and decreases insulin hypersecretion in hypothalamic obese rats. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 64, n. 9, p. 1122–1133, 2015.

LUBACZEUSKI, C. et al. Vagotomy ameliorates islet morphofunction and body metabolic homeostasis in MSG-obese rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 5, p. 447–457, 2015.

LUNDQUIST, I. Cholinergic muscarinic effects on insulin release in mice. **Pharmacology**, v. 25, n. 6, p. 338–347, 1982.

MARTELLI, D. et al. Reflex control of inflammation by sympathetic nerves, not the vagus. **The Journal of Physiology**, v. 592, n. 7, p. 1677–1686, 2014.

MASI, E. B.; VALDÉS-FERRER, S. I.; STEINBERG, B. E. The vagus neurometabolic interface and clinical disease. **International Journal of**

Obesity, v. 42, n. 6, p. 1101–1111, 2018.

MESSINA, G. et al. Review Article Autonomic Nervous System in the Control of Energy Balance and Body Weight : Personal Contributions. **Neurology Reserch International**, v. 2013, p. 1–5, 2013.

MONTENEGRO, R.; CHAVES, M.; FERNANDES, V. **Fisiologia Pancreática: Pâncreas Endócrino**. Disponível em: <<http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/openaccess/9788580391893/20.pdf>>.

N'GUYEN, J. M. et al. Involvement of the autonomic nervous system in the in vivo memory to glucose of pancreatic β cell in rats. **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 4, p. 1456–1462, 1994.

NANCE, D. M.; SANDERS, V. M. Autonomic Innervation and Regulation of the Immune System (1987-2007). **Growth (Lakeland)**, v. 21, n. 6, p. 736–745, 2007.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat.Rev.Immunol.**, v. 11, n. 2, p. 85–97, 2011.

PETERS, J. H. et al. Withdrawal and restoration of central vagal afferents within the dorsal vagal complex following subdiaphragmatic vagotomy. **Journal of Comparative Neurology**, v. 521, n. 15, p. 3584–3599, 2013.

ROHNER-JEANRENAUD, F.; HOCHSTRASSER, A. C.; JEANRENAUD, B. Hyperinsulinemia of preobese and obese fa/fa rats is partly vagus nerve mediated. **The American journal of physiology**, v. 244, n. 4, p. E317-22, 1983.

ROSAS-BALLINA, M. et al. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 31, p. 11008–11013, 2008.

ROSAS-BALLINA, M. et al. Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 98–101, 2011.

SCHWEIGHÖFER, H. et al. Modulatory effects of vagal stimulation on neurophysiological parameters and the cellular immune response in the rat brain during systemic inflammation. 2016.

SCOMPARIN, D. X. et al. Autonomic activity and glycemic homeostasis are maintained by precocious and low intensity training exercises in MSG-programmed obese mice. **Endocrine**, v. 36, n. 3, p. 510–517, 2009.

SHARKEY, K. A.; WILLIAMS, R. G.; DOCKRAY, G. J. Sensory substance P innervation of the stomach and pancreas. Demonstration of capsaicin-sensitive sensory neurons in the rat by combined immunohistochemistry and retrograde tracing. **Gastroenterology**, v. 87, p. 914–921, 1984.

SHIKORA, S. et al. Vagal blocking improves glycemic control and elevated blood pressure in obese subjects with type 2 diabetes mellitus. **Journal of**

Obesity, v. 2013, 2013.

SHIMOJO, G. et al. Exercise activates vagal induction of dopamine and attenuates systemic inflammation. v. 133, n. 9, p. 2152–2160, 2019.

SILVA, C. A. DA et al. Vagotomia reduz a sensibilidade das células b pancreáticas à arginina. v. 12, p. 33–39, 2012.

SOMM, E. et al. Decreased Fat Mass in Interleukin-1 Receptor Antagonist–Deficient Mice. **Diabetes**, v. 54, n. 12, p. 3503–3509, 2005.

TARANTINO, G. et al. Spleen: A new role for an old player? **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 33, p. 3776–3784, 2011.

WANG, H. et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 384–388, 2003.

WANG, H. X. et al. Effects of splenectomy on spontaneously chronic pancreatitis in aly/aly mice. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2010, 2010.

WU, L. et al. Spleen supports a pool of innate-like B cells in white adipose tissue that protects against obesity-associated insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 43, p. E4638–E4647, 2013.

WU, S.-C. et al. Splenectomy in trauma patients is associated with an increased risk of postoperative type II diabetes: a nationwide population-based study. **American Journal of Surgery**, v. 208, n. 5, p. 811–816, 2014.

YAMAKAWA, K. et al. Electrical Vagus Nerve Stimulation Attenuates Systemic Inflammation and Improves Survival in a Rat Heatstroke Model. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.

YAMATANI, K. et al. Impaired vagus nerve-mediated control of insulin secretion in Wistar fatty rats. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 47, n. 10, p. 1167–1173, 1998.

ARTIGO CIENTÍFICO

**SPLEEN AND VAGUS NERVE: EFFECTS ON METABOLISM AND INSULIN
SECRETION**

The vagus nerve and spleen interaction can modulates adiposity, insulin secretion and insulin sensibility in male lean Wistar rats.

Bruna S Siqueira¹, Vanessa M Ceglareck¹, Ellen C.Z. Gomes¹, Gabriela M. Soares², Juliana Z Nenevê¹, Karoline Z Volinski¹, Sandra Moraes¹, Ananda Malta³, Paulo Mathias³, Henriette Rosa de Oliveira Emilio⁴. Sandra L. Balbo¹, Sabrina Grassioli¹

1 Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo, Programa de Pós-graduação em Biociências e Saúde, UNIOESTE, Cascavel/PR.

2 Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades, UNICAMP, Campinas/SP.

3 Laboratório de Biologia Celular e da Secreção, UEM, Maringá/PR.

4 Departamento de Biologia Geral, UEPG, Ponta Grossa/PR

Correspondente author: Sabrina Grassioli. Rua Universitária, n 1619; Jardim Universitário, Cascavel –PR - Brazil. Postal Cod 85810119; phone number: (55) 45 32203257, email: sgrassioli@gmail.com

Short title: **Vagal and Splenic actions on metabolism.**

Abstract

Aims: The vagus nerve (VN) and spleen can exert important effects in adiposity and insulin secretion. Herein, we evaluated the effect of subdiaphragmatic vagotomy associated with splenectomy in adiposity, insulin resistance (IR) and glucose induced insulin secretion (GIIS) in male lean Wistar adult rats.

Methods: At the 60-old-days the male Wistar rats were randomly distribuites in four group, according surgery procedure: VAG: rats submitted to subdiaphragmatic vagotomy; SPL: rats submitted to splenectomy; VAG+SPL: rats submitted to VAG plus SPL and SHAM: rats submitted at false operation (n=17 rats/group). At 149-old-days the rats were submitted to intraperitoneal glucose tolerance teste (ipGTT;2g/Kg) and at 150-old days were evaluated fat content and blood biochemistry parameters (glucose, triglycerides, cholesterol, insulin). The ration triglycerides and glucose ratio were used to calculation of TyG index, an indicator of insulin resistance (IR). Body weight and food intake were evaluated from 70 at 148 days of life. Pancreatic islets were isolated to study GIIS and autonomic responses, as well as, were Glucose subtype 2 transporter (Glut2) and glucokinase (GCK) expressions. The pancreas also was submitted at histological analysis of pancreas. Moreover, the neural activity from vagus nerve (VN) was evaluated.

Results: The VAG surgery, reduces body weight, growth and adiposity, despite of high food intake, suggesting elevated energy expenditure. Moreover VAG surgery reduces glucose, triglycerides and IR. These factors did not modify by SPL. However, in the VAG+SPL rats were blocked the effects in adiposity, glucose, triglycerides and IR suggesting that spleen participates of responses induced by VAG. On other hand, VAG surgery reduces GIIS; an effect accented in VAG+SPL groups. The SPL, isolate, reduced islet size, indicating that spleen is important to preserve islets structure. Finally, the spleen modulates VN firing rate, once that VAG+SPL rats presented significant reduction in VN activity in

relation to other groups.

Conclusion: In the present study we demonstrated that the reductions of adiposity, triglycerides, glucose as well as improves in IR induced by VAG are blocked or attenuated in the absence of spleen without alter vagal effects on growth and food intake. Moreover, VAG associated with SPL reduces GIIS and islets size, suggesting synergist effect on vagus nerve and spleen on endocrine pancreas; an event that could be related at potential role of spleen in modulates autonomic neural flux.

