

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – CAMPUS
DE FRANCISCO BELTRÃO, CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE,
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS
APLICADAS À SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

JOICE CRISTINA KUCHLER

**O IMPACTO DA VAGOTOMIA ASSOCIADA OU NÃO A
ESPLENECTOMIA SOBRE O TECIDO ADIPOSEO BRANCO DE
RATOS OBESOS E NÃO OBESOS**

FRANCISCO BELTRAO - PR

MARÇO/2021

JOICE CRISTINA KUCHLER

**O IMPACTO DA VAGOTOMIA ASSOCIADA OU NÃO A
ESPLENECTOMIA SOBRE O TECIDO ADIPOSEO BRANCO DE
RATOS OBESOS E NÃO OBESOS**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas à Saúde, nível Mestrado, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

ORIENTADORA: Dr^a Sabrina Grassioli

FRANCISCO BELTRAO - PR

MARÇO/2021

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Kuchler, Joice Cristina

O impacto da vagotomia associada ou não a esplenectomia sobre o tecido adiposo branco de ratos obesos e não obesos / Joice Cristina Kuchler; orientador(a), Sabrina Grassioli, 2021.

71 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Francisco Beltrão, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Enfermagem Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Ciências Aplicadas à Saúde, 2021.

1. vagotomia. 2. esplenectomia. 3. sistema nervoso autônomo. 4. obesidade. I. Grassioli, Sabrina. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

JOICE CRISTINA KUCHLER

**O IMPACTO DA VAGOTOMIA ASSOCIADA OU NÃO A ESPLENECTOMIA
SOBRE O TECIDO ADIPOSEO BRANCO DE RATOS OBESOS E NÃO OBESOS**

Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde e aprovada em sua forma final pela Orientadora e pela Banca Examinadora.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dra. Sabrina Grassioli
Universidade Estadual do Oeste do Paraná-Campus de Francisco Beltrão

Professora Dra. Léia Carolina Lucio
Universidade Estadual do Oeste do Paraná-Campus de Francisco Beltrão

Professor Dr. Thiago Rentz Ferreira Laginski
Universidade de São Paulo

FRANCISCO BELTRAO - PR

MARÇO/2021

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser o alicerce de toda minha caminhada e ser presença real e constante em minha vida. Obrigada por tua mão a me segurar: sem fé eu nada seria.

À minha orientadora Dr^a Sabrina Grassioli. Por sua sensatez frente às suas e minhas atitudes, por me repassar problemas muitas vezes apenas depois que os mesmos já tinham uma esperança de resolução, por me contagiar com seu amor pela pesquisa, por me provar que mesmo frente a condições adversas temos a capacidade de ter autoria de nossa própria história.

À Bruna Siqueira e Jean Vettorazzi, por serem excelentes pesquisadores, pela resiliência frente às adversidades que se evidenciaram ao longo da jornada, e sem dúvida pela tolerância diante de minhas limitações: Meu muito obrigada! A contribuição de ambos nessa pesquisa tem um valor inquestionável.

Ao corpo docente, equipe de coordenação e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde da UNIOESTE – Campus de Francisco Beltrão, bem como aos integrantes da iniciação científica, em especial a Bruna, Isllany e Fernanda, e a excelente equipe do Laboratório de Fisiologia e Metabolismo – UNIOESTE, Campus de Cascavel. Sem vocês esse projeto não seria possível.

Ao melhor amigo e marido Edeimar da Rosa. Pela compreensão de minhas ausências constantes, por me dar a mão frente à busca de meus sonhos e conquistas, e por continuar me impulsionando mesmo quando as mesmas não eram alcançadas.

Um amado agradecimento à minha família, em especial a meu pai e minha mãe onde estão meus maiores exemplos de conduta. Pelas orações mais sinceras, pelo brilho evidenciado em seus olhos quando disse que um dia venceria: Meu muito obrigada.

E por fim, o mais intenso agradecimento a cada um dos Wistar, que abriram o caminho das possibilidades de experimentação e das descobertas deste estudo.

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação à minha irmã
Gisele Caroline Kuchler: tenha em si,
todos os sonhos do mundo.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABESO: Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica	M _{VAG+ESP} : MSG esplenectomizado e vagotomizado
ANS: Agência Nacional de Saúde Suplementar	OMS: Organização Mundial da Saúde
AGL: ácidos graxos livres	RI: resistência à insulina
C: controle	SNA: Sistema nervoso autônomo
C-ESP: Controle esplenectomizado	SM: Síndrome Metabólica
CEUA: Comitê de Ética e Uso de Animais	TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa
C _{FC} : Controle falsa cirurgia	TA: Tecido Adiposo
CNA: Comprimento nasoanal	TAB: Tecido adiposo branco
C _{VAG} : Controle vagotomizado	TAM: Tecido adiposo marrom
C _{VAG+ESP} : Controle esplenectomizado e vagotomizado	TG: triglicerídeos
DM II: diabetes Mellitus tipo II	UNIOESTE: Universidade Estadual do Oeste do Paraná
DCNT: doenças crônicas não transmissíveis	WB: Western Blotting
E: Eosina	VAG: Vagotomia
H: Hematoxilina	
IGF-1: fator de crescimento semelhante a insulina	
IMC: índice de massa corporal	
IL-1: interleucina 1	
IL-1 α : interleucina 1 alfa	
IL-10: Interleucina 10	
LAFEM: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo	
M _{ESP} : MSG esplenectomizado	
M _{FC} : MSG falsa cirurgia	
MSG: Glutamato monossódico	
M _{VAG} : MSG vagotomizado	

O impacto da vagotomia associada ou não a esplenectomia sobre o tecido adiposo branco de ratos obesos e não obesos

Resumo

O nervo vago e o baço representam uma interface complexa entre as funções neurais e imunológicas com repercussão no metabolismo energético e no conteúdo de tecido adiposo branco (TAB). Neste trabalho, avaliamos o efeito da vagotomia associada à esplenectomia no conteúdo do TAB, histologia e expressão da interleucina 10 (IL-10) em ratos Wistar machos com obesidade hipotalâmica ou não. A obesidade hipotalâmica foi induzida pela administração neonatal de glutamato monossódico (M; 4g / Kg). Ratos não obesos ou controle (CTL) receberam solução salina equimolar. Aos 60 dias de vida, ratos M-obesos e CTL foram distribuídos aleatoriamente em subgrupos experimentais de acordo com o procedimento cirúrgico: simulação; vagotomia subdiafragmática (VS); esplenectomia (ESP) e VS + ESP (n = 11 ratos / grupo). Aos 150 dias de vida e após 12h de jejum, os ratos foram sacrificados, o sangue foi coletado, os depósitos viscerais e subcutâneos foram excisados, pesados e submetidos ao processo histológico, com análises do número e tamanho dos adipócitos e expressão proteica de IL-10. Os ratos M-obesos apresentaram maior adiposidade, níveis plasmáticos de IL-10, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e resistência à insulina em relação aos grupos CTL ($p < 0,05$). Em ratos CTL e M-obesos, o VS reduziu o ganho de peso corporal e os níveis de triglicérides diminuindo o tamanho dos adipócitos sem alterar a expressão de IL-10 no TAB ($p < 0,05$). A ausência do baço previne os efeitos de VS na adiposidade e metabolismo em animais CTL, mas não em ratos M-obesos. A VS aumentou os níveis plasmáticos de IL-10 no grupo CTL, uma resposta evitada pela ausência do baço. Nem as cirurgias VS e/ou ESP modificam os níveis plasmáticos de IL10 em ratos M-obesos. Em conclusão, a vagotomia promove redução do peso corporal e da adiposidade, elevando os níveis plasmáticos de IL-10 em animais não obesos, ações essas que dependem da presença do baço. Em condições de obesidade, a vagotomia também reduz o peso corporal, a adiposidade e melhora a sensibilidade à insulina sem alterar os níveis plasmáticos de IL-10. No entanto, observou-se que

em condições de obesidade, o baço não participa dos efeitos da vagotomia. Assim, evidenciamos de forma inédita que o metabolismo e a massa gorda são regulados por diversos mecanismos de interação entre a atividade vagal e esplênica em condições de saúde e obesidade.

Palavras-chave: vagotomia, esplenectomia, sistema nervoso autônomo, obesidade.

The impact of vagotomy associated or not with splenectomy on the white adipose tissue of obese and non-obese rats

Abstract

The vagus nerve and the spleen represent a complex interface between neural and immunological functions with repercussions on energy metabolism and on the content of white adipose tissue (WAT). In this work, we evaluated the effect of vagotomy associated with splenectomy on the content of WAT, histology and expression of interleukin 10 (IL-10) in male Wistar rats with hypothalamic obesity or not. Hypothalamic obesity was induced by neonatal administration of monosodium glutamate (M; 4g / Kg). Non-obese or control rats (CTL) received equimolar saline. At 60 days of age, M-obese and CTL rats were randomly assigned to experimental subgroups according to the surgical procedure: simulation; subdiaphragmatic vagotomy (SV); splenectomy (SPL) and SV + SPL (n = 11 rats / group). At 150 days of life and after 12 hours of fasting, the rats were sacrificed, blood was collected, visceral and subcutaneous deposits were excised, weighed and related to the histological process, with analysis of the number and size of adipocytes and protein expression of IL-10. M-obese rats aggregated greater adiposity, plasma levels of IL-10, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia and insulin resistance in relation to the CTL groups (p <0.05). In CTL and M-obese rats, SV reduced body weight gain and triglyceride levels by decreasing the size of adipocytes without altering IL-10 expression in TAB (p <0.05). The absence of the anterior spleen the effects of VS on adiposity and metabolism in CTL animals, but not in M-obese rats. SV increased plasma levels of IL-10 in the CTL group, a response avoided by the absence of the spleen. Neither VS and/or ESP surgeries modify the plasma levels of IL-10 in M-obese rats. In conclusion, vagotomy promotes a reduction in body weight and adiposity, increasing plasma levels of IL-10 in non-obese animals, actions that depend on the presence of the spleen. Under conditions of obesity, vagotomy also reduces body weight, adiposity and improves insulin sensitivity without altering plasma levels of IL-10. However, it was observed that in conditions of obesity, the spleen does not participate in the effects of

vagotomy. Thus, we have shown in an unprecedented way that metabolism and fat mass are regulated by several mechanisms of interaction between vagal and splenic activity in conditions of health and obesity.

Keywords: vagotomy, splenectomy, autonomic nervous system, obesity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1	Obesidade: definição e epidemiologia.....	16
1.2	Obesidade Hipotalâmica	18
1.3	Tecido adiposo: Morfologia e fisiologia	20
1.4	Nervo Vago e Baço: repercussões sobre o TAB.....	26
2	OBJETIVOS.....	32
2.1	Objetivo geral.....	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	METODOLOGIA	33
3.1	Animais	33
3.2	Obesidade Hipotalâmica	33
3.3	Protocolos de cirurgia.....	34
3.4	Parâmetros biométricos e de plasma.....	35
3.5	Análise Histológica WAT	36
3.6	Western Blotting	36
3.7	Análise estatística	37
4	REFERÊNCIAS	38
5	The vagus nerve and spleen: influences in white adipose mass and histology in obese and non-obese rats.....	46
6	ANEXOS.....	69

1 INTRODUÇÃO GERAL

Reconhecida oficialmente como doença em 1985 pelo National Institute of Health (DO PRADO et al., 2009), a obesidade é uma patologia crônica e multifatorial caracterizada pelo excesso de gordura corporal, sendo considerada pela OMS como um dos maiores problemas de saúde em todo mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Em humanos, a obesidade pode ser definida pelo Índice de massa corporal (IMC), cujo valor seja igual ou superior a 30 Kg/m² (ANS, 2017).

Atualmente sabe-se que a obesidade não apenas reduz a qualidade e a expectativa de vida, como também está associada a um risco elevado de várias patologias como Doenças Cardiovasculares (DCV), com destaque a hipertensão, rompimento na homeostase glicêmica e Resistência Insulina (RI) que favorecem a instalação do Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2), além de diferentes tipos de câncer (CHU et al., 2018).