Keywords: vagus nerve; spleen; pancreatic islets; insulin

Introduction

Autonomic nervous system (ANS) is essential to homeostasis regulation, including the control of energy metabolism¹. Two central subdivision constitute ANS, the sympathetic nervous system (SNS) and parasympathetic nervous system (PNS). The PNS activity is primary represented by vagus nerve (VN), which exerts regulatory effects on several visceral systems, modulating cardiovascular, respiratory, gastrointestinal and endocrine functions^{2,3,4}. Interestingly, the PNS via VN also participate of control of immune system⁴ throughout of activation of neural inflammatory reflex^{5,6,7}. Important, this anti-inflammatory vagal reflex is not active only during critical state of systemic inflammation, as sepsis, but also could be important to suppress obesity-associated inflammation^{8,9}. Moreover, the vagal hyperactivity is involved in hiperinsulinemia, insulin resistance and excessive adiposity^{9,10}.

In this regard, the spleen is a central organ in the immune system^{11,12} and splenic dysfunctions are also very frequently in obesity condition¹³. For example, the inflammation induced by high fat-sugar diet (HFSD) promotes alterations in splenic immune responses¹⁴. Augmented fat deposition in the spleen resulting in splenomegaly is also common in obesity¹³. In addition, the splenectomy worse inflammatory liver response and aggravate hepatic steatosis in rats consumed high fat diet (HFD)^{13,15,16}. Interestingly, the splenic participation appears be essential to anti-inflammatory effects of VN stimulation^{12,17}. In animals with endotoxemia, the anti-inflammatory vagal effect require neural signals along the adrenergic splenic nerve¹². Moreover, the activation of alpha7 -nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) in spleen also is essential in anti-inflammatory responses¹⁷. The interplay, spleen and VN, was recently demonstrated

modulates anti-inflammatory effect of exercise¹⁸.

Insulin is a hormone essential to glucose and lipid homeostasis and, insulin resistance (IR) has a central role in obesity and complicate diseases as, type 2 diabetes mellitus (T2DM). Thus, to preserve pancreatic beta cell mass and insulin secretion is vital to avoids metabolic diseases. For such, glucose-induced insulin secretion (GIIS) is stimulated by glucose and adjusted by ANS innervation¹⁹, in particular by VN. The VN-derived cholinergic signalling through a mechanism mediated by muscarinic receptors, subtype 3 (MR3) potentiate GIIS as well as stimulates beta cell proliferation in the pancreas²⁰⁻²³.

It is well recognized that inflammatory process induces beta cell apoptosis and reduces GIIS, contributing directly to failure in insulin secretion during obesity and T2DM conditions²⁴. Moreover, new data have demonstrated relationship between spleen and pancreatic functions^{25,26}. For example, Cucak *et al* (2013) demonstrated that islets from diabetic rodents present a strong inflammatory induction locally in the pancreatic tissue and simultaneous systemically in secondary lymphoid organs, such as spleen; these conditions were intimately correlated with hyperglycaemia, reduction of pancreatic islet number, as well as a deficiency to produce insulin within the beta cells²⁷. Splenectomized rats submitted to HFD are more susceptible to pancreatic fibrosis and inflammation²⁸. Moreover, changes in insulin sensitivity and GIIS was also observed in obese rats post-splenectomy²⁶.

In the present study we evaluating the effect of subdiaphragmatic vagotomy associated with splenectomy in adiposity, IR and GIIS from lean Wistar male adult rats.

Methods

Animal

The Wistar adult male rats (n=68) with 50 days of life were obtained from Central vivarium of Western Parana State University (UNIOESTE) and transferred to vivarium of Laboratory of Physiology Endocrine and Metabolism (LAFEM). The rats were kept in plastic cages (n=3-4 rats/cage) with a stainless steel cover, receiving water and food ad libitum, under controlled conditions of luminosity (12:00-12h:00 light-dark) and temperature ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), according to the

guidelines of the National Council for Control of Animal Experiments (CONCEA) and The Arrive Guidelines²⁹. Ethic Committee on Animal Use (CEUA) from UNIOESTE approved experimental procedures in March 16, 2017.

Surgery Procedures

At 60 days of life the rats were randomly subdivided in groups, according surgery procedure, subdiaphragmatic vagotomy (VAG) or splenectomy (SPL). The VAG procedure followed the protocol previously established by Balbo *et al.* (2007). Briefly, after 12h of fasting the rats were anesthetized with isoflurane (1%) and maintained sob mechanic ventilation (O₂; 1mL/min) in a system adapted to rodents. After antisepsis using chlorhexidine gluconate (2%), was performed at midline abdominal incision (± 2 cm) along the *linea alba* running caudal from the xiphisternum. To VAG procedure the liver was retracted and stomach and esophagus were located. Then, the anterior left and right ramus of vagus nerve (VN) were located, separated from esophagus and sectioned. The SPL procedure followed the protocol previously established by Gotho *et al.* (2012). Thus, after similar procedure of anaesthesia, antisepsis and laparotomy above mentioned, the spleen was located, exteriorized from abdominal cavity, the blood vessels were isolated and the organ excised and weighted. The SHAM animals were anesthetized, submitted to midline abdominal incision and the VN and spleen were manipulated but not sectioned or excised. Some rats were submitted to both, VAG and SPL in same surgical procedure. All internal muscular incision was sutured with absorbable yarn (Catgut n^o 3.0), while cutaneous incision was closed with suture of nylon (Procure n^o 3.0). Thus, were formed four experimental groups (n=17 rats by groups): VAG - rats submitted to subdiaphragmatic vagotomy, SPL - rats that were submitted at splenectomy, VAG+SPL - rats submitted to subdiaphragmatic vagotomy and splenectomy and SHAM - rats submitted only to exploratory laparotomy. After surgery procedures, the animals were transferred to individual cages, receiving water and food ad libitum during 10 days until cicatrisation. After this period the rats were regrouped in number of 3-4/cages and received water and food ad libitum until the euthanasia.

Food intake and Body Weight

The rats in all groups were individually marked (tail mark) and from 78 at 148 days of life were registered body weight (g) and food intake (g/g bw). To calculate food intake, the total of chow consumed by cage was divided by number of rats per cage and posteriorly by body weight. The Area Under Curve (AUC) was calculated by food intake and body weight evolution. The Feed Efficiency (FE) was obtained by next formula: Δ body weight (g)/ Σ food intake (g)*100]³⁰.

Intraperitoneal Glucose tolerance test

At 145 days of life, and after 12h of fasting, the rats (n=17/group) were submitted to intraperitoneal (ip) glucose tolerance test (ipGTT). For this, was done a little caudal incision to collect basal sample (time 0). Immediately, each rat received an i.p. glucose load (2g/Kg) and additional blood samples were collected in times 15, 30, 60 and 120 minutes after glucose administration. The blood glucose levels were measured using a glucometer (Accu-Chek Active®). Moreover, the glucose values obtained during the ipGTT were used to calculate the AUC.

Neural Vagus Nerve Activity

Between 4 or 5 rats by group were randomly selected and submitted at analysis of VN register according technique described by Leon-Quinto, Magnan *et al.*, 1998 adapted³¹. Briefly, after fasting of 12 h, the rats were anesthetized thiopental (45mg/Kg) and a small incision done in ventro-cervical region of neck. Then, the superior branch of VN was located, cleaned and via electronic system registered. The neural signal output was acquired by an Insight interface (Insight®, Riberão Preto, SP- Brazil). After stabilizing of the signal for 5-10 min, 20 record frames of 15s from each animal were randomly chosen for spike counting. The VN activity was analysed for 5 seconds (s) to determine the number of spikes. Spikes greater than 0 millivolts (mV) were registered as neural activity. The average number of spikes was used as the nerve firing rate for each rat (spikes/5s).

Anthropometric Measure and Biochemistry Parameters

At 150 days of life and after 12h of fasting, the body weight (g) was registered, as well as, the naso-anal length (NAL; cm) and Lee Index calculated by formulae $^3\sqrt{\text{body weight (g)}/\text{naso anal-length (cm)}*1000}$ ³². After brief desensibilization with CO₂ the rats were euthanized by decapitation. The abdominal cavity was laparotomized and retroperitoneal, perigonadal, mesenteric and inguinal fat depots were retired and weighted. The stomach was excised, cleaned and weighed being parameter to analyse efficacy of VAG surgery according suggested by Edvell; Lindström, (1998)³³. The total blood was collected and plasma separated by biochemistry dosage of glucose (Liquid Stable); triglycerides and total cholesterol using colorimetric kits of (Bioloquid). The plasma insulin was measured by radioimmunoassay (RIA). The IL10 was measured by Rat IL-10 ELISA Kit (novex, life technologies; KRC0101, KRC0102).

Pancreas Histology

For 4-5 pancreas per group were excised, weighted and transferred to histological fixation solution (ALFAC; alcohol 70%; formalin solution and glacial acetic acid) by 24h. Then, the pancreas was submitted to histological process, being dehydrated in ascendant alcohol solution, diaphanised with xilol and embebed in Paraplast (McCormick Scientific). The tissues were sectioned at 5µm on a Reichert Jung rotary microtome (Leica RM 2025 Microsystems Inc., Wetzlar, Germany) and hematoxylin and eosin (H&E) were used for staining. Microscopic analysis of stained preparations was carried out using an Olympus BX51 (Olympus microscope, Japan) and digital photographs were taken with a digital still 36-bit color camera, 1280x1024 pixels, with a DP71 Controller (Olympus). The Image J® 1.42q software (Bethesda, MD, USA), available from the NIH site (<http://rsb.info.nih.gov/ij>, accessed on 18 January 2019), was employed for analyses of the number and area of the pancreatic islets. Five to six slides per rat were made in semi-serialized sections with a 50µm interval between pancreatic sections. In all slides were counted the total of islets by sections, as well as, were

measure the area of approximately one hundred islets per group (μm).

Pancreatic islet isolation and insulin secretion

From 5-6 rats per group were used for pancreatic islet isolation by the collagenase technique, according to a previous protocol established by Lacy & Kostianovsky³⁴, with modifications³⁵. Briefly, the pancreas was perfused with Hanks Buffer Solution (HBS), pH 7.4, bovine serum albumin (BSA; 0,1%) containing collagenase type V (1 mg/mL) via duct hepatic common. The organ was excised and posteriorly digested at 37°C. The islets were manually collected, washed in HBS and transferred to wells in culture plates containing 1 mL of Krebs buffer solutions (KBS), pH 7.4; BSA (0.1%) in the presence of 5.6mM glucose. In the pre-incubation phase, the isolated pancreatic islets (4islets/wells) were transferred to a culture chamber (95% CO₂) at 37°C for 60 min. After pre-incubation, the medium was changed and the isolated pancreatic islets received 1mL of Krebs solutions containing: Glucose at 11.1mM to evaluate glucose-induced insulin secretion (GIIS). Aliquots for all islet conditions were used to measure insulin by RIA. To each condition were done at least 16 repetitions.

Insulin Resistance

The insulin sensibility was calculated by association between the product of fasting plasma glucose and triglycerides, TyG index. The TyG index was calculated as $\text{Log} [\text{fasting triglycerides (mg/dL)} \times \text{fasting plasma glucose (mg/dL)}] / 2$ ³⁶.

Western blotting

Islets from 4-6 rats for each group were solubilized in buffer containing 100mM Tris pH 7.5, 10mM/L sodium pyrophosphate, 100mM sodium fluoride, 10mM/L EDTA, 10mM sodium vanadate, 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 2% Triton X-100, final pH 8.08. The protein concentration in the

supernatants was assayed using the Bradford assay³⁷. For sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot analysis, samples were treated with Laemmli buffer. After heating to 95°C for 5 min, the proteins were separated by electrophoresis (30µg/lane, 10% gel), and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked overnight at 4°C in Tris-buffered saline containing 5% skimmed milk.

Subsequently, the membranes were incubated with a polyclonal antibody against Glut2 (1:1000, cat.SC9117, Santa Cruz) and Glucokinase (GCK) antibody (1:1000, cat.SC7908, Santa Cruz). After washing, the membranes were incubated for 1 h with a secondary antibody (1:10.000 – Sigma), followed by exposure to an ImageQuant LAS 4000 Mini (GE Healthcare Bio-Sciences - Uppsala–Sweden) to detect the chemiluminescence of the nitrocellulose membranes. After assaying the target protein, Western blotting was repeated using α -tubulin (1:10.000, cat.T6199, Sigma) antibody, as an internal control. Band intensities were quantified by optical densitometry using Image J® software (National Institute of Mental Health, USA). Data are expressed as the normalization of the Glut2 and GCK: α -tubulin ratio.

Statistical Analysis

Data are presented as means \pm standard error mean (SEM), and analyzed by Two-way ANOVA. When F values were significantly different ($p < 0.05$), the Tukey post-test was applied. The statistical analyses were conducted using Prism for Macintosh, version 5.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Food intake and body weight evolution

Surgeries ($F_{(3,30)}=12.93$; $p < 0.0001$) and time ($F_{(10,10)} = 420.9$; $p < 0.0001$), independent, as well as, their interaction ($F_{(30,300)} = 2.183$; $p < 0.0005$) affected significantly body weight evolution (Figure 1a). Thus, from 78 at 148 days of life, rats from all experimental groups presented increased of body weight. However,

SPL, VAG and VAG+SPL animals showed smaller body weight in relation to SHAM rats in same period; an effect evident in AUC of body weight (Figure 1c). The AUC from VAG and VAG+SPL groups was 13.7% and 11.5% smaller, respectively, in relation to SHAM rats; this effect was determined by VAG factor ($F_{(1,40)} = 15.89$; $p = 0.0003$) and by interaction VAG and SPL ($F_{(1,0)} = 5.406$; $p < 0.0252$). The food intake (Figure 1b) was influenced exclusively by time factor ($F_{(10,100)} = 88.34$; $p < 0.0001$) resulting in reduction of food intake from 78 at 149 days of life in all experimental groups. The VAG influenced AUC of food intake ($F_{(1,40)} = 4.959$; $p < 0.0317$), despite the median of AUC had not been statistically different between groups in post-test (Figure 1d). The FE was influenced by interaction VAG and SPL ($F_{(1,38)} = 4.859$; $p = 0.0336$) resulting in smaller FE in VAG (-16.5%) and VAG+SPL (-13.1%) animals in relation to FE of SHAM rats (Figure 1e; $p < 0.05$).

Adiposity, biometric and metabolic plasmatic parameters

Only VAG factor ($F_{(1,64)} = 24.61$; $p < 0.0001$) influenced the body weight and NAL at 150 days of life (Table 1). Thus, VAG and VAG+SPL animals presented smaller body weight in relation to SHAM and SPL groups. The VAG rats also showed reduced NAL when compared to SHAM and SPL rats ($p < 0.05$). The VAG factor ($F_{(1,36)} = 12.19$; $p = 0.0013$) independent, as well as, the interaction VAG and SPL ($F_{(1,36)} = 5.042$; $p = 0.0310$) influenced retroperitoneal fat depot. Thus, the retroperitoneal content was reduced 64% and 55%, respectively, in VAG and VAG+SPL groups in relation to SHAM rats ($p < 0.05$). The VAG factor significantly affected the perigonadal ($F_{(1,36)} = 10.58$; $p = 0.0025$), mesenteric ($F_{(1,40)} = 14.99$; $p = 0.0004$) and subcutaneous inguinal fat ($F_{(1,40)} = 7.341$; $p = 0.0099$) content. Thus, in VAG groups was observed significantly reduction of perigonadal (44%) and mesenteric (32%) content in relation to same depot in SHAM animals ($p < 0.05$). The VAG rats showed reduction of 33% in mesenteric depot in relation to SPL animals ($p < 0.05$). Moreover, VAG and VAG+SPL rats presented smaller inguinal depot content in relation to SPL animals (Table 1; $p < 0.05$).

As showed in Table 2, fasting glucose value was affected by interaction VAG and SPL factors ($F_{(1,54)} = 11.51$; $p = 0.0013$). Thus, SPL and VAG rats presented reduction of 17% and 12% respectively, in glucose concentration in

relation to SHAM rats ($p < 0.05$). Neither insulin nor cholesterol plasmatic levels were affected by VAG or SPL surgeries. However, the triglycerides plasmatic levels were modified by VAG factor ($F_{(1,54)} = 13.04$; $p = 0.0007$); thus VAG rats showed reduction of 37.4% when compared to SHAM animals ($p < 0.05$). Moreover, the IL10 plasmatic level were influenced by interaction VAG and SPL surgeries ($F_{(1, 20)} = 4.510$, $p = 0.0464$). Thus, in VAG+SPL rats the IL10 was 47% smaller in relation to VAG animals ($p < 0.05$).

Glucose Tolerance and Insulin Resistance

The glycemic values after glucose load (2g/Kg bw ip) were influenced by time factor ($F_{(4, 60)} = 575.4$; $p < 0.0001$). Thus, in times 15, 30 and 60 min after glucose load the increment of glucose was significantly higher than in times 0 (basal) and 120 min in all experimental groups ($p < 0.05$). Despite of occasional differences between groups in some times (15 and 30 min), the value of AUC during ipGTT was not influenced neither by VAG nor by SPL (Figure 2b). Insulin resistance evaluated by TyG index was altered by VAG factor ($F_{(1,54)} = 12.20$; $p = 0.0010$); thus VAG groups showed reduction of approximately 7% in TyG index in relation to SHAM animals ($p < 0.05$).