De acordo com Rao (2018) mais de 2,1 bilhões de indivíduos são obesos em todo o mundo, equivalendo a 30% da população mundial. Simultaneamente, todas as doenças metabólicas diretamente relacionadas a obesidade, atingiram proporções epidêmicas na atualidade. Em concordância com o panorama mundial, dados da Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL) mostram que no Brasil a frequência de excesso de peso é de 55,4% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

A Associação Brasileira para o estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO) (2016), afirma que a etiologia de tal condição adv da interação de fatores ambientais, comportamentais, alterações endócrinas e aspectos genéticos. Nesse sentido, destaca-se que o atual modelo socioeconômico, que favorece ingestão excessiva de calorias e propicia um ambiente sedentário tem forte contribuição para o ganho de peso ao longo da vida (BLÜHER, 2019).

Independente da fase da vida, o excesso de Tecido Adiposo (TA) corporal será responsável pelo rompimento do estado de saúde, visto que, além de depósito de gordura o TA tem forte ação endócrina (LACERDA; MALHEIROS; ABREU, 2016). Neste contexto, uma característica frequentemente encontrada na obesidade

é o estado inflamatório crônico de baixo grau, acarretado pela secreção de altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias pelos adipócitos do TA. Deste modo, quanto mais hipertrofiado for o adipócito, maior ação secretora pró-inflamatória. Adicionalmente, a expansão de depósitos de TA, em especial na região visceral, eleva o o risco para Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) quando comparado a expansão da massa adiposa subcutânea (GUSTAFSON; SMITH, 2015).

O Tecido Adiposo Branco (TAB) é considerado um dos maiores órgãos do corpo, representando 10% a 20% do peso corporal total em adultos magros, podendo chegar a 70% em indivíduos obesos. Tal tecido é distribuído em vários depósitos, localizados em compartimentos principais: gordura subcutânea (80% a 90% da gordura corporal) e visceral (10% da gordura corporal). Fisiologicamente, ao coletar lipídios e glicose em excesso da circulação, o TAB protege outros tecidos do acúmulo patológico de TG. Em contrapartida, quando essa capacidade de armazenamento está ineficiente, os lipídios em excesso poderão ser depositados em locais ectópicos, tais como fígado e músculo esquelético, resultando em inflamação local, RI e problemas metabólicos (HEINONEN et al., 2020).

O TAB pode se expandir através de um aumento no tamanho dos adipócitos (hipertrofia) ou pela elevação no número de tais células (hiperplasia). Sabe-se que a hipertrofia dos adipócitos está intimamente ligada à disfunção do tecido, sendo um dos principais componentes da síndrome metabólica (SM) em indivíduos obesos (WANG et al., 2013). Esse aspecto morfológico do TAB se caracteriza pela elevação tanto dos níveis de Proteína C Reativa (PCR), quanto da secreção de interleucinas (IL) pró-inflamatórias, relacionando-se diretamente ao prognóstico de risco cardiometabólico (KLÖTING; BLÜHER, 2014). Dentre as citocinas pró-inflamatórias circulantes mais frequentes no TAB hipertrofiado, destacam-se a interleucina 1 (IL-1) e o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) (CASTILLO-HERNANDEZ et al., 2017). Em contraste, os níveis de Interleucina 10 (IL-10) e da adiponectina consideradas anti-inflamatórias encontram-se frequentemente diminuídos nesse cenário (PIROLA; FERRAZ, 2017).

O rompimento da homeostase energética é também frequentemente acompanhado de alterações do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), sendo observado uma redução na função simpática, paralelamente a uma maior atividade do Sistema Nervoso Parassimpático (SNP). Resultando, entre outras coisas em uma constante hiperatividade vagal, com impacto direto no equilíbrio energético (BALBO et al., 2016).

A elevada atividade vagal, em particular para o pâncreas endócrino resulta em hiperinsulinemia (DEZFULI et al., 2018), que quando persistente provoca expansão da massa do TAB e RI, fatores centrais da obesidade e a DM2. Nesse sentido, a Sociedade Americana de Cirurgia Metabólica e Bariátrica ressalta que o nervo vago se relaciona diretamente a secreção endócrina e exócrina pancreática e com o controle glicêmico, de forma que seu bloqueio pode resultar em perda de peso em obesos (PAPASAVAS; EL CHAAR; KOTHARI, 2016).

A vagotomia subdiafragmática é hábil em reduzir a massa do TAB em diferentes modelos de obesidade em roedores e humanos (DEZFULI et al., 2018). Adicionalmente, técnicas que modulam a atividade vagal resultaram em melhora na homeostase glicêmica e no controle energético (APOVIAN et al., 2017; SEBAEI; YOUSOF; ABDO, 2020). Portanto, há importante efeito mediado pelo nervo vago sobre o metabolismo e expansão da massa do TAB.

Estudos mais recentes têm indicado que o nervo vago é também importante regulador da função imunológica, sendo considerado um dos principais constituintes de um mecanismo de reflexo neural - o reflexo inflamatório. O envolvimento do baço nesse processo vem sendo descrito, onde uma cooperação entre a função do nervo vago e a sinalização catecolaminérgica esplênica regula o desenvolvimento da imunidade humoral, modulando o tráfego celular e a arquitetura linfóide (PAVLOV; TRACEY, 2017).

A relação entre atividade vagal e resposta imune esplênica apresenta importante e inovador aspecto na compreensão do estado pró-inflamatório da obesidade. Neste contexto, o baço sofre alterações funcionais diante da obesidade, incluindo esplenomegalia, acúmulo de lipídios no tecido esplênico e altera função imunológica. Por exemplo, a secreção esplênica de IL-10, importante citocina anti-

inflamatória torna-se diminuída em camundongos obesos por dieta rica em gordura (GOTOH et al., 2012a). Finalmente, citocinas esplênicas modulam a atividade de outros órgãos, incluindo o TAB e o pâncreas endócrino. Leite e Colaboradores (2015) já demonstraram que a esplenectomia foi capaz de atenuar a progressão da obesidade através de modificações nas funções moduladoras do pâncreas em ratos obesos induzidos com Glutamato monossódico (MSG). Logo, parece haver um elo funcional entre as respostas imunes do TAB e do baço, sendo que ambos os processos podem ser influenciados pela atividade vagal.

1.1 Obesidade: definição e epidemiologia

A obesidade caracteriza-se pelo excesso de gordura corporal advinda do crescimento excessivo dos adipócitos, em particular do TAB, decorrente do excesso de calorias ingeridas ou não gastas (CARVALHO; CARVALHO; BRITO, 2016). Considerada um importante fator de risco para as DCNT, a obesidade apresenta impacto negativo na etiologia e agravo de diversas doenças (ANS, 2017); um processo que parece estar associado ao padrão de distribuição do TAB.

Existem diferentes ferramentas para avaliar a incidência de obesidade em humanos, sendo o IMC o método mais frequentemente utilizado. Todavia, como ressalta a ABESO (2016), uma importante limitação desta medida, é sua incapacidade de refletir a distribuição da gordura corporal. Dessa forma, recomenda-se associação do IMC com outros indicadores, tal como, a medida da circunferência abdominal, ou a ressonância abdominal, que melhor refletem o conteúdo de gordura visceral, visto ser um fator de risco potencial a diversos problemas de saúde, independentemente da gordura corporal total.

O excesso de peso corporal, incluindo a expansão do TAB, aumenta proporcionalmente com a idade, alcançando no Brasil 62,7% dos homens e 55,6% das mulheres entre 51 e 59 anos de idade. Tal quadro origina-se de um balanço energético positivo, favorecido por alterações no estilo de vida contemporâneo que se caracteriza pelo maior consumo de alimentos processados paralelamente ao sedentarismo (FLORIDO et al., 2019).

Em 2015 cerca de 600 milhões de adultos em todo o mundo eram obesos (COZIER; GOVENDER; BERMAN, 2018). Com a prevalência crescente de

tal patologia estimativas apontam que no mundo mais de 18% dos adultos serão acometidos pela obesidade até 2025 (O'BRIEN et al., 2017), um quadro que se reproduz na população brasileira. Segundo apontam os dados da VIGITEL no conjunto das capitais brasileiras juntamente com o distrito federal a frequência de obesidade foi de 20,3% em 2019 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

O impacto considerável da obesidade frente a saúde pública advém tanto de sua prevalência pandêmica, quanto de suas consequências frente a morbimortalidade. Afinal tal quadro aumenta o risco de DCNT, entre as quais, o DM2, a doença hepática gordurosa, a hipertensão, o infarto do miocárdio, os acidentes vasculares encefálico, demência, osteoartrite, entre outras patologias que repercutem diretamente na qualidade de vida (BLÜHER, 2019). De acordo com a OMS, a obesidade não é considerada apenas doença, como também é fator de risco para diversas doenças, que não se restringem agravos físicos, pois atingem também a esfera da saúde mental. Afinal, o preconceito enfrentado pelo indivíduo obeso pode se tornar um fator desencadeante para outros distúrbios alimentares, tais como bulimia nervosa e compulsão alimentar (FLORIDO et al., 2019).

Os múltiplos fatores causais da obesidade, que contribuem na grande complexidade dessa patologia, podem ser agrupados em três grandes grupos: biológicos, ambientais e comportamentais. Porém os dois últimos vem sendo apontados como responsáveis pelo aumento na prevalência de obesidade nas últimas duas décadas (KADOUH; ACOSTA, 2017). Dessa forma, cerca de 95% dos casos podem ser atribuídos a hábitos dietéticos, sedentarismo e fatores psicossociais. Enquanto apenas 5% dos indivíduos obesos exibirão alguma causa identificada sendo 2% associados a síndromes genéticas raras, e o restante a causas endócrinas e secundárias a medicamentos (ANS, 2017).

A expansão da massa adiposa tem como principais características fisiopatológicas o rompimento da homeostase glicêmica e lipidêmica, ambos resultados da RI. Assim a obesidade é considerada precursora do DM2, visto que, a maioria dos indivíduos que desenvolvem esta patologia são obesos ou tem excesso de peso (SALTIEL et al., 2017; SMITH; KAHN, 2016). A obesidade também contribui significativamente para o surgimento da dislipidemia (O'BRIEN et al., 2017). Tal

alteração no perfil lipídico acarreta alterações patológicas ao endotélio arterial, responsável pelo desenvolvimento de 56% das doenças cardíacas, estando associada a um terço dos casos de mortalidade a nível mundial (SILVA et al., 2018).

Em paralelo ao panorama do país, de acordo com o estudo da VIGITEL, realizado na capital do Paraná, estima-se uma frequência 19,4% de adultos obesos no estado em 2019 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Ressalta-se que por sua estreita relação com a condição de saúde, a obesidade tem impacto também na esfera econômica. No Brasil os custos de todas as doenças associadas a tal condição totalizam cerca de 2,1 bilhões de dólares por ano (CHU et al., 2018). Nesse sentido, a Federação Mundial da Obesidade (2017) afirma que o custo do tratamento de doenças relacionadas a obesidade será de 1,2 trilhão de dólares ao ano a partir de 2025, quando mais de 2,7 bilhões de pessoas serão obesas ou terão sobrepeso. Portanto, é evidente a necessidade da manutenção e aprofundamento dos estudos envolvendo a questão da massa adiposa, sua expansão e a saúde dos indivíduos.

1.2 Obesidade Hipotalâmica

O balanço energético é regulado por diferentes fatores metabólicos que sinalizam para o sistema nervoso o status energético do organismo. Tais sinais são integrados pelo hipotálamo através de circuitos neuronais envolvendo distintos núcleos interconectados. Dada a importância de tal órgão ao metabolismo energético, sabe-se que a obesidade hipotalâmica pode ocorrer em humanos (KREUTZER et al., 2017) e pode ser reproduzida, experimentalmente, por lesões, eletrolítica ou química, em regiões hipotalâmicas (CANTELLI et al., 2017). Entre os modelos de lesão química, destaca-se aquele obtido pela administração neonatal de glutamato monossódico (MSG), o qual promove degeneração neural do Núcleo Arqueado (ARQ). O ARQ é sede de controle da ingestão alimentar e do gasto energético, em particular por regular a atividade endócrina e autonômica periférica (TIMPER; BRÜNING, 2017). Consequentemente, a destruição do ARQ via MSG provoca, um desarranjo autonômico, com elevação da atividade vagal para o pâncreas e instalação de um quadro de hiperinsulinemia. Devido ao efeito lipogênico da insulina, há expansão do TAB, com RI, resultando em alterações

como dislipidemia, intolerância à glicose, e hiperleptinemia (COELHO et al., 2019). Por sua excessiva adiposidade e desenvolvimento de comorbidades similares a SM vista em humanos, este tem se tornado um importante modelo para estudo da fisiopatologia da obesidade (LEITE et al., 2015) (Leite et al. 2015).