Islets Histology and Glucose induced insulin secretion

Islets number was influenced by VAG factor ($F_{1,15} = 9.414$; $p = 0.0078$) resulting in higher (30%) islets number in VAG rats in relation than SPL group (Figure 3a). On other hand, the size of islets was influenced by SPL factor ($F_{(1,15)} = 5.029$; $p = 0.0405$). Thus, SPL and VAG+SPL rats had smaller size of islets in relation to VAG and SHAM groups, but this effect was not different statistically in post-test.

In the presence of low glucose concentration, 5.6mM, neither VAG nor SPL affected significantly insulin secretion from isolated pancreatic islets (Figure 4a). However, in stimulatory glucose conditions (11.1mM) the GIIS was affect by VAG ($F_{(1, 67)} = 16.37$, $p = 0.0001$) and SPL ($F_{(1, 67)} = 6.753$, $p = 0.0115$) factors. Thus, at high glucose concentration (11.1mM) the GIIS was 41.7% and 56% smaller, respectively, in islets from SPL and VAG groups, in comparison to GIIS in

pancreatic islets from SHAM animals, in VAG+SPL animals that decrease was of 65.8% versus SHAM (Figure 4b). The Glut₂ and GCK expression from isolated pancreatic islets were not affected neither by VAG nor by SPL (Figure 4c and d, respectively).

Vagus Nerve Activity

The VN activity was influenced by SPL factor ($F_{(1,16)} = 13.07$; $p = 0.0023$) resulting in reduction of 49% of VN activity in VAG+SPL rats when compared to SHAM animals ($p < 0.05$).

Discussion

The impact of vagal activity on metabolism is well recognized, however important relationship between VN and immune responses, including splenic modulations have been uncovered^{18,38,39}. Interesting, this bi-directional involving VN and splenic functions, appears modulates the metabolism including insulin sensibility and insulin secretion^{9,26}. Thus, in the present work we evaluated the impact of VAG associated with SPL on white adipose tissue (WAT) content, IR and GIIS from isolated pancreatic islets.

According indicated by our results, VAG rats presented significant reduction in body weight and growth, despite of augmented food intake resulting in smaller EF and lower WAT content. These data indicated that VAG rats present greater energy expenditure. It's well established that energy homeostasis is accurately maintained by SNS and PNS neural activity^{1,9,40}. Thus, the VN exclusion can favour SNS activity, which exerts well-recognized lipolysis action in WAT⁴¹. This hypothesis is sustained by recent study reporting that vagal afferent fibers of the hepatic branch of the VN are needed for the development of the peripheral sympathoexcitation, tachycardia, tachypnoea, IR, liver steatosis and adipose tissue thermogenesis⁶⁴. In this regard, hepatic VAG performed in mice at the 6 weeks of life also induces the body weight reduction and increased energy expenditure⁴². Moreover, the subdiaphragmatic VAG performed at the 3 to 5-month-old in Mc4r^{-/-} mice also reduces body weight gain and increased energy expenditure⁴³. Indeed, elimination of efferent vagal activity by bilateral

VAG has been shown to reduce body weight to normal in animals with ventro medial hypothalamic (VMH) lesions⁴⁴.

On other hand, the SPL isolate, did not modify food intake, growth, WAT or EF, suggesting that the spleen absence no interfere in metabolism in lean rats. In contrast, in obese rats the splenectomy modifies food intake, WAT and body weight²⁶, indicating that obesity can alter splenic functions with reflex in energy metabolism. However, we observed that spleen appear modulates the effects from VAG on WAT content. In this regard, in the present study, we noted that, the absence of the spleen avoids or attenuates the reduction of WAT promoted by VAG. Thus, for the first time, our data suggest that, the presence of spleen is necessary to lipolytic effects induced by VAG. Similarly, the spleen also is a crucial organ in the cholinergic vagal anti-inflammatory pathway¹⁷. Moreover, important cytokines, such as, IL10 released by spleen modulates adrenergic receptor and thermogenesis in WAT⁴⁵. Interestingly, here we observed that IL10 plasmatic levels is reduced by association VAG-SPL.

On other hand, the absence of spleen no alters the effects of VAG in body weight and food intake. The VN have an important afferent component, which converge neural satiety signals until nucleus of tracts solitary (NTS) whereby several hypothalamic neural nucleus are activated and reflexively, output signals are transmitted through the efferent nervous system^{46,47}. Thus, it's possible that this arc-reflex vago-vagal no had been influenced by splenic activity.

In addition, we also observed that VAG promoted reduction in glucose and triglycerides plasmatic levels, improving IR, these effects disappear in VAG+SPL rats; again suggesting that at least in part, the effects provoked by VAG can be dependent of splenic activity. In this regard, the spleen appear affect glucose homeostasis, despite of contradictories results have been demonstrated by some studies^{15,26}. For example, Ley *et al.* (2012) *in humans*, demonstrated that higher glucose levels were observed five years after spleen absence⁶⁶. In contrast, Leite *et al.* (2013), showed that obese splenectomised rats improved glucose tolerance.

Insulin secretion is frequently related at insulin periphery sensibility thus, we evaluated GIIIS from isolated pancreatic islets. Neither VAG nor SPL procedure altered insulin secretion in the presence of 5.6 mM of glucose, justifying absence of effects of the VAG and SPL on fasting insulin levels.

However, we observed that in the presence of high glucose concentration (11.1mM) GIIS was significantly reduced, in VAG and SPL groups. Several studies have demonstrated that VAG reduces GIIS in islets from rats and mice^{9,38,63}. However, the functional association between endocrine pancreas and splenic activity is unknown. One work of our group demonstrated that SPL reduces GIIS in islets from obese rats²⁶.

The VN participates in pro-inflammatory processes through the so-called “cholinergic anti-inflammatory reflex”⁴⁸; an event that appear influence endocrine pancreas. In this sense, recent study published by Gupta et al. 2018 showed that VN could exerts anti-inflammatory activity in pancreatic islets, via Ach and subsequent activation of $\alpha 7nAChR$. Moreover, the inhibition of AChE in STZ-treated mice leads to reduced islet infiltration by CD3+ T cells and significantly lower levels of pancreatic IL-1 β and splenic IL-6 and IL-17 mRNA expression, suggesting that cholinergic pathway activation influences the development of hyperglycemia in the STZ⁴⁹. Moreover, pancreatic islets from splenectomised rats submitted at HFD diet presented augmented fibrosis and degeneration¹⁶. According these authors, the spleen is important font to IL10, a potent anti-inflammatory cytokine necessary to pancreas protection. Interestingly, here we noted that islets from VAG-SPL rats have reduced area in relation to islets from SHAM pancreas, an event that could indicates reduction in beta cell mass. Thus, islets from VAG-SPL rats would be more vulnerable at inflammatory process, loss of pancreatic beta cell and consequently reduction in GIIS. These effects could involve IL10, once that, as mentioned above, VAG-SPL rats have reduced IL10 levels.

Interesting, recently Zoul *et al* (2018), demonstrated that the association between splenocytes and isolated pancreatic islets in vitro is able in to protect islets of auto-immune attack in model of diabetes mellitus type 1⁵⁰. It's possible that ILs produced by splenocytes modulates autonomic response in pancreatic islets. According reviewed by Lori *et al.* (2017), there is an intense bi-directional communication between spleen and autonomic system determining their functional activity and influencing the metabolic homeostasis⁵¹. Corroborating with these findings, in the present study, the SPL reduced VN activity, suggesting that splenic signal could modulates parasympathetic activity to pancreas.

In summary, this study showed that the reductions of adiposity, triglycerides, glucose and augmented insulin sensitivity induced by vagotomy are blocked or attenuated in the absence of spleen. Moreover, VAG and SPL reduce GIIS, suggesting synergist effect on vagus nerve and spleen on endocrine pancreas. Important, reduced vagus nerve activity and IL10 plasmatic levels found in VAG-SPL rat suggests that there is bi-direcional interaction between spleen and autonomic neural flux; a process that could be mediated by cytokines.

Acknowledgement

Productivity Research Fellow CNPq; process n 309633/2016-8

1. Messina, G. *et al.* Review Article Autonomic Nervous System in the Control of Energy Balance and Body Weight : Personal Contributions. *Neurol. Reserch Int.* **2013**, 1–5 (2013).
2. Masi, E. B., Valdés-Ferrer, S. I. & Steinberg, B. E. The vagus neurometabolic interface and clinical disease. *Int. J. Obes.* **42**, 1101–1111 (2018).
3. Cork, S. C. The role of the vagus nerve in appetite control: Implications for the pathogenesis of obesity. *J. Neuroendocrinol.* 1–10 (2018). doi:10.1111/jne.12643
4. Schweighöfer, H., Rummel, C., Roth, J. & Rosengarten, B. Modulatory effects of vagal stimulation on neurophysiological parameters and the cellular immune response in the rat brain during systemic inflammation. (2016). doi:10.1186/s40635-016-0091-4
5. Czura, C. J. & Tracey, K. J. Autonomic neural regulation of immunity. *J. Intern. Med.* **257**, 156–166 (2005).
6. Yamakawa, K. *et al.* Electrical Vagus Nerve Stimulation Attenuates Systemic Inflammation and Improves Survival in a Rat Heatstroke Model. *PLoS One* **8**, (2013).
7. Chen, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* **9**, 7204–7218 (2018).
8. Shikora, S. *et al.* Vagal blocking improves glycemic control and elevated blood pressure in obese subjects with type 2 diabetes mellitus. *J. Obes.* **2013**, (2013).
9. Lubaczeuski, C. *et al.* Vagotomy ameliorates islet morphofunction and body metabolic homeostasis in MSG-obese rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **48**, 447–457 (2015).
10. Rohner-Jeanrenaud, F., Hochstrasser, A. C. & Jeanrenaud, B. Hyperinsulinemia of preobese and obese fa/fa rats is partly vagus nerve mediated. *Am. J. Physiol.* **244**, E317-22 (1983).
11. Tarantino, G., Savastano, S., Capone, D. & Colao, A. Spleen: A new role for an old player? *World J. Gastroenterol.* **17**, 3776–3784 (2011).
12. Rosas-Ballina, M. *et al.* Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 11008–11013 (2008).

13. Altunkaynak, B. Z., Ozbek, E. & Altunkaynak, M. E. A stereological and histological analysis of spleen on obese female rats, fed with high fat diet. *Saudi Med. J.* **28**, 353–357 (2007).
14. Buchan, L. *et al.* High-fat, high-sugar diet induces splenomegaly that is ameliorated with exercise and genistein treatment. *BMC Res. Notes* **11**, 752 (2018).
15. Wu, S.-C., Fu, C.-Y., Muo, C.-H. & Chang, Y.-J. Splenectomy in trauma patients is associated with an increased risk of postoperative type II diabetes: a nationwide population-based study. *Am. J. Surg.* **208**, 811–816 (2014).
16. Inoue, M. *et al.* Involvement of remnant spleen volume on the progression of steatohepatitis in diet-induced obese rats after a splenectomy. *Hepatol. Res.* **42**, 203–212 (2012).
17. Huston, J. M. *et al.* Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J. Exp. Med.* **203**, 1623–1628 (2006).
18. Shimojo, G. *et al.* Exercise activates vagal induction of dopamine and attenuates systemic inflammation. **133**, 2152–2160 (2019).
19. Gilon, P. & Henquin, J. Mechanisms and Physiological Significance of the Cholinergic Control of Pancreatic β -Cell Function. *Endocr. Rev.* **22**, 565–604 (2001).
20. Gautam, D. *et al.* Role of the M3 muscarinic acetylcholine receptor in beta-cell function and glucose homeostasis. *Diabetes. Obes. Metab.* **9 Suppl 2**, 158–169 (2007).
21. Ahrén, B. Autonomic regulation of islet hormone secretion - Implications for health and disease. *Diabetologia* **43**, 393–410 (2000).
22. Boschero, a C. *et al.* Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. *Am. J. Physiol.* **268**, E336–E342 (1995).
23. Gilon, P. & Henquin, J. Mechanisms and Physiological Significance of the Cholinergic Control of Pancreatic β -Cell Function Mechanisms and Physiological Significance of the Cholinergic Control of Pancreatic β -Cell Function. *Endocr. Rev.* **22**, 565–604 (2001).
24. Kahn, S. E., Hull, R. L. & Utzschneider, K. M. Mechanisms linking obesity

- to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **444**, 840–846 (2006).
25. Wang, H. X. *et al.* Effects of splenectomy on spontaneously chronic pancreatitis in *aly/aly* mice. *Clin. Dev. Immunol.* **2010**, (2010).
 26. Leite, N. D. C. *et al.* Splenectomy attenuates obesity and decreases insulin hypersecretion in hypothalamic obese rats. *Metabolism.* **64**, 1122–1133 (2015).
 27. Cucak, H., Grunnet, L. G. & Rosendahl, A. Accumulation of M1-like macrophages in type 2 diabetic islets is followed by a systemic shift in macrophage polarization. **95**, 149–160 (2014).
 28. Gotoh, K. *et al.* Spleen-Derived Interleukin-10 Downregulates the Severity of High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease. *PLoS One* **7**, 1–13 (2012).
 29. Kilkeny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M. & Altman, D. G. Improving Bioscience Research Reporting : The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. **8**, 6–10 (2010).
 30. Duivenvoorden, I. *et al.* Obesity and Aggravated Insulin Resistance in Mice. *Diabetes* **54**, 664–71 (2005).
 31. Miranda, R. A., Torrezan, R., Oliveira, J. C. De & Barella, L. F. HPA axis and vagus nervous function are involved in impaired insulin secretion of MSG-obese rats. (2016). doi:10.1530/JOE-15-0467
 32. Patterson, L. L. B. and B. D. Carcass Fat Content in Weanling and Adult Female Rats With Hypothalamic Lesions J [*J. Endocrinol.* **40**, 527–528 (1968).
 33. Edvell, A. & Lindström, P. Vagotomy in young obese hyperglycemic mice: effects on syndrome development and islet proliferation. *Am. J. Physiol.* **274**, E1034-9 (1998).
 34. Lacy, P. E., Kostianovsky, M. & Louis, S. Method for the Isolation of Intact Islets of Langerhans from the Rat Pancreas. 35–39
 35. Grassioli, S., Bonfleur, M. L., Scomparin, D. X., Cezar, P. & Mathias, D. F. Pancreatic Islets from Hypothalamic Obese Rats Maintain K⁺ ATP Channel-Dependent but Not -Independent Pathways on Glucose-Induced Insulin Release Process. *Endocrine* **30**, 191–196 (2006).
 36. Lee, E. Y. *et al.* Triglyceride glucose index, a marker of insulin resistance, is associated with coronary artery stenosis in asymptomatic subjects with

- type 2 diabetes. *Lipids Health Dis.* **15**, 1–7 (2016).
37. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
 38. Balbo, S. *et al.* Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. *Endocrine* **31**, 142–148 (2007).
 39. Huston, J. M. The Vagus Nerve and the Inflammatory Reflex: Wandering on a New Treatment Paradigm for Systemic Inflammation and Sepsis. *Surg. Infect. (Larchmt)*. **13**, 187–193 (2012).
 40. Scomparin, D. X. *et al.* Autonomic activity and glycemic homeostasis are maintained by precocious and low intensity training exercises in MSG-programmed obese mice. *Endocrine* **36**, 510–517 (2009).
 41. Geerling, J. J. *et al.* Sympathetic nervous system control of triglyceride metabolism : novel concepts derived from recent studies. **55**, (2014).
 42. López-soldado, I., Fuentes-romero, R. & Duran, J. Effects of hepatic glycogen on food intake and glucose homeostasis are mediated by the vagus nerve in mice. 1076–1083 (2017). doi:10.1007/s00125-017-4240-4
 43. Dezfuli, G. *et al.* Subdiaphragmatic Vagotomy With Pyloroplasty Ameliorates the Obesity Caused by Genetic Deletion of the Melanocortin 4 Receptor in the Mouse. **12**, 1–16 (2018).
 44. Inoue, S. & Bray, G. A. The Effects of Subdiaphragmatic Vagotomy in Rats With Ventromedial Hypothalamic Obesity. 108–114 (1976).
 45. Rajbhandari, P. *et al.* IL-10 Signaling Remodels Adipose Chromatin Architecture to Limit Thermogenesis and Energy Expenditure. *Cell* **172**, 218–233.e17 (2018).
 46. Ueno, H. & Nakazato, M. Mechanistic relationship between the vagal afferent pathway, central nervous system and peripheral organs in appetite regulation. *J. Diabetes Investig.* **7**, 812–818 (2016).
 47. Peters, J. H., Gallaher, Z. R., Ryu, V. & Czaja, K. Withdrawal and restoration of central vagal afferents within the dorsal vagal complex following subdiaphragmatic vagotomy. *J. Comp. Neurol.* **521**, 3584–3599 (2013).
 48. Borovikova, L. V *et al.* Vagus nerve stimulation attenuates the systemic in