Como mencionado anteriormente, a lesão no ARQ induzida pelo MSG, provoca elevação da atividade parassimpática ou hiperatividade vagal, a qual tem importante papel na excessiva adiposidade neste modelo. Neste contexto, a vagotomia subdiafragmática realizada em animais jovens (30 dias de vida) atenua a deposição de TAB em ratos MSG adultos (BALBO et al., 2007; SOUZA et al., 2001). A vagotomia subdiafragmática em ratos MSG promove normalização da insulina e reduz a massa adiposa (DEZFULI et al., 2018). Adicionalmente, diante desse modelo o ramo simpático parece estar reduzido, como demonstrado por Martins e colaboradores (MARTINS et al., 2004). Nesse sentido, a redução simpática implica em menor lipólise e menor gasto energético, contribuindo portanto para o ganho de peso e adiposidade em roedores MSG (ZENG et al., 2015).

A expansão da massa adiposa em roedores MSG é caracterizada por alterações histológicas e funcionais dos adipócitos. Zubiria et al. (2014) ressaltam que na obesidade MSG, há diminuição significativa na densidade celular do TAB, devido a um aumento no tamanho dos adipócitos no depósito retroperitoneal. Além disso, também foram observados no TAB de ratos MSG aumento da infiltração de macrófagos, e maior expressão de TNF- α e IL-6, sugerindo estado pro-inflamatório local. Paralelamente, animais obesos apresentaram maiores concentrações plasmáticas de TG, insulina, TNF- α e IL-6, evidenciando também um estado pró-inflamatório sistêmico (FURUYA et al., 2010). Adicionalmente, neste modelo há redução na concentração plasmática de IL10 (FALALYEYeva et al., 2017).

Diante do modelo MSG, a literatura descreve alterações frente a histologia esplênica onde observa-se um aumento na espessura de nódulos linfáticos, e uma redução na região de centro germinativo desse tecido (PAULO; AMORIM; GRASSIOLLI, 2019). Nesse contexto, Leite e Colaboradores (2015) evidenciaram que a esplenectomia de animais obesos MSG acarretou diminuição na hipersecreção de insulina, estabilização da resposta do óxido nítrico nas ilhotas

pancreáticas, melhora na sensibilidade à insulina e hipertrofia reduzida de adipócitos do TAB e ilhotas, quando comparados com ratos MSG não operados. Os resultados apontaram que tal procedimento pode atenuar a progressão da obesidade através de modificações nas funções moduladoras do pâncreas em ratos obesos com MSG, demonstrando a sinergia importante e funcional entre o baço e o pâncreas endócrino.

1.3 Tecido adiposo: Morfologia e fisiologia

O TA é um tipo de tecido conjuntivo altamente especializado na reserva e na produção energética. Frente a sua origem embrionária, o TA abdominal e subcutâneo do tronco e membros advém do folheto mesoderma. Durante o desenvolvimento embrionário, tal folheto diferencia-se originando os mesodermas paraxial e lateral, onde o paraxial irá formar adipócitos multiloculares, presentes no TAM e bege, enquanto TAB que ocorre na região abdominal origina-se da mesoderma lateral (BILLON et al., 2007; SYMONDS, 2017).

Apesar de ser conhecido previamente apenas por sua função relacionada ao isolamento térmico e reserva energética, à partir de 1987 o TAB passou a ser identificado como o maior sítio de metabolização de hormônios esteroides (DE; PINTO, 2014). Com descoberta da leptina na década de 90, a compreensão dos aspectos morfológicos e fisiológicos de tal tecido tem aumentado significativamente, de modo que estudos que descreveram a secreção dessa e diversas adipocinas possibilitaram sua caracterização como órgão endócrino (LACERDA; MALHEIROS; ABREU, 2016). Deste modo, nas últimas décadas, foi revelado o papel endócrino do TAB, tendo seus adipócitos capacidade de secretar vários tipos de proteínas denominadas adipocinas, revelando um aspecto altamente dinâmico e metabolicamente ativo do TA (VAN MEIJEL; BLAAK; GOOSSENS, 2019).

As adipocinas atuam nos níveis autócrino, parácrino e endócrino, com a capacidade de modular diversos parâmetros metabólicos, como controle da ingestão alimentar, balanço energético e sensibilidade periférica à insulina (SMITKA; MAREŠOVÁ, 2015). Tais substâncias produzidas e liberadas pelo TAB estão também relacionadas a diversos aspectos fisiológicos, a saber: resposta imunológica, controle da pressão arterial; homeostase glicêmica, e angiogênese

(DE; PINTO, 2014). Nesse sentido, o adipócito promove a expressão, síntese e secreção de fatores inflamatórios, onde destacam-se o TNF alfa e a IL-6, como adipocinas voltadas a promoção de um contexto pró-inflamatório (LACERDA; MALHEIROS; ABREU, 2016). Enquanto substâncias como IL-10 são descritas como uma das principais citocinas anti-inflamatórias (POLARI et al., 2018).

O TAB tem distribuição generalizada pelo organismo, atuando como protetor contra choques mecânicos, envolvendo tecidos e órgãos sem comprometer sua integridade funcional, também atuando como isolante térmico. Esse tecido apresenta variações de acordo com sua deposição anatômica, sendo classificado em: tecido adiposo subcutâneo (TAB-S), que fica abaixo da pele, principalmente ao redor da cintura, na área subescapular e nas áreas glútea e femoral, correspondendo a aproximadamente 80% de toda a gordura corporal; e em tecido adiposo visceral (TAB-V) responsável por 10 a 20% da gordura total, está no abdômen, principalmente no omento e no mesentério, mas também nos depósitos perirrenal, gonadal, epicárdico e retroperitoneal (PALMER; CLEGG, 2015).

Adipócitos do TAB-V apresentam aspectos metabólicos e funcionais distintos do TAB-S. A exemplo disso, enquanto o TAB-V está diretamente associado a doenças metabólicas como DM 2 e doenças cardiovasculares, o mesmo não se aplica ao TAB-S (BILLON; DANI, 2012). Tais diferenças podem ser evidenciadas pelo distinto perfil secretor que tais tecidos apresentam, visto que quando comparado ao TAB-S, o TAB-V é mais pró-inflamatório e imunologicamente dinâmico, com uma concentração significativa de leucócitos residentes (GUSTAFSON; SMITH, 2015).

Dentre as diversas peculiaridades apresentadas pelo TAB, destaca-se sua elevada plasticidade, onde seu conteúdo é determinado por sua celularidade, ou seja, pelo tamanho e número de seus adipócitos. Nesse sentido, sua expansão pode ocorrer por consequência da ingestão crônica de energia excessiva, podendo depender do aumento do tamanho de suas células (hipertrofia) e/ou pelo aumento do número das mesmas (hiperplasia), processos com relevância fisiopatológica distinta (WHITE; RAVUSSIN, 2019).

Nesse contexto, características morfológicas do TAB podem diferir substancialmente no equilíbrio de energia e homeostase, sendo determinantes críticos na SM advinda da obesidade. Enquanto a hiperplasia advém da formação de novos adipócitos através da adipogênese, a hipertrofia está intimamente ligada à disfunção do TA sendo um dos principais componentes da SM em indivíduos obesos (WANG et al., 2013). Estudo transversal conduzido por Arner e Colaboradores (ARNER et al., 2010) já evidenciou que adipócitos hipertróficos estão associados a RI e a DM 2, enquanto tais consequências não se aplicam a hiperplasia, considerada protetora.

No organismo humano, o número total de adipócitos é determinado durante a infância e adolescência e que independe do peso corporal. Tal fato sugere que a hipertrofia dos adipócitos representa o mecanismo mais importante para a expansão do TA frente ao ganho de peso, estando também diretamente relacionada com a perda da sensibilidade à insulina e prejuízos no metabolismo glicídico e lipídico. Em contrapartida, a expansão adiposa que ocorre através da hiperplasia adipocitária associa-se ao subfenótipo obeso metabolicamente saudável, visto que esse evento celular é descrito como protetor contra anormalidades de glicose/insulina na obesidade (KLÖTING; BLÜHER, 2014).

Fisiologicamente, a hipertrofia adipocitária é uma resposta adaptativa diante do excesso de nutrientes, e também proteger outros tecidos da lipotoxicidade. Porém frente a obesidade, tal hipertrofia se correlaciona diretamente com elevado IMC e a doença metabólica em humanos e roedores. Haja visto que a expansão do adipócito além de um diâmetro de 100 micrômetros pode acarretar hipóxia, estresse oxidativo, inflamação em tal tecido, relacionando-se diretamente a disfunção metabólica (MUIR et al., 2016). Diante da hipertrofia dos adipócitos, as toxinas podem se acumular e induzir estresse intracelular acarretando autofagia ou apoptose para proteção dos mecanismos celulares. Esses mecanismos podem contribuir para hipóxia tecidual e comprometimento da adipogênese. Esse conjunto de alterações desfavoráveis poderia finalmente causar danos aos órgãos secundários nos tecidos alvo, como cérebro, fígado, músculo esquelético, ilhotas pancreáticas e outros órgãos (KLÖTING; BLÜHER, 2014).

Diante da hipertrofia adipocitária, pode ocorrer elevação dos níveis de Proteína C Reativa (PCR) além do aumento da secreção de interleucinas pró-inflamatórias. Dessa forma, apesar da diferenciação entre obesidade hipertrófica e hiperplásica ser difícil diante da prática clínica, as diferenças na secreção de tal tecido podem futuramente nortear o diagnóstico de tais subfenótipos, permitindo a previsão de risco cardiometabólico (KLÖTING; BLÜHER, 2014).

Destaca-se dessa forma que o TA assume uma função altamente importante no controle metabólico. Logo, no cenário da obesidade, sua disfunção está associada a uma infinidade de fatores metabólicos e distúrbios endócrinos, incluindo comprometimentos no metabolismo lipídico e glicêmico, inflamação sistêmica e alterações no padrão de secreção de adipocinas, de modo a acarretar diversos efeitos deletérios ao indivíduo acometido (VAN MEIJEL; BLAAK; GOOSSENS, 2019).

Dentre as inúmeras citocinas liberadas pelo TA, o TNF- α destaca-se por seus efeitos pró-inflamatórios de grande relevância nos aspectos tanto imunológicos quanto inflamatórios, sendo uma proteína envolvida na RI e na dislipidemia em indivíduos obesos. Essa citocina está relacionada a eventos como apoptose, citotoxicidade, e produção de outras citocinas como interleucina 1 (IL-1) (LACERDA; MALHEIROS; ABREU, 2016). Estudos já evidenciaram que concentrações elevadas do TNF- α no indivíduo obeso, podem diminuir proporcionalmente a perda de peso (CASTILLO-HERNANDEZ et al., 2017).

Em contrapartida, o TAB em condições saudáveis, produz também proteínas de ação anti-inflamatória, com destaque para adipocina e a Interleucina 10 (IL-10). A IL10 é considerada uma das principais citocinas anti-inflamatórias, sendo também produzida por células imunes como macrófagos e linfócitos, em particular no baço (POLARI et al., 2018). A IL-10 tem peso molecular de 17 kDa, tendo por principal função a inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias através de ação contra regulação negativa (SPERETTA; LEITE; DUARTE, 2014).

Frente a obesidade, evidenciam-se níveis reduzidos da produção de IL-10, acarretando alteração nos mecanismos de controle imunológico e consequente

contribuição para a inflamação crônica de baixo grau presente nessa patologia, bem como RI e DM I2 (PIROLA; FERRAZ, 2017).