- flammatory response to endotoxin. **405**, (2000).
49. George, J. A. *et al.* Cholinergic Stimulation Prevents the Development of Autoimmune Diabetes: Evidence for the Modulation of Th17 Effector Cells via an IFN γ -Dependent Mechanism. **7**, (2016).
 50. Zou, J. *et al.* Ethylenecarbodiimide-fixed splenocytes carrying whole islet antigens decrease the incidence of diabetes in NOD mice via down-regulation of effector memory T cells and autoantibodies. 1–10
doi:10.1507/endocrj.EJ18-0158
 51. Lori, A., Perrotta, M., Lembo, G. & Carnevale, D. The Spleen : A Hub Connecting Nervous and Immune Systems in Cardiovascular and Metabolic Diseases. **4**, (2017).
 64. Lorenzo-Martin, L.F. *et al.* Vagal afferents contribute to sympathoexcitation driven metabolic dysfunctions. *Endocrinology*. **3**, 483–496 (2019).
 65. Powley, T.L., Opsahl, C.A. Ventromedial hypothalamic obesity abolished by subdiaphragmatic vagotomy. *American Journal of Physiology*. **226**, 25–33 (1974).
 66. Ley, E.J. *et al.* Long-term effect of trauma splenectomy on blood glucose. *The Journal of surgical research*. **117**, 152-156 (2012).

FIGURES AND TABLES

Table 1. Table 1. Effect of vagotomy, associated or not with splenectomy, on growth and WAT content of male Wistar rats at 150 days of age.

Parameters	SHAM	SPL	VAG	VAG+SPL	P value SPL	P value VAG	P value Interaction
Body Weight (g)	422±08 ^{c,d}	404±10 ^{c,d}	371±09 ^{a,b}	368±07 ^{a,b}	0.2401	< 0.0001	0.4014
Naso-anal Length (cm)	23.16±0.12 ^{c,d}	23.00±0.20 ^c	22.05±0.20 ^{a,b}	22.45±0.20 ^a	0.5354	< 0.0001	0.1385
Lee Index	0.32±0.002	0.31±0.003	0.32±0.002	0.31±0.002	0.0074	0.9191	0.4337
Retroperitoneal Fat (g/100g)	0.95±0.19 ^{c,d}	0.55±0.07	0.34±0.04 ^a	0.42±0.06 ^a	0.1545	0.0013	0.031
Perigonadal Fat (g/100g)	1.24±0.16 ^c	1.10±0.12	0.69±0.06 ^a	0.86±0.12	0.9109	0.0025	0.2091
Inguinal Fat (g/100g)	0.24±0.03	0.34±0.04 ^{c,d}	0.19±0.03 ^b	0.22±0.02 ^b	0.0596	0.0099	0.2358
Mesenteric Fat (g/100g)	0.97±0.05 ^c	0.99±0.06 ^c	0.66±0.08 ^{a,b}	0.77±0.07	0.3599	0.0004	0.5477
Spleen (g/100g)	0.15±0.008		0.13±0.006			0.2756 [#]	

Data are means ± SEM of n=11 rats per group. Two-way ANOVA. S: SPL factor; V: VAG factor and I: Interaction VAG x SPL. Letters above numbers represent statistical difference by Tukey post-test (p<0.05): ^a SHAM - sham operated; ^b SPL: splenectomized; ^c VAG: vagotomized; ^d VAG + SPL: vagotomized and splenectomized

Table 2. Effect of vagotomy, associated or not with splenectomy, on plasma biochemical parameters in male Wistar rats at 150 days of age.

Parameters	SHAM	SPL	VAG	VAG+SPL	P value SPL	P value VAG	P value Interaction
Glycemia (mg/dL)	78±04 ^b	64±03 ^a	72±03	69±03	0.0122	0.8222	0.0916
Insulinemia (ng/mL)	0.14±0.02	0.11±0.03	0.20±0.03	0.19±0.03	0.5471	0.0087	0.7542
Cholesterol (mg/dL)	153±11 ^{c,d}	220±24	262±31 ^a	254±29 ^a	0.2511	0.0082	0.1558
Triglycerides (mg/dL)	144±09 ^{c,d}	128±06	108±07 ^a	101±09 ^a	0.1515	0.0002	0.5955

Data are means ± SEM of n= 10-17 rats per group. Two-way ANOVA. S: SPL factor; V: VAG factor and I: Interaction VAG x SPL. Letters above numbers represent statistical difference by Tukey post-test (p<0.05): ^a SHAM – sham operated; ^b SPL: splenectomized; ^c VAG: vagotomized; ^d VAG + SPL: vagotomized and splenectomized.

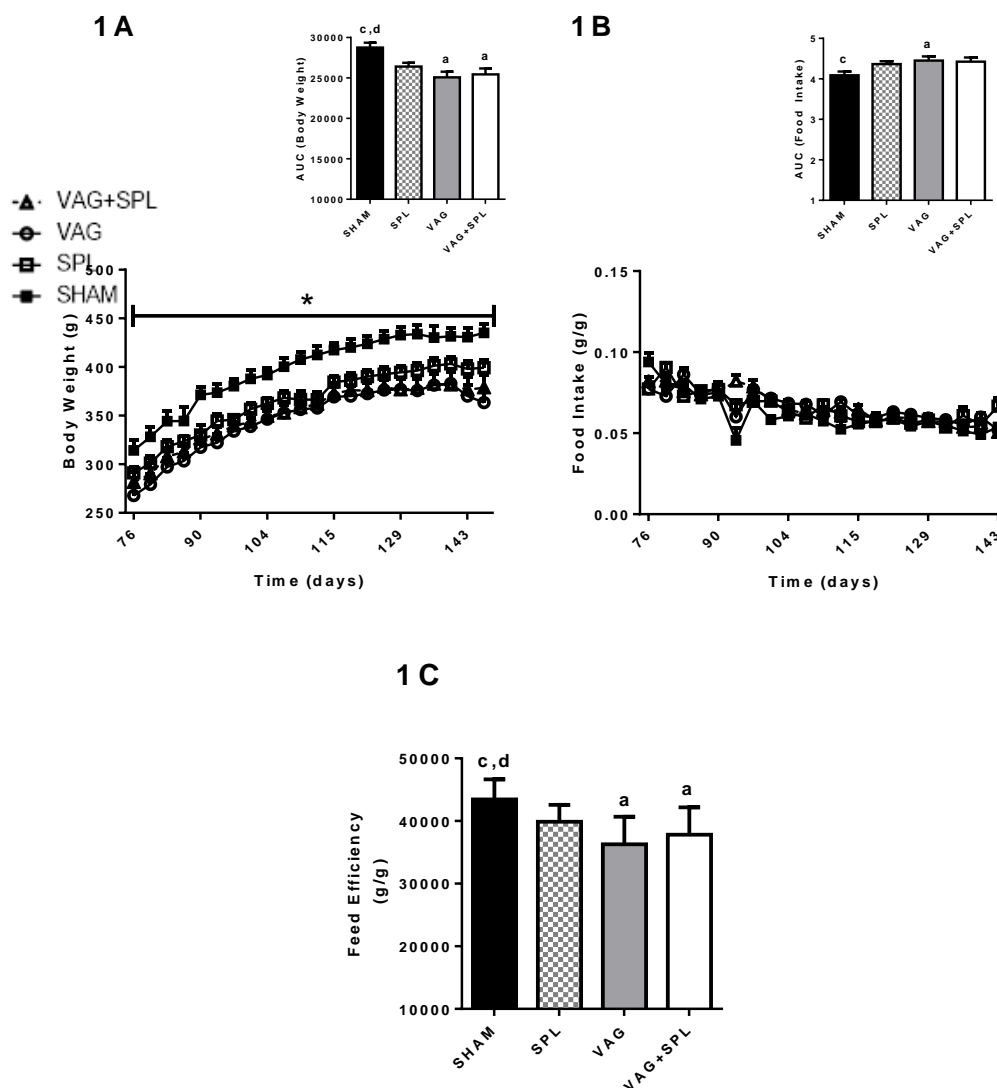


Figure 1: Evolution of body weight, food intake and feed efficiency in male Wistar rats submitted to vagotomy, associated or not with splenectomy.

Data are means \pm SEM of $n = 8-11$ rats per group. The curve evolution of body weight (1a), food intake (1b), the areas under the curve (AUC) (1c; 1d), and the Feed efficiency (1e) $[\Delta\text{Peso (g)} / \Sigma \text{ food ingestion (g)} * 100]$ were evaluated from 76 to 146 days of life. Two-way ANOVA (S: SPL factor; V: VAG factor and I: Interaction VAG x SPL). Letters represent statistical differences between the groups: ^a SHAM - sham operated; ^b SPL: splenectomized; ^c VAG: vagotomized; ^d VAG + SPL: vagotomized and splenectomized in Tukey test post ($p < 0.05$).

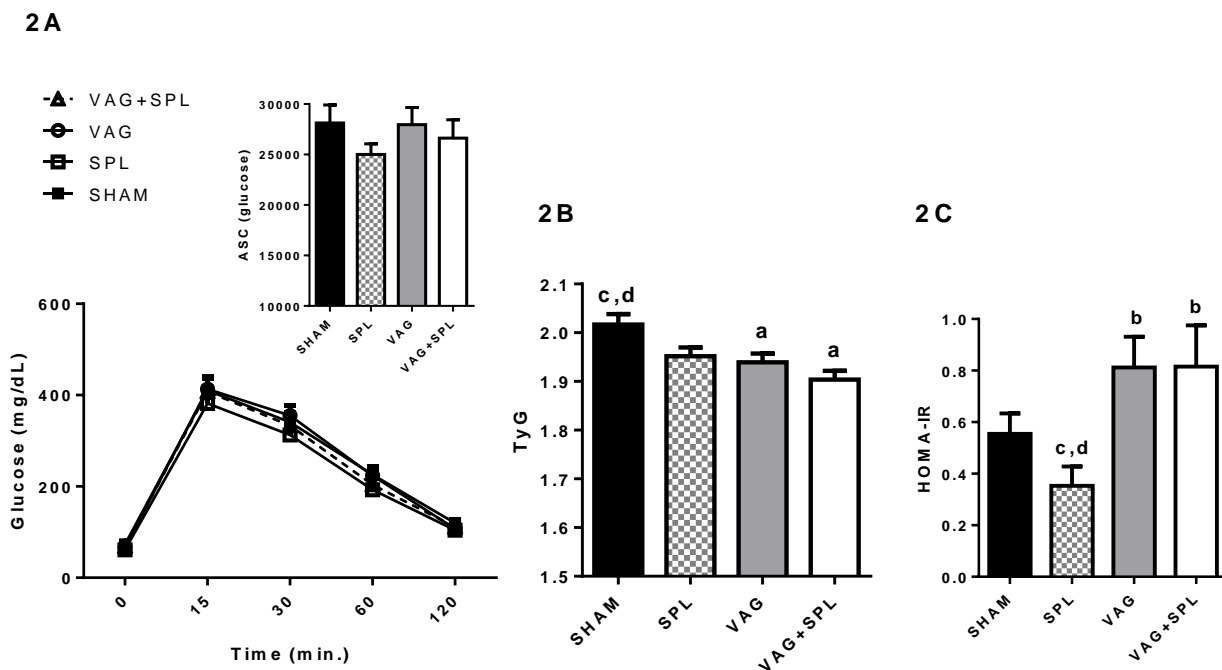
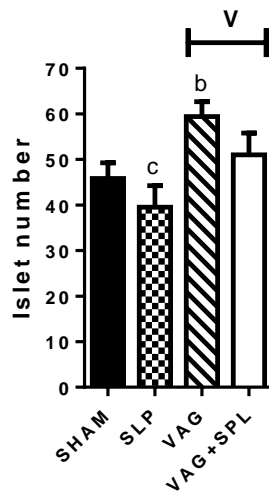


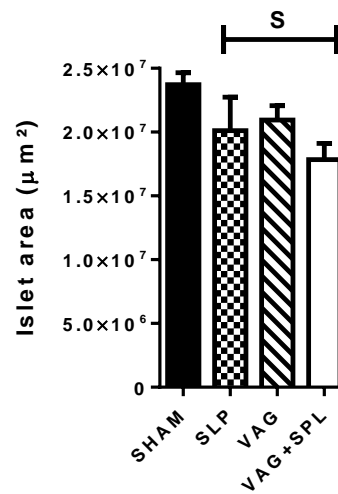
Figure 2: Impact of vagotomy, associated or not with splenectomy, on glucose tolerance and insulin resistance in male Wistar at 150 days of age.

Data are means \pm SEM of $n = 8-11$ rats per group. (2a) The delta (Δ) of glucose during ipGTT and respective AUC at 145 days old (2b). (2c) TyG-index. Two-way ANOVA (S: SPL factor; V: VAG factor and I: Interaction VAG x SPL). The letters above numbers represent statistical difference by the Tukey post-test ($p < 0.05$): ^a SHAM - sham operated; ^b SPL: splenectomized; ^c VAG: vagotomized; ^d VAG + SPL: vagotomized and splenectomized.

3 a



3 b



3 c

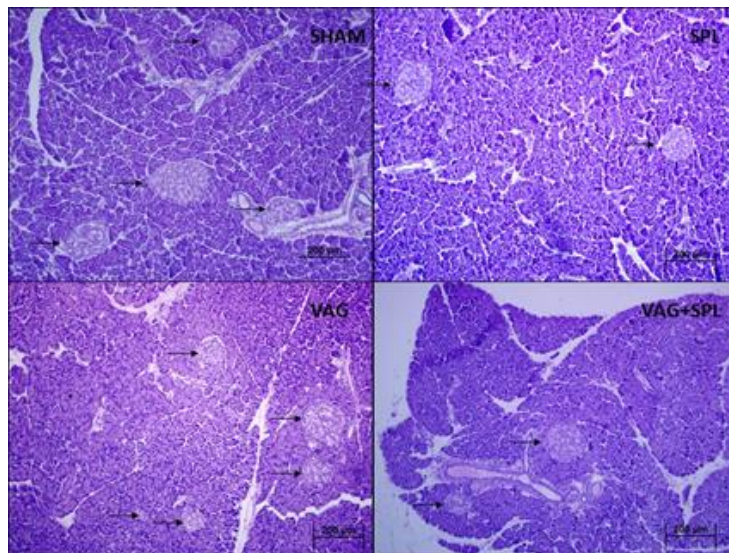


Figure 3: Pancreas histology of Wistar male rats submitted to vagotomy, associated or not with splenectomy.

Data are means \pm SEM of $n = 5-6$ rats per group. (3a) Islet numbers (3b) Islet area (μm^2). (3c) Representative photomicrography of endocrine pancreas, 10X, stained with H&E. Black arrows indicate pancreatic islets. Two-way ANOVA (S: SPL factor; V: VAG factor and I: Interaction VAG x SPL). Letters represent statistical differences between the groups: ^a SHAM - sham operated; ^b SPL: splenectomized; ^c VAG: vagotomized; ^d VAG + SPL: vagotomized and splenectomized, by Tukey test post ($p < 0.05$).