A insulina aciona nos adipócitos a síntese de lipídios, por estimular a captação de glicose e AGL e ativar a enzima lipase hormônio sensível (LHS) com consequente aumento da lipogênese. Dessa forma, a hiperinsulinemia induzida pela maior atividade vagal favorece a lipogênese e a adipogênese, visto que, a insulina estimula a captação de glicose e AGL pelo adipócito, além de ativar as enzimas da síntese de TG(FREITAS; CESCHINI; RAMALLO, 2014). Nesse sentido, Kulyte e Colaboradores (2017) ao analisar os efeitos da insulina sobre o TAB subcutâneo abdominal de um grupo de 129 sujeitos obesos, correlacionaram positivamente os efeitos de tal hormônio ao estímulo da lipogênese. Deste modo, a hiperinsulinemia tende a resultar em hipertrofia e hiperplasia da massa adiposa, fator que a longo prazo favorece o desequilíbrio da produção de agentes pro e anti-inflamatórios favorecendo o rompimento da homeostase glicêmica e lipídica(SAKAGUCHI et al., 2017).

A regulação do TAB ocorre através de uma interação complexa entre diversas citocinas, neuropeptídeos sinalizadores, juntamente de uma notável participação do sistema nervoso autônomo, que exerce um controle direto nos níveis celular e molecular da adiposidade (MESSINA et al., 2017). Recentemente, também tem sido descrita a influência do sistema imunológico frente a capacidade dos adipócitos em armazenar e liberar lipídios (DISPIRITO; MATHIS, 2015).

O SNA possui significativa importância frente a regulação do anabolismo e catabolismo, realizando manutenção da homeostase glicêmica, entre outros meios através do controle da secreção de insulina. A inervação das ilhotas pancreáticas ocorre através das fibras vagais colinérgicas e simpáticas. O sistema nervoso parassimpático (SNP) potencializa a secreção de insulina pela liberação de acetilcolina, enquanto, o efeito da adrenalina liberada pelo sistema nervoso simpático (SNS) leva a uma diminuição da concentração de insulina no sangue (LEIBIGER; BERGGREN, 2017).

O SNS desempenha uma função de comando no ajuste de reservas de energia lipídica. As catecolaminas, especialmente a epinefrina são consideradas o

principal estímulo à lipólise do TAB em mamíferos (BARTNESS et al., 2014), fato esse já evidenciado pelo aumento da lipólise in vitro em adipócitos brancos incubados com concentrações fisiológicas de noradrenalina (GIUDICELLI, 1983). Nesse sentido, já se observou que a destruição cirúrgica ou farmacológica das fibras simpáticas inibiu a resposta lipolítica do TAB (ZENG et al., 2015).

Apesar do TAB não apresentar uma vasta inervação, visto que apenas $8\pm 4,6\%$ dos adipócitos estão em contato direto com os terminais neuronais simpáticos (ZENG et al., 2015) o teor de lipídio no TAB é modulado em parte pelo Sistema Nervoso Simpático (SNS) ou via catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) liberadas pela ativação do eixo simpato-adrenal (RYU et al., 2017). A ativação simpática, como aquela que ocorre no jejum ou exercício físico resulta em aumento da lipólise no TAB, resultado da ação da adrenalina e/ou noradrenalina sobre receptores beta adrenérgicos nos adipócitos (REILLY et al., 2020). Adicionalmente, as terminações nervosas simpáticas e sensoriais atreladas a conversa cruzada entre adipócitos e neurônios hipotalâmicos, de modo que juntos, tais mecanismos resultam no controle da secreção de adipocinas (SMITKA; MAREŠOVÁ, 2015).

O ramo parassimpático não exerce efeitos diretos sobre o TAB, todavia por modular a secreção de insulina pancreática e por influenciar a resposta anti-inflamatória sistêmica, a ação vagal parassimpática e capaz de modular o metabolismo e a função endócrina dos adipócitos (BERTHOUD; NEUHUBER, 2019).

É bem reconhecido que o suprimento parassimpático exerce efeitos de estimulação nas células beta pancreáticas, sendo capaz de aumentar a secreção, e portanto, a concentração plasmática de insulina, além de estimular a proliferação das células beta pancreáticas (RODRIGUEZ-DIAZ et al., 2012). Por sua vez, a insulina tem como importante função favorecer o armazenamento de energia no TAB (GUARINO et al., 2017). Logo, frente o estímulo insulínico o TAB aumenta a síntese de lipídios e bloqueia a lipólise (SEOANE-COLLAZO et al., 2015), fator que contribui para expansão da massa adiposa (BALBO et al., 2007).

1.4 Nervos Vago e Baço: repercussões sobre o TAB

Frente ao SNP, durante muito tempo pensou-se que o TAB não recebia nervos parassimpáticos, contudo mais recentemente tal sistema vem sido descrito por realizar a modulação da captação de glicose mediada por insulina no TA e no metabolismo de ácidos graxos livres (AGL), evidenciando seus efeitos anabólicos sobre os depósitos do TAB (MESSINA et al., 2017).

O nervo vago, X (10º) par craniano, é o principal ramo do SNP, com papel de destaque entre o cérebro e trato gastrointestinal, sendo considerando um nervo misto, com componentes motores (eferentes) e sensitivos (afferentes). Por esta razão, e pela extensa inervação vagal visceral, em particular de órgãos importantes para o metabolismo, como pâncreas, fígado e intestino, o nervo vago desempenha papel central na integração de sinais nutricionais, hormonais e metabólicos centrais e periféricos (STARUP-LINDE et al., 2016).

Na obesidade parece haver um desequilíbrio na atividade dos ramos autonômicos, o qual, pelo menos em termos metabólicos, se reflete em uma redução na função simpática, paralelamente a uma maior atividade do SNP (COHEN et al., 2013). A hiperatividade parassimpática, para o pâncreas endócrino resulta em maior secreção de insulina, devido a hiperfunção das ilhotas pancreáticas, acarretando ruptura da homeostase e conseqüentemente contribuindo para o surgimento de comorbidades frequentes na obesidade (BALBO et al., 2016; MIRANDA et al., 2014).

A participação da atividade parassimpática na obesidade é explorada pela técnica de secção do principal nervo parassimpático, o nervo vago; um procedimento denominado vagotomia subdiafragmática. Diversos estudos em modelos experimentais em roedores, e também em humanos, tem mostrado os efeitos da vagotomia sobre a hiperinsulinemia e massa adiposa (DEZFULI et al., 2018). Apovian e Colaboradores (2017) em estudo com 172 pacientes, evidenciaram que os efeitos do bloqueio do nervo vago não se restringem a resultados agudos, pois tal procedimento continua a resultar em perda de peso com

um perfil de segurança significativo, mesmo após dois anos dos primeiros resultados favoráveis.

Assim, estudos que investigaram efeitos da secção desse importante ramo do SNP já descreveram o impacto de tal inibição frente ao metabolismo energético, com resultados voltados a redução do peso da gordura perigonadal, melhora a tolerância à glicose e do perfil lipídico plasmático (SEBAEI; YOUSOF; ABDO, 2020). Esse resultado atrelado a diminuição significativa do TAB em animais vagotomizados, sugere que a hiperinsulinemia e hiperatividade vagal, entre outros fatores, contribuem para o acúmulo maciço de gordura no nesse tecido (BALBO et al., 2007).

Um estudo clínico conduzido em seres humanos, concluiu que o nervo vago tem a capacidade de regular a quantidade de TA, resultando em uma redução da gordura visceral em indivíduos submetidos a vagotomia seletiva na gastrectomia. O mesmo estudo, sugere a consideração desse procedimento como possibilidade de tratamento para a obesidade excessiva (MIYATO et al., 2012).

Interessantemente, alguns estudos vêm mostrando que o nervo vago além de regular o metabolismo, é hábil em influenciar a resposta imunológica, um processo que exige a participação esplênica. Já evidenciou-se que a administração da citocina IL-1 β no sistema portal hepático do rato resulta em aumento da atividade do nervo vago eferente e aferente, bem como do nervo esplênico, sugerindo interação reflexiva (NIIJIMA, 1996). Outras pesquisas já descreveram que a estimulação elétrica do nervo vago é capaz de inibir a liberação de TNF e outras citocinas pró-inflamatórias (BOROVIKOVA et al., 2000). Em conjunto, esse circuito neuronal é denominado 'via anti-inflamatória colinérgica' (PAVLOV; TRACEY, 2017).

Dessa forma, evidencia-se que apesar de exercer uma significativa participação no metabolismo do TAB, a regulação desse tecido não se limita ao sistema nervoso, afinal a influência do sistema imunológico frente a capacidade dos adipócitos em armazenar e liberar lipídios, responder à insulina e desempenhar suas funções endócrinas (via secreção de adipocinas) já está fortemente descrita na literatura (DISPIRITO; MATHIS, 2015).

Frente a imunologia o baço é considerado um órgão de suma importância, mas que também vem atraindo destaque nos últimos anos com relação a sua participação no metabolismo lipídico, apesar do conhecimento acerca do mecanismo de ação dessa participação ser ainda limitado (Al et al., 2018). Sendo caracterizado como maior órgão linfóide do corpo humano, o baço tem papel relevante na liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias. Tais aspectos fisiológicos alteram-se diante da obesidade, onde a secreção esplênica de IL-10, (uma citocina de perfil voltado a supressão de respostas inflamatórias) torna-se diminuída, sem que tal alteração ocorra nas citocinas pró-inflamatórias (GOTOH et al., 2017).

Ainda sobre as alterações esplênicas frente a obesidade, Gotoh e colaboradores (GOTOH et al., 2012b) evidenciaram que devido ao estresse oxidativo ou à apoptose, a síntese de IL-10 esplênica diminuiu em animais obesos, quando comparada aos não obesos. Tal frequente supressão da síntese esplênica dessa potente citocina anti-inflamatória, pode resultar, entre outras complicações, em respostas inflamatórias no pâncreas e distúrbios metabólicos. A mesma pesquisa, ao realizar um tratamento com IL-10 concluiu que essa citocina derivada do baço pode impedir o acúmulo de gordura induzida pela obesidade e a inflamação crônica de baixo nível no pâncreas.

Estudos em pacientes esplenectomizados indicaram que o baço pode modular o metabolismo lipídico e a aterogênese. A exemplo disso, King (1914) mostrou que a esplenectomia acarreta aumento dos níveis de colesterol plasmático em cães. Similarmente, Demuner e Colaboradores (2015) descreveram uma significativa associação entre parâmetros lipídicos elevados e remoção cirúrgica do baço em roedores. Além de um aumento significativo nos níveis de triglicerídeos, a remoção cirúrgica do baço é também descrita como responsável por induzir maiores níveis séricos de leptina e insulina em ratos, independente da dieta (ROSA et al., 2015).

Evidências da participação esplênica no metabolismo lipídico em seres humanos também já encontram-se relatadas na literatura, onde através de uma observação a longo prazo dos veteranos da segunda guerra mundial submetidos a

esplenectomia traumática, concluiu-se que os mesmos se apresentaram consideravelmente mais suscetíveis a doença cardíaca coronariana, na qual o desenvolvimento aumentado de lesão aterosclerótica pode ser o elemento causal (DENNIS ROBINETTE; FRAUMENI, 1977).

Apesar da existência de evidências da participação esplênica sobre o metabolismo lipídico, seu mecanismo de ação ainda não está bem esclarecido, de modo que a teoria mais comum e popular se baseia na comparação do baço a um reservatório lipídico. Nesse sentido, diante do hiperesplenismo ocorre um acúmulo de grande proporção de gordura pelos macrófagos esplênicos, mediada pelo processo de fagocitose hiperativa, acarretando um quadro de hipolipidemia. Outra explicação para a redução lipídica mediada pelo baço advém de seu efeito imunitário do sistema mononuclear fagocitário contra estruturas encontradas nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL), resultando em sua depuração plasmática. Logo, em um cenário de esplenectomia total evidencia-se elevação dos níveis séricos de LDL e colesterol total, com redução da concentração de high-density lipoprotein (HDL) sérico, comprovando a função do baço como reserva de lipídios (GONÇALVES et al., 2014).

Além das alterações relacionadas ao aumento de triglicerídeos, LDL, e diminuição de HDL, estudos já descreveram que camundongos esplenectomizados apresentaram maiores níveis de leptina bem como de insulina sérica. Destaca-se que, as mesmas alterações no metabolismo lipídico associadas à esplenectomia podem ser observadas em indivíduos obesos que geralmente apresentam funcionalidade imune comprometida (ROSA et al., 2015).