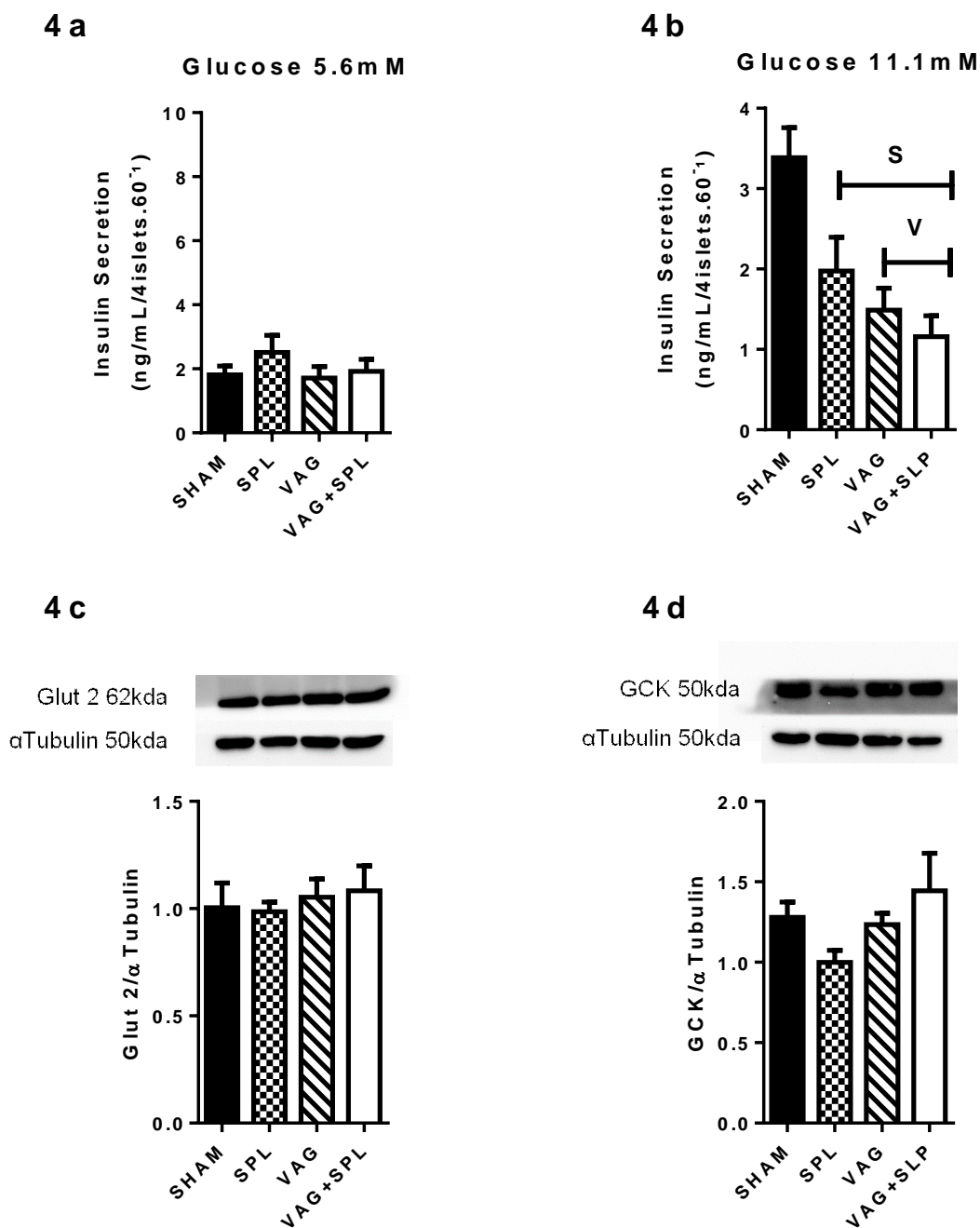


Figure 4: Glucose-stimulated insulin secretion and protein expression in pancreatic islets isolated from splenectomized and vagotomized male Wistar rats at 150of age.

Data are means \pm SEM of $n = 4-6$ rats per group. Pancreatic islets were incubated at low glucose (5.6mM; 4a) and high glucose (11.1mM; 4b) concentrations. Glut 2 (4c) and Glucokinase (GCK; 4d) expressions in isolated pancreatic islets. The values of protein expression were normalized by α Tubulin. Two-way ANOVA (S: SPL factor; V: VAG factor and I: Interaction VAG x SPL).

Letters represent statistical differences between the groups: ^a SHAM – sham operated; ^b SPL: splenectomized; ^c VAG: vagotomized; ^d VAG + SPL: vagotomized and splenectomized by Tukey test post ($p < 0.05$).

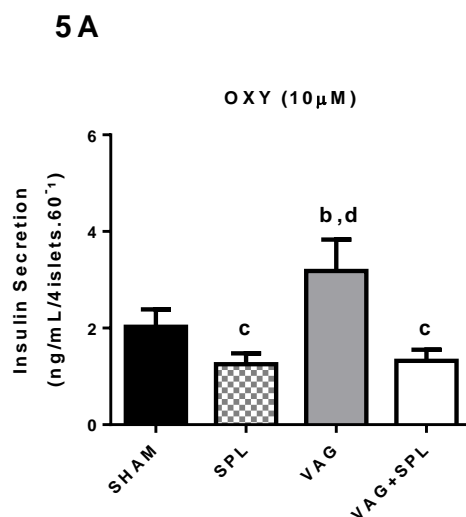


Figure 5: Neural vagus nerve activity in male Wistar rats submitted to vagotomy, associated or not with splenectomy.

Data are means \pm SEM of $n = 4-5$ rats per group. (5a) Spikes in 5 seconds. Two-way ANOVA (S: SPL factor; V: VAG factor and I: Interaction VAG x SPL). Letters represent statistical differences between the groups: ^a SHAM - sham operated; ^b SPL: splenectomized; ^c VAG: vagotomized; ^d VAG + SPL: vagotomized and splenectomized in Tukey test post ($p < 0.05$).

6

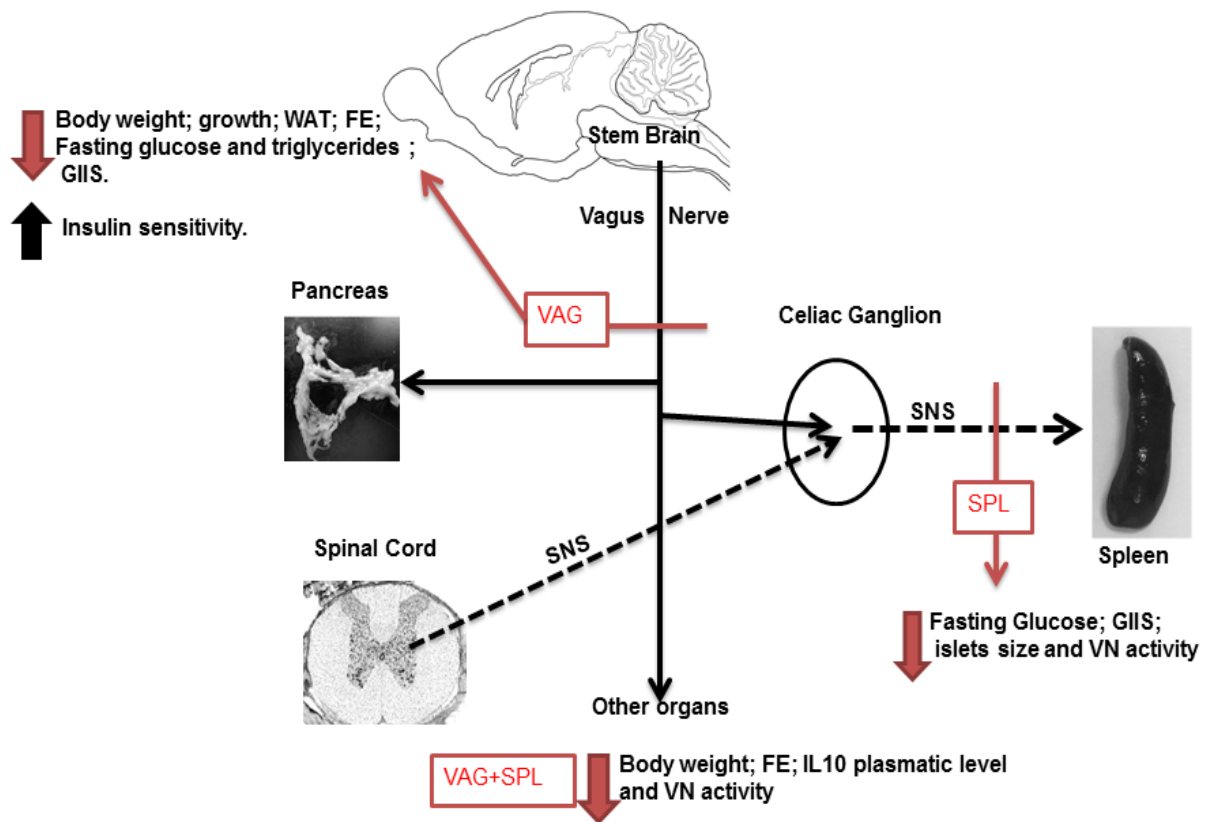


Figure 6: Summary of the surgical effects.

Continuous black arrows indicate parasympathetic nervous system pathway, dotted arrows indicate sympathetic nervous system action. Orange arrows symbolize the interruption of nerve communication by the surgical procedure. Downward arrows indicate the reduction of parameters as an effect of surgery, and upward arrows indicate that the parameter increases as an effect of surgery. FE: feed efficiency. GIIS: glucose induced insulin secretion; SNS: sympathetic nervous system; SPL: splenectomy; VAG: subdiaphragmatic vagotomy; VAG+SPL subdiaphragmatic vagotomy and splenectomy. VN vagus nerve. WAT white adipose tissue.

ANEXO A: Autorização do CEUA



Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

Autorização

O protocolo intitulado “**A interação bi-direcional entre atividade autonômica e esplênica pode modular o controle secretor de insulina em ratos obesos-msg?**”, sob a responsabilidade de **Sabrina Grassioli** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 09/06/2017.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	20/06/2017 - 01/08/2018
Espécie/linhagem/raça	Ratos Wistar
N. de animais	40
Peso/Idade	150 a 200g (Prenhas)
Sexo	Feminino
Origem	Biotério Central Unioeste – Campus Cascavel

Cascavel, 20/06/2017

Prof. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 3730/2016 - GRE