Diante do cenário da obesidade os efeitos esplênicos sobre o metabolismo energético também sofrem alterações. Essas, tem a capacidade de amenizar ou agravar o desenvolvimento da inflamação crônica de baixo grau associada à obesidade e disfunção metabólica (DISPIRITO; MATHIS, 2015). Nesse sentido, um estudo de Wu e Colaboradores (2014) demonstrou que a esplenectomia exacerba a resistência à insulina associada a obesidade. O impacto desse procedimento sobre o TAB visceral se baseou em uma elevação da secreção de células pró-inflamatórias paralela a diminuição de células anti-inflamatórias, desencadeando

um ambiente antagonista da insulina, e por consequência interferindo nas vias metabólicas normais.

Observa-se que o ciclo de feedback neural entre o TA e o cérebro desempenha um papel crucial em vários fenômenos fisiológicos, principalmente na regulação da homeostase energética e da massa de gordura corporal, visto que evidências sobre a influência parassimpática sobre o crescimento do TAB já se encontram descritas (MIYATO et al., 2012). Entretanto como pode-se observar, nesse ciclo também inclui-se a função imunológica, visto que o baço apresenta-se como importante regulador do metabolismo lipídico (Al et al., 2018) podendo ter impacto frente secreção de insulina, também frente a morfologia do TAB (LEITE et al., 2015).

O NV, considerado um importante ramo parassimpático, também modula aspectos do sistema imune, tendo importantes ações anti-inflamatórias (SERHAN; LEVY, 2018). Curiosamente, sabe-se que as células imunes esplênicas estão também envolvidas na possibilidade de desenvolvimento da aterosclerose, e que seu status inflamatório é controlado pelo reflexo anti-inflamatório colinérgico (KOOIJMAN et al., 2015).

De encontro com os fatos expostos, pesquisas já descreveram uma importante interação bidirecional entre SNA e sistema imunológico, em particular sobre o importante efeito anti-inflamatório vagal mediado pelo baço. A exemplo disso, Huston e colaboradores (2006) já relataram que a estimulação do nervo vago não consegue inibir a produção de TNF- α em animais esplenectomizados durante a endotoxemia, indicando um papel essencial para o baço na via anti-inflamatória colinérgica.

Assim, sabe-se que a obesidade está associada a alterações no SNA (DEZFULI et al., 2018), imunológico, (LAMAS; MARTI; MARTÍNEZ, 2002) e na resposta anti-inflamatória esplênica (SAVASTANO et al., 2011). Isso posto, estudos tem apontado para uma ação bidirecional entre baço e o SNA, visto que a hiperatividade vagal que pode estar presente na obesidade relaciona-se a uma expansão do TAB, atrelada a mudanças morfológicas dos adipócitos (MARTIN; MANI; MANI, 2015), e que esse mesmo tecido de reserva energética, pode sofrer

influência esplênica (WU et al., 2014). Deste modo, seria possível que o nervo vago e o baço estariam associados funcionalmente e exerceriam efeitos sobre a massa de TAB.

Mais recentemente tem sido demonstrado que a inflamação crônica da obesidade, também envolve a participação de outros setores do organismo, entre os quais vem recebendo atenção a atividade esplênica (ROSA et al., 2015). Interessantemente, os ramos autonômicos exercem importantes efeitos sobre a resposta imunológicas esplênica o que poderia influenciar a liberação de citocinas e a resposta metabólica do TAB. Todavia, até o presente momento, não há estudo explorando a relação vagal e esplênica com a massa adiposa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto da vagotomia associada ou não a esplenectomia sobre o tecido adiposo branco de ratos obesos e não obesos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o impacto das intervenções cirúrgicas VAG e ESP sobre o conteúdo do TAB visceral e subcutâneo em animais obesos e não obesos;
- Descrever o efeito das intervenções cirúrgicas VAG e ESP nos parâmetros bioquímicos e biométricos de animais obesos e não obesos;
- Observar as consequências das intervenções cirúrgicas VAG e ESP sobre a hiperplasia e hipertrofia do TAB visceral e subcutâneo em animais obesos e não obesos;
- Conhecer a implicação das intervenções cirúrgicas VAG e ESP frente expressão de e IL10 no TAB visceral e subcutâneo de animais obesos e não obesos;

3 METODOLOGIA

Trata-se de uma pesquisa de cunho experimental básica, quantitativa, descritiva e laboratorial, realizada na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) em parceria com Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), fazendo parte de um recorte de um projeto maior intitulado: “A interação bidirecional entre atividade autonômica e esplênica pode modular o controle secretor de insulina em ratos obesos-MSG?”, coordenado pela Dra. Sabrina Grassioli. A amostra foi composta por 88 ratos, *Rattus Norvegicus*, da linhagem Wistar divididos inicialmente em Controles (CTL) ou MSG (M) e subsequentemente, distribuídos de acordo com procedimento cirúrgico Vagotomia (VAG), Esplenectomia (ESP), Vagotomia+esplenectomia (VAG+ESP) e Falsa Cirurgia (FC), tendo cada subgrupo 11 ratos cada; conforme explicado no item a seguir.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE em reunião no dia 09 de junho 2017 (ANEXO A).

3.1 Animais

Ratas Wistar prenhas (n= 10 ratas) foram obtidas no biotério central da Universidade do Oeste do Paraná (UNIOESTE) sendo transferidas para biotério setorial do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabólica (LAFEM), alocadas em box individuais e recebendo água e ração para roedores (Biobase; SC; BR) *ad libium* até o nascimento da prole. Ao nascimento, o tamanho da prole foi ajustado para 6 a 8 filhotes machos pelas mães que foram mantidas sob ciclo de controle de luminosidade (12h claro-escuro) e temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) durante a fase de lactação. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal local (CEUA) em dados de 16 de março de 2017, de acordo com as diretrizes brasileiras do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2 Obesidade Hipotalâmica

No segundo dia após o nascimento, metade da prole (n= 30 ratos) recebeu injeção subcutânea de glutamato monossódico (MSG) na dose de 4g / Kg de peso corporal (pc) durante cinco dias consecutivos de acordo com protocolo previamente estabelecido por Olney (1969) . Doses neonatais elevadas de MSG provocam lesões hipotalâmicas, induzindo o desenvolvimento de obesidade ao longo da vida (COELHO et al., 2019; TIMPER; BRÜNING, 2017). Esse grupo foi denominado M-Obeso. No mesmo período, o grupo não obeso ou controle (CTL; n = 30 ratos) recebeu solução salina equimolar. Após o desmame (21 dias de vida) os animais M-Obesos e CTL foram distribuídos aleatoriamente em caixa (3 ratos / caixa) e aos 60 dias de vida subdivididos em subgrupos de acordo com os procedimentos cirúrgicos descritos a seguir.

3.3 Protocolos de cirurgia

Aos 60 dias de vida, os grupos M-Obeso (n=44 ratos) e CTL (n=44 ratos) foram submetidos à vagotomia subdiafragmática (VS) e / ou esplenectomia (ESP) segundo protocolos de Balbo et al. (2007) e Gotoh et al.(2012) respectivamente. Resumidamente, após 12h de jejum os animais foram anestesiados com isoflurano (1%) e mantidos em ventilação espontânea com oxigênio (1mL / min). Em seguida, a cavidade abdominal foi aberta através de uma incisão (± 2 cm) realizada imediatamente abaixo do esterno e o fígado foi movido do local e o ramo anterior e posterior do NV visualizado na parede do esôfago. Esses ramos NV estavam afastados da parede esofágica, amarrados e seccionados posteriormente. Para a cirurgia esplênica, a incisão abdominal foi feita, conforme descrito acima, o baço foi localizado, o vaso sanguíneo amarrado e o órgão excisado e pesado. Alguns animais receberam cirurgias de VS e ESP no mesmo procedimento cirúrgico. Além disso, a cirurgia simulada foi realizada em outros ratos. Assim, foram originados oito grupos experimentais, conforme fluxograma apresentado na Figura 1. Após os procedimentos cirúrgicos todos os ratos foram transferidos para caixas individuais, recebendo água e ração para roedores ad libitum durante 1 semana para garantir a recuperação cirúrgica. Após esse período, os animais foram reagrupados (3 ratos/caixa) conforme protocolo cirúrgico até 150 dias de vida.

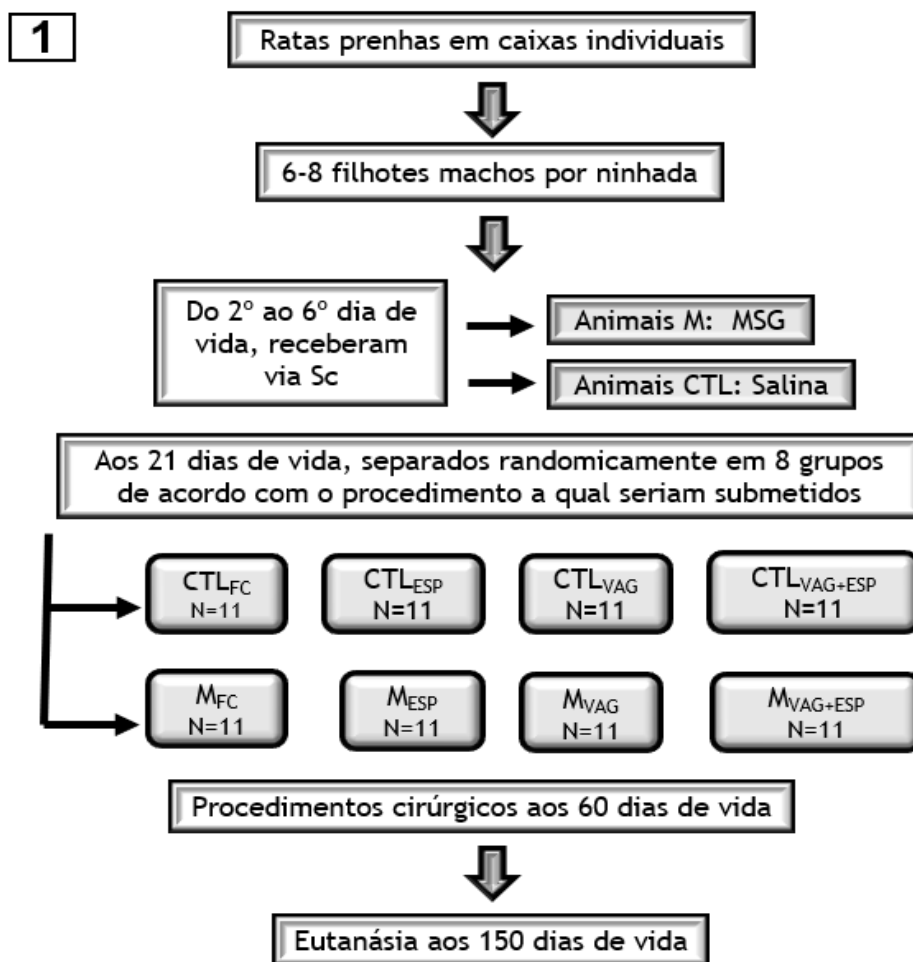


Figura 1: Delineamento experimental.

Animais CTL foram divididos em: Controle falsa-cirurgia (CTL_{FC}), controle esplenectomizado (CTL_{ESP}), controle vagotomizados (CTL_{VAG}), controle vagotomizado+esplenectomizado (CTL_{VAG+ESP}); E os animais M subdivididos em MSG falsa-cirurgia (M_{FC}), MSG esplenectomizado (M_{ESP}), MSG vagotomizados (M_{VAG}), MSG vagotomizado+esplenectomizado (M_{VAG+ESP}). N=número de animais. Sc=subcutâneo.

3.4 Parâmetros biométricos e de plasma

Dos 70 aos 150 dias de vida, os ratos machos foram pesados para o ganho de peso corporal calculado (g). Aos 150 dias de vida foi avaliado o comprimento nasoanal (CNA; cm) e após 12h de jejum os ratos foram sacrificados, o sangue total coletado em tubos heparinizados e o plasma utilizado para dosagem de glicose, triglicerídeos e colesterol total por kits enzimáticos (Bioquid, empresa SC). A insulina plasmática foi dosada por radioimunoensaio. Os valores de glicose e

triglicerídeos em jejum foram utilizados para cálculo do índice TyG por meio das fórmulas: $\text{Log}(\text{triglicerídeos (mg / dL)} * \text{glicose (mg / dL)} / 2)$ (GOTOH et al., 2012c). O plasma também foi usado para a dosagem de IL10 usando ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante. Imediatamente após a eutanásia, a cavidade abdominal foi aberta, o estômago foi excisado, limpo e pesado. O peso do estômago foi utilizado como parâmetro para avaliar a eficácia da VS já demonstrada (GUERRERO-ROMERO et al., 2010). Em ratos não esplenectomizados, o baço também foi excisado, limpo e pesado. O peso corporal final e o NAL foram usados para obter o índice de Lee [$3\sqrt{\text{peso corporal (g)} / \text{NAL (cm)}}$] proposto por Patterson (1968).

3.5 Análise Histológica WAT

Após a eutanásia os depósitos TAB mesentérico (TAB-M) e inguinal (TAB-I) foram excisados, pesados e um fragmento imediatamente transferido para Alfac, solução de fixação histológica constituída por uma mistura de álcool (80%), formol (10%) e ácido acético glacial (5%) durante 24h. Após esse período, as amostras de tecido TAB foram transferidas para solução de álcool (70%) até os procedimentos histológicos. Para isso, os depósitos de TAB foram diafanizados em xilol, desidratados em solução de álcool e incluídos em paraplást (McCormickTM) sendo submetidos a procedimentos de microtomia. Foram realizados cortes semisseriais (5 μ m) que foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina (H&E). Cinco a seis ratos por grupos foram usados para montar 3 fatias por ratos contendo pelo menos 3 cortes por fatia. As lâminas foram registradas em fotomicroscópio (OLYMPUS BX60) em aumento de 40x. O tamanho dos adipócitos (μm^2) e o número (número/campo) foram medidos usando um sistema de análise de imagem (Image J 1.39f, NIH - Bethesda, MD, EUA). Um total de 50 adipócitos foram medidos por seção.

3.6 Western Blotting

Os fragmentos de depósitos TAB-I E TAB-M foram homogeneizados com 200 μL de tampão de lise (EDTA 10 mM, base tris 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, fluoreto de

fenilmetilsulfonil 2 mM, triton 1% X-100 e 1 µg / mL de aprotinina). A concentração de proteína foi medida usando reagentes de Bradford (SIGMA, B6916). Em seguida, 30 µg de amostras de proteína foram homogeneizadas e fervidas (5 min a 100 ° C) em um tampão de Laemmli. As proteínas foram então separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15%. A transferência para membranas de nitrocelulose foi realizada em transferência Trans Blot por 2 h em 110 V, com tampão tris/glicina. As membranas foram bloqueadas em solução salina tamponada com tris (base tris 10 mM, NaCl 150 mM e 0,25% (vol./vol.) De tween 20) contendo 5% (peso/vol.) após, leite por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas durante a noite a 4 ° C com anticorpos primários contra IL-10 e Tubulina, e posteriormente com anticorpos secundários apropriados. A detecção de bandas foi realizada por quimioluminescência em revelador (LOCCUS). Para quantificar as intensidades de banda, a densitometria óptica foi utilizada no programa LabImageID.

3.7 Análise estatística

Os dados são apresentados como média ± erro padrão médio. Os grupos CTL e M-Obeso foram comparados pelo teste t de Student ($p < 0,05$). O desfecho principal foi analisado com a ANOVA de dois fatores, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Os tamanhos de efeito Delta Glass (ES) também foram calculados e a relevância fisiológica foi interpretada como pequena ($d = 0,2$), média ($d = 0,5$) ou grande ($d = 0,8$).

4 REFERÊNCIAS

Al, X. M. et al. The role of splenectomy in lipid metabolism and atherosclerosis (AS). **Lipids in Health and Disease**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2018.

ANS. **Agência Nacional De Saúde Suplementar Diretoria De Normas E Habilitação Dos Produtos Gerência De Monitoramento Assistencial Coordenadoria De Informações Assistenciais**. [s.l: s.n.].

APOVIAN, C. M. et al. Two-Year Outcomes of Vagal Nerve Blocking (vBloc) for the Treatment of Obesity in the ReCharge Trial. **Obesity Surgery**, v. 27, n. 1, p. 169–176, 2017.

ARNER, E. et al. Adipocyte turnover: Relevance to human adipose tissue morphology. **Diabetes**, v. 59, n. 1, p. 105–109, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA (ABESO). Diretrizes brasileiras de obesidade 2016. **VI Diretrizes Brasileiras de Obesidade**, v. 4 edição, p. 7–186, 2016.

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.

BALBO, S. L. et al. Vagotomy diminishes obesity in cafeteria rats by decreasing cholinergic potentiation of insulin release. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 72, n. 4, p. 625–633, 2016.

BARTNESS, T. J. et al. Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 4, p. 473–493, 2014.

BERTHOUD, H. R.; NEUHUBER, W. L. Vagal mechanisms as neuromodulatory targets for the treatment of metabolic disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1454, n. 1, p. 42–55, 2019.

BILLON, N. et al. The generation of adipocytes by the neural crest. **Development**, v. 134, n. 12, p. 2283–2292, 2007.

BILLON, N.; DANI, C. Developmental Origins of the Adipocyte Lineage: New Insights from Genetics and Genomics Studies. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 8, n. 1, p. 55–66, 2012.

BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 288–298, 2019.

BOROVIKOVA, L. V. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 458–462, 2000.

CANTELLI, K. R. et al. Duodenal-jejunal bypass normalizes pancreatic islet

proliferation rate and function but not hepatic steatosis in hypothalamic obese rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 5, p. 1–11, 2017.

CARVALHO, D. N.; CARVALHO, J. N.; BRITO, J. G. DE. ASPECTOS INFLAMATÓRIOS DO TECIDO ADIPOSEO NA OBESIDADE Inflammatory aspects of adipose tissue in obesity. **Journal of Amazon Health Science**, v. 2, p. 1–15, 2016.

CASTILLO-HERNANDEZ, J. et al. A obesidade é um determinante da resistência à insulina mais importante do que os níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 4, p. 320–329, 2017.

CHU, D. T. et al. An update on physical health and economic consequences of overweight and obesity. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 12, n. 6, p. 1095–1100, 2018.

COELHO, C. F. F. et al. Early onset and progression of non-alcoholic fatty liver disease in young monosodium l-glutamate-induced obese mice. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 10, n. 2, p. 188–195, 2019.

COHEN, M. et al. Autonomic nervous system balance in children and adolescents with craniopharyngioma and hypothalamic obesity. **European Journal of Endocrinology**, v. 168, n. 6, p. 845–852, 2013.

COZIER, Y. C.; GOVENDER, P.; BERMAN, J. S. Obesity and sarcoidosis: Consequence or contributor? **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 24, n. 5, p. 487–494, 2018.

DE, W.; PINTO, J. a Função Endócrina Do Tecido Adiposo the Endocrine Function of Adipose Tissue. **Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba**, v. 16, n. 3, p. 111–120, 2014.

DEMUNER, B. L. et al. Effect of total splenectomy in the lipid profile in mice. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 306–312, 2015.

DENNIS ROBINETTE, C.; FRAUMENI, J. F. Splenectomy and Subsequent Mortality in Veterans of the 1939-45 War. **The Lancet**, v. 310, n. 8029, p. 127–129, 1977.

DEZFULI, G. et al. Subdiaphragmatic vagotomy with Pyloroplasty Ameliorates the obesity caused by genetic deletion of the Melanocortin 4 receptor in the mouse. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. MAR, p. 1–16, 2018.

DISPIRITO, J. R.; MATHIS, D. Immunological contributions to adipose tissue homeostasis. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 5, p. 315–321, 2015.

DO PRADO, W. L. et al. Obesidade e adipocinas inflamatórias: Implicações práticas para a prescrição de exercício. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15,

n. 5, p. 378–383, 2009.

FALALYEYEVA, T. M. et al. Probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria alter pro- and anti-inflammatory cytokines production in rats with monosodium glutamate-induced obesity. **Fiziologichnyi zhurnal**, v. 63, n. 1, p. 17–25, 2017.

FLORIDO, L. M. P. et al. COMBATE À OBESIDADE: ESTRATÉGIAS COMPORTAMENTAIS E ALIMENTARES. v. 2, p. 80–89, 2019.

FREITAS, M. C.; CESCHINI, F. L.; RAMALLO, B. T. Resistência à Insulina Associada à Obesidade: Efeitos Anti-Inflamatórios do Exercício Físico. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 22, n. 3, p. 139–147, 2014.

FURUYA, D. T. et al. Anti-inflammatory effect of atorvastatin ameliorates insulin resistance in monosodium glutamate-treated obese mice. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 59, n. 3, p. 395–399, 2010.

GIUDICELLI, Y. EVIDENCE AGAINST AN IMPORTANT ROLE FOR THE α 2-RECEPTOR SUBTYPE IN THE Preparation of isolated fat cells and ghosts . Male. v. 731, p. 397–405, 1983.

GONÇALVES, T. B. et al. Efeitos do aloenxerto esplênico no lipidograma de ratos não esplenectomizados: Papel imunológico e metabólico do “baço duplo”. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes**, v. 41, n. 2, p. 122–127, 2014.

GOTOH, K. et al. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced hypothalamic inflammation. **Journal of neurochemistry**, v. 120, p. 752–764, 2012a.

GOTOH, K. et al. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced inflammation in white adipose tissue and liver. **Diabetes**, v. 61, n. 8, p. 1994–2003, 2012b.

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, 2012c.

GOTOH, K. et al. Papel dos derivados de baço de IL-10 na prevenção da inflamação sistêmica de baixo grau de obesidade. v. 64, p. 8–11, 2017.

GUARINO, D. et al. The role of the autonomic nervous system in the pathophysiology of obesity. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. SEP, p. 1–16, 2017.

GUERRERO-ROMERO, F. et al. The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 7, p. 3347–3351, 2010.

GUSTAFSON, B.; SMITH, U. Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk. **Atherosclerosis**, v. 241, n. 1, p. 27–35, 2015.

HEINONEN, S. et al. White adipose tissue mitochondrial metabolism in health and in obesity. **Obesity Reviews**, v. 21, n. 2, p. 1–23, 2020.

HUSTON, J. M. et al. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 7, p. 1623–1629, 2006.

KADOUH, H. C.; ACOSTA, A. Current paradigms in the etiology of obesity. **Techniques in Gastrointestinal Endoscopy**, v. 19, n. 1, p. 2–11, 2017.

KING, J. H. STUDIES IN THE PATHOLOGY OF THE SPLEEN. **THE ARCHIVES OF INTERNAL MEDICINE**, v. 14, n. 2, p. 146–167, 1914.

KLÖTING, N.; BLÜHER, M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 15, n. 4, p. 277–287, 2014.

KOOIJMAN, S. et al. Splenic autonomic denervation increases inflammatory status but does not aggravate atherosclerotic lesion development. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 309, n. 4, p. H646–H654, 2015.

KREUTZER, C. et al. Hypothalamic inflammation in human obesity is mediated by environmental and genetic factors. **Diabetes**, v. 66, n. 9, p. 2407–2415, 2017.

KULYTE, A. et al. Global transcriptome profiling identifies KLF15 and SLC25A10 as modifiers of adipocytes insulin sensitivity in obese women. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. 1–20, 2017.

LACERDA, M. S.; MALHEIROS, G. C.; ABREU, A. DE O. W. DE. Tecido Adiposo, Uma Nova Visão: As Adipocinas E Seu Papel Endócrino. **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos**, v. 11, n. 2, p. 25–31, 2016.

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

LEIBIGER, I. B.; BERGGREN, P. O. Intraocular in vivo imaging of pancreatic islet cell physiology/pathology. **Molecular Metabolism**, v. 6, n. 9, p. 1002–1009, 2017.

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.

MARTIN, K. A.; MANI, M. V.; MANI, A. New targets to treat obesity and the metabolic syndrome. **European Journal of Pharmacology**, v. 763, p. 64–74, 2015.

MARTINS, A. C. P. et al. Adrenal medullary function and expression of catecholamine-synthesizing enzymes in mice with hypothalamic obesity. **Life Sciences**, v. 74, n. 26, p. 3211–3222, 2004.

MESSINA, G. et al. Role of autonomic nervous system and orexinergic system on adipose tissue. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. March, p. 1–9, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigitel Brasil 2019**. [s.l: s.n.].

MIRANDA, R. A. et al. Insulin oversecretion in MSG-obese rats is related to alterations in cholinergic muscarinic receptor subtypes in pancreatic islets. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 1075–1086, 2014.

MIYATO, H. et al. Vagus Nerve Preservation Selectively Restores Visceral Fat Volume in Patients with Early Gastric Cancer who Underwent Gastrectomy. **Journal of Surgical Research**, v. 173, n. 1, p. 60–67, 2012.

MUIR, L. A. et al. Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity. **Obesity**, v. 24, n. 3, p. 597–605, 2016.

NIIJIMA, A. The afferent discharges from sensors for interleukin 1 β in the hepatportal system in the anesthetized rat. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 61, n. 3, p. 287–291, 1996.

O'BRIEN, P. D. et al. Neurological consequences of obesity. **The Lancet Neurology**, v. 16, n. 6, p. 465–477, 2017.

OBESIDADE, F. M. DA. Federação Mundial da Obesidade. p. 2–5, 2017.

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

PALMER, B. F.; CLEGG, D. J. The sexual dimorphism of obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 402, p. 113–119, 2015.

PAPASAVAS, P.; EL CHAAR, M.; KOTHARI, S. N. American Society for Metabolic and Bariatric Surgery position statement on vagal blocking therapy for obesity. **Surgery for Obesity and Related Diseases**, v. 12, n. 3, p. 460–461, 2016.

PATTERSON, L. L. B. AND B. D. Carcass Fat Content in Weanling and Adult Female Rats With Hypothalamic Lesions J [. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 1965, p. 527–528, 1968.

PAULO, J.; AMORIM, D. A.; GRASSIOLLI, S. Exercise and Vitamin D Supplementation Modify Spleen Morphology in Lean, but not, in Monosodium-Glutamate-Obese Rat. **JOURNAL OF SPLEEN AND LIVER RESEARCH**, v. 1, n. 3, p. 1–14, 2019.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Neural regulation of immunity: Molecular mechanisms and clinical translation. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 156–166, 2017.

PIROLA, L.; FERRAZ, J. C. Role of pro- and anti-inflammatory phenomena in the physiopathology of type 2 diabetes and obesity. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 120, 2017.

POLARI, L. et al. Increase in serum Interleukin-10 does not alleviate pro-inflammatory MCP-1 production in obese pregnancies. **Cytokine**, v. 108, n. March, p. 67–70, 2018.

RAO, G. H. R. Management of Excess Weight and Obesity: A Global Perspective. v. 1, p. 108–112, 2018.

REILLY, S. M. et al. As catecolaminas suprimem a reesterificação do ácido graxo e aumentam a oxidação nos adipócitos brancos via STAT3. p. 1–23, 2020.

RODRIGUEZ-DIAZ, R. et al. Noninvasive in vivo model demonstrating the effects of autonomic innervation on pancreatic islet function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 52, p. 21456–21461, 2012.

ROSA, T. S. et al. Role of leptin in body temperature regulation and lipid metabolism following splenectomy. **Neuropeptides**, v. 54, p. 67–72, 2015.

RYU, V. et al. Bidirectional crosstalk between the sensory and sympathetic motor systems innervating brown and white adipose tissue in male Siberian hamsters. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 312, n. 3, p. R324–R337, 2017.

SAKAGUCHI, M. et al. Adipocyte Dynamics and Reversible Metabolic Syndrome in Mice with an Inducible Adipocyte-Specific Deletion of the Insulin Receptor. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 2, p. 448–462, 2017.

SALTIEL, A. R. et al. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease Find the latest version: Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 1, p. 1–4, 2017.

SAVASTANO, S. et al. Liver-spleen axis, insulin-like growth factor-(IGF)-I axis and fat mass in overweight/obese females. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n. 1, p. 136, 2011.

SEBAEI, D.; YOUSOF, S.; ABDO, M. The Effect of Subdiaphragmatic Vagotomy on Lipid Profile and Insulin Resistance in Diabetic Obese Rats. **Bulletin of Egyptian Society for Physiological Sciences**, v. 40, n. 1, p. 69–83, 2020.

SEOANE-COLLAZO, P. et al. Hypothalamic-autonomic control of energy

homeostasis. **Endocrine**, v. 50, n. 2, p. 276–291, 2015.

SERHAN, C. N.; LEVY, B. D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators Protection versus uncontrolled inflammation: first responders and resolution. **J Clin Invest**, v. 128, n. 7, p. 2657–2669, 2018.

SILVA, P. L. N. DA et al. Dislipidemia Em Crianças E Adolescentes: Uma Revisão Da Literatura. **Revista UNIABEU**, v. 11, n. 27, p. 283–300, 2018.

SMITH, U.; KAHN, B. B. O tecido adiposo regula a sensibilidade à insulina : papel de adipogese , de novo lipogénese e novos lípidos. n. *Imc*, p. 465–475, 2016.

SMITKA, K.; MAREŠOVÁ, D. Adipose Tissue as an Endocrine Organ: An Update on Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Microenvironment. **Prague Medical Report**, v. 116, n. 2, p. 87–111, 2015.

SOUZA, F. DE et al. EFEITO DA VAGOTOMIA TRONCULAR EM RATOS INJETADOS NA FASE NEONATAL COM GLUTAMATO MONOSSÓDICO: ESTUDO BIOMÉTRICO. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 16, n. 1, p. 414, 2001.

SPERETTA, G. F.; LEITE, R. D.; DUARTE, A. C. D. O. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 13, n. 1, 2014.

STARUP-LINDE, J. et al. Vagotomy and subsequent development of diabetes - A nested case-control study. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 65, n. 7, p. 954–960, 2016.

SYMONDS, M. Adipose Tissue Biology. p. 1–59, 2017.

TIMPER, K.; BRÜNING, J. C. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: Pathways to obesity. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 10, n. 6, p. 679–689, 2017.

VAN MEIJEL, R. L. J.; BLAAK, E. E.; GOOSSENS, G. H. **Adipose tissue metabolism and inflammation in obesity**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

WANG, Q. A. et al. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. **Bone**, v. 19, n. 10, p. 1–7, 2013.

WHITE, U.; RAVUSSIN, E. Dynamics of adipose tissue turnover in human metabolic health and disease. **Diabetologia**, v. 62, n. 1, p. 17–23, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Health Organization: Global Recommendations on Physical Activity for Health: WHO 2010. **Journal of Experimental Psychology: General**, v. 136, n. 1, p. 23–42, 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 of the United States of America**, v. 111, n. 43, p. E4638–E4647, 2014.

ZENG, W. et al. Sympathetic Neuro-adipose Connections Mediate. **Cell**, v. 163, p. 84–94, 2015.

ZUBIRÍA, M. G. et al. Relationship between impaired adipogenesis of retroperitoneal adipose tissue and hypertrophic obesity: Role of endogenous glucocorticoid excess. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 18, n. 8, p. 1549–1561, 2014.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

THE VAGUS NERVE AND SPLEEN: INFLUENCE ON WHITE ADIPOSE MASS AND HISTOLOGY OF OBESE AND NON-OBESE RATS

Abstract

The vagus nerve and spleen represent a complex interface between neural and immunological functions, affecting both energy metabolism and white adipose tissue (WAT) content. Herein, we evaluated the effect of vagotomy, associated with splenectomy, on WAT content, histology and interleukin 10 (IL10) expression in obese and non-obese male Wistar rats. Hypothalamic obesity was induced by neonatal monosodium glutamate administration (M; 4g/Kg). Non-obese or Control (CTL) rats received equimolar saline. At 60 days of life, M-Obese and CTL rats were randomly distributed into experimental subgroups according to the following surgical procedures: sham; subdiaphragmatic vagotomy (SV); splenectomy (SPL); and SV+SPL (n= 11 rats/group). At 150 days of life and after 12h of fasting, rats were euthanized, blood was collected, and visceral and subcutaneous WAT depots were excised. WAT depots were weighted and histologically evaluated for number and size of adipocytes as well as IL10 expression. M-Obese rats showed higher adiposity, IL10 plasma levels, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, and insulin resistance when compared to CTL groups ($p < 0.05$). In CTL and M-Obese rats, SV reduced body weight gain and triglycerides levels, diminishing adipocyte size without changes in IL10 expression in WAT ($p < 0.05$). Splenectomy prevented the effects of SV on adiposity and metabolism in CTL animals but not in M-Obese rats. SV increased IL10 plasma levels in the CTL group, a response that was impaired by the absence of spleen. Neither SV nor SPL surgeries modified the plasma levels of IL10 in M-Obese rats. In conclusion, vagotomy promotes body weight and adiposity reduction, elevating IL10 plasma levels in non-obese animals, in a spleen-dependent manner. Under obesity conditions, vagotomy also reduces body weight, adiposity, and improves insulin sensitivity without changes in IL10 plasma levels. However, the spleen does not contribute to the effects of vagotomy in obese animals.

1. Introduction

White adipose tissue (WAT) exerts a central role in energy homeostasis, a function related to the endocrine activities of adipocytes (1). Adipocytes present a narrow associations between metabolism (lipogenesis and lipolysis), cell size (larger and small cells) and adipokine secretion (pro or anti-inflammatory substances) (2). Thus, in obesity conditions, the pronounced WAT expansion is primarily characterized by increased lipogenesis, adipocyte hypertrophy, and increases in pro-inflammatory proteins, such as tumor necrosis factor- alpha (TNF α) and interleukin 1 beta (IL1 β), with simultaneous reduction of anti-inflammatory substances, such as IL10 and adiponectin (3). Several co-morbidities associated with obesity are related with the WAT pro-inflammatory state, in particular, insulin resistance, hyperglycemia, dyslipidemia, and hypertension, characterizing the metabolic syndrome (MS) (4,5).

The metabolic and secretory dysfunctions in the WAT from obese subjects are well established events, however, the causes involved in these processes are unknown. In this sense, neuronal and immunological interrelations seem to have an important role in obesity, an evident mechanism in the interplay between the vagus nerve (VN) and spleen, impacting WAT function (6–8).

Autonomic nervous system (ANS) unbalance is commonly observed in obesity, with VN hyperactivity involved in hyperinsulinemia, insulin resistance, glucose intolerance, and excessive WAT mass expansion (9,10). Studies developed in more recent decades have demonstrated that the VN is also able to modulate immunological responses, an anti-inflammatory vagal reflex, where splenic activity is necessary for this vagal-immunomodulatory action (7). WAT vagal innervation is a matter of discussion for several research groups (7,11). In this regard, some argue a lack of significant vagal innervation in WAT, while (11) reporting the presence of a parasympathetic input in WAT. Independently of these discussion points, it is clear that VN ablation (vagotomy) induces WAT mass reduction, a response observed in human (12) and rodent obesity models (13).

Interestingly, more recent data have demonstrated that a reduction in brain-melanocortin signaling actively promotes fat mass gain, by activating the lipogenic program in adipocytes and the proliferation of endothelial cells in WAT depots. Both mechanisms occur regardless of caloric intake via efferent nerve fibers conveyed by the common VN hepatic branch (14). Moreover, it is possible that the VN modulates WAT content by controlling the sympathetic peripheral tonus via central nervous system (CNS). In this sense, subdiaphragmatic vagotomy impairs the

brown adipose tissue (BAT)-mediated diet-induced thermic response (15), while acute VN stimulation increases norepinephrine concentrations and transmission in the rat brain (16).

As above mentioned, anti-inflammatory vagal action may be dependent on the splenic activity (17). The VN innervates the celiac ganglion (18) being functionally relevant for the control of sympathetic tone to the spleen (17). As such, the sympathetic nervous system (SNS) and the VN synergically act through the splenic nerve, to inhibit the release of TNF α by macrophages in the spleen (7).

Besides of the known neuro-immune responses involving the spleen, this organ also affects energy homeostasis (8,19). Splenectomy changes WAT content, glucose and lipids homeostasis, and insulin sensitivity in obese rodents (20). Obesity provokes fat accumulation and induces higher inflammatory responses in the spleen (21). Centrally administered leptin increases SNS flux to the spleen (22). Moreover, the spleen plays an important role in the occurrence and development of diabetes. Infusion of adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) reduces hyperglycemia and insulin resistance in diabetic rats, a response that may be partially mediated by promoting spleen-derived anti-inflammatory cytokine IL-10 expression (23). Obesity is hypothesized to suppress the synthesis of IL-10, resulting in chronic inflammation in WAT (24).

Taken together, these data indicate that the VN and the spleen could play a bi-directional interaction with WAT . Thus, in the present work, we evaluated the effect of vagotomy associated with splenectomy on WAT content, histology and IL10 expression in hypothalamic obese and non-obese male Wistar rats.

2. Material and Methods

2.1 Animals

Pregnant Wistar rats (n=10) were obtained from the central animal facility of the Western Paraná State University (Unioeste) and transferred to the sectorial animal facility of the Laboratory of Endocrine and Metabolic Physiology (LAFEM). Animals were allocated into individual cages and received water and rodent chow (Biobase; SC; BR) ad libitum until the birth of offspring. At birth, the offspring size was adjusted to 6- 8 male pups per dam, which were maintained under controlled luminosity cycles (12h light-dark) and temperature (23 \pm 2 $^{\circ}$ C) during the lactation phase. All experimental procedures were approved by the local Ethics Committee

on Animal Use (CEUA) on March 16th, 2017, according to the Brazilian guidelines of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

2.2 Hypothalamic Obesity

On the second day after birth, the offspring were divided into two groups. One group (n=44) received a daily subcutaneous injection of monosodium glutamate (MSG) in a dose of 4g/Kg of body weight (bw) during five consecutive days according to a previously established protocol (25). Elevated MSG doses to neonates provoke hypothalamic lesions, inducing lifelong obesity (26,27). This group was denominated M-Obese. As controls, non-obese rats (CTL; n =44) received equimolar saline solution. After weaning (21 days of life), M-Obese and CTL animals were randomly distributed into cages (3 rats/cages) and at 60 days of life subdivided according to the surgical procedures described below.

2.3 Surgery protocols

At 60 days of life, M-Obese (n=22) and CTL (n=22) groups were submitted to subdiaphragmatic vagotomy (SV) and/or splenectomy (SPL) (28,29). Briefly, after 12h of fasting, animals were anesthetized with isoflurane (1%) and maintained in spontaneous ventilation with oxygen (1mL/min). Then, the abdominal cavity was opened throughout a incision (± 2 cm) performed immediately bellow the sternum. Liver was moved for visualization of the anterior and posterior VN ramus in the esophagus wall. The VN ramus were placed away from the esophageal wall, tied and posteriorly sectioned. For splenic surgery, the abdominal incision was done as described above, the blood vessel connected to the spleen was tied and the organ excised and weighted. A group of animals had both SV and SPL surgeries performed in the same procedure, while another group was submitted to a sham surgery. At the end, eight experimental groups were originated (n=11 rats), as illustrated in Figure 1. After the surgical procedures, all rats were transferred to individual cages, receiving water and rodent chow ad libitum for 1 week, to guarantee postoperative recovery. After this period, animals were regrouped (3 rats/cage) according to the surgical protocol until 150 days of life.

2.4 Biometric and plasma parameters

From 70 to 150 days of life, rats were weighted for body weight gain (g) calculation. At 150 days of life, the naso-anal length (NAL; cm) was evaluated, and

after 12h of fasting, rats were euthanized, total blood was collected in heparinized tubes, and plasma used for dosage of glucose, triglycerides and total cholesterol by enzymatic kits (Bioiquid, SC company). Plasma insulin was measured by radioimmunoassay. Glucose and triglycerides values in fasting were used for TyG Index calculation using the formula: $\text{Log}(\text{triglycerides (mg/dL)} * \text{glucose (mg/dL)} / 2)$ (31). Plasma samples were also used for IL10 dosage by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's instructions. Immediately after euthanasia, abdominal cavity was opened, the stomach was excised, cleaned and weighted. Stomach's weight was used as a parameter of SV efficacy (32). In non-splenectomized rats, the spleen was also excised, cleaned and weighted. The final body weight and NAL were used to obtain the Lee index [$3\sqrt{\text{body weight (g)} / \text{NAL (cm)}}$] as previously proposed by another author (33).

2.5 WAT Histological Analysis

After euthanasia, the mesenteric (WAT-M) and inguinal (WAT-I) WAT depots were excised, weighed, and a fragment was immediately transferred to Alfac, a histological fixation solution constituted by a mixture of alcohol (80%), formol (10%), and glacial acetic acid (5%), during 24h. After this period, the WAT tissue samples were transferred to an alcoholic (70%) solution for histological procedures. For this, WAT depots were diaphanized in xylol, dehydrated in alcoholic solution and embedded in paraplast (McCormickTM), being finally submitted to the microtomy procedures. Semi-serial cuts (5 μm) were performed and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Tissues from five to six rats per group were used to assemble the slides for histology (three slides per rat, containing at least 3 slices each). Images of the slides were captured using a photomicroscope (OLYMPUS BX60) at a magnification of 40x. Adipocytes size (μm^2) and number (number/field) were measured using an image analysis system (Image J 1.39f, NIH – Bethesda, MD, USA). A total of 50 adipocytes were analyzed per section.

2.6 WAT Western Blotting

Fragments of WAT-M and WAT-I depots were homogenized in 200 μL of lysis buffer (10 mM EDTA, 100 mM tris base, 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium orthovanadate, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% triton X-100, and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin). Protein concentration was measured using Bradford reagents (SIGMA, B6916). Then, 30 μg of protein samples were homogenized and boiled (5 min at 100 °C) in Laemmli buffer. Proteins were then

separated by electrophoresis in a 15% polyacrylamide gel. The transfer to nitrocellulose membranes was performed in Trans Blot transfer for 2 h at 110 V, with tris/glycine buffer. Membranes were blocked in a tris-buffered saline (10 mM tris base, 150 mM NaCl and 0.25% (vol./vol.) of tween 20) containing 5% (wt./vol.) of non-fat milk for 1 hour at room temperature. After blocking, membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies against IL-10 and Tubulin. Detection of specific protein bands was performed by incubating membranes with appropriate secondary antibodies and bands detection was performed by measuring chemiluminescence (LOCCUS). Bands intensity was quantified by optical densitometry using the software LabImageID.

2.7 Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). CTL and M-Obese groups were compared using Student's t test ($p < 0.05$). The main outcome measurements were analyzed by two-way ANOVA, followed by Tukey post hoc test ($p < 0.05$). *Glass's Delta*, for effect size (ES) evaluation, was also calculated and physiological relevance was interpreted as small ($d = 0.2$), medium ($d = 0.5$), or large ($d = 0.8$).

3. Results

3.1 Hypothalamic obesity

As shown in Table 1, hypothalamic lesions induced by M neonatal treatment had a large effect (higher ES values) on biometric and biochemical parameters throughout life. At 150 days of life, M-Obese rats had lower body weights (29%; ES = -3.83), NAL (16%; ES = -10.30) and spleen weights (26%; ES = -1.29) compared to the CTL group ($p < 0.05$). In contrast, M-Obese rats showed higher Lee index (6%; ES= 2.59) compared to CTL animals ($p < 0.05$). Moreover, despite normoglycemia (ES= - 0.78), the M-Obese group presented elevated plasma values of triglycerides (44%; ES= 2.44) and hyperinsulinemia (48%; ES= 1.60) compared to CTL rats ($p < 0.05$). The TyG index was approximately 6% (ES= 2.01) higher in the M-Obese group than in CTL animals. The stomach weight (ES= 0.55) as well as IL10 plasma levels (ES= 0.68) were similar between M-Obese and CTL groups (Table 1; $p > 0.05$).

High fat content was observed in WAT-M (ES = 7.89) and WAT-I (ES = 3.12) deposits of M-Obese rats compared to the CTL group (Table 1; $p < 0.05$). Confirming the intense adiposity, adipocyte hypertrophy (WAT-I, ES= 2.19 and WAT-M, ES= 17.67) and reduction in adipocytes number (WAT-I: - 2.35 and WAT-M: - 4.67) were observed in WAT deposits of M-Obese rats compared to the CTL group (Figure 2; $p < 0.05$).

3.2 Effect of the vagus nerve and/or spleen ablation on biometric, metabolic and adiposity in non-obese (CTL) rats

As a consequence of the SV surgery, the stomach weight was 53% (ES= 12.37) and 52% (ES = 11.76) higher in CTLSV and CTLSV+SPL groups, respectively, in comparison to CTLSHAM animals ($p < 0.0001$; Table 2 and Supplementary table S1). The SV surgery significantly affected body weight gain ($F(1.40) = 0.0823$; $p = < 0.0001$) and NAL ($F(1.30) = 11.10$; $p < 0.0023$). Thus, the body weight gain was reduced by 34.2% (ES= -3.25) and 34.6% (ES= -3.23) in CTLSV and CTLSV+SPL, respectively, compared to CTLSHAM group ($p < 0.05$). Similar results were also observed when compared to CTLSPL group (Table 2). Moreover, the CTLSV and CTLSV+SPL rats also displayed significant reductions in NAL when compared to non vagotomized groups (CTLSHAM and CTLSPL; $p < 0.05$). However, the Lee index was not affected by SV surgery. In contrast, spleen ablation did not affect body weight gain or NAL, but influenced in the Lee index ($F(1.28) = 5.033$; $p = < 0.0330$). The spleen weight was similar between CTLSHAM and CTLSV groups (ES= -0.46, $p > 0.05$; Supplementary Table S1 and Table 2).

SV surgery modified the fasting glycemia ($F(1.31) = 13.33$; $p = 0.0010$) with interaction between SV surgery and spleen ablation in this variable ($F(1.31) = 81.96$; $p = 0.075$). Thus, CTLSV+SPL rats showed hyperglycemia in relation to other experimental groups ($p < 0.001$). In addition, IL10 plasma levels were modified by SV (ES=3.13) and SPL (ES= 0.69) IL10 plasma levels were significantly elevated in CTL-SV rats compared with other groups. In association, SV+SPL provoked a reduction in IL10 plasma levels (ES= -0.58; $p < 0.001$; Table 2 and supplementary Table s1).

The impact of SV and/or SPL surgeries on adiposity content and histology from non-obese rodents are presented in Figures 3 (a-f) and 4 (a-f). The adiposity content was significantly influenced by SV surgery in both WAT-M ($F(1.28) = 16.50$; $p = 0.0004$) and WAT-I ($F(1.40) = 7.341$; $p = 0.0099$) depots (Figures 3a and 4a). Thus, the weight of WAT-M in CTL-SV group was reduced by 35% and 40% respectively,

in relation to CTLSHAM and CTLSPL rats ($p < 0.05$; Figure 4a). Moreover, CTLSV animals also presented smaller WAT-I weight in comparison to CTLSPL rats (Figure 3d; $p < 0.05$). Spleen ablation alone did not alter the WAT content and the CTL-SV+SPL group did not show any significant reduction in WAT-M and WAT-I content (figure 3d and 4d; $p > 0.05$). Thus, in WAT-M depots from CTL-SV rats, we observed significant reduction in adipocytes size ($ES = -4.14$; $p < 0.05$; Supplementary table 1 and Figure 4e) and a consequently higher adipocytes number ($ES = 4.74$; $p < 0.05$; Supplementary table and Figure 4f) in comparison with CTLSHAM animals, as illustrated in Figure 4a. Similarly, in WAT-I depots from the CTL-SV group, we observed a reduction in adipocytes size ($ES = -1.09$; $p < 0.05$; Supplementary table S1 and Figure 3e) and an increase in adipocytes number ($ES = 3.21$; $p < 0.05$; Supplementary table and Figure 3f), as showed in Figure 3a. Spleen ablation alone, did not change adipocytes size or number in WAT-M or WAT-I depots. However, the effects of vagotomy were not observed in the SV+SPL groups, (Figure 2 and 3). Despite a reduction in IL10 expression and a moderate effect observed in WAT-M ($SE = -0.50$) and WAT-I ($SE = -0.70$) from CTLSV group, no statistical differences were found (Figure 3 b-c and Figure 4 b-c). The size effect of all surgeries in non-obese rats is shown in supplementary table S1.

3.3 Effect of the vagus nerve and/or spleen ablation on biometric, metabolic and adiposity in M-Obese rats.

The VN ablation induced significant increases in stomach weight in M-ObeseSV ($ES = 4.67$) and M-ObeseSV+SPL ($ES = 7.24$) rats in relation to M-Obese sham groups ($p < 0.0001$), confirming gastric stasis (Table 3 and supplementary table 1). In the M-Obese groups, we observed influence of SV ($F(1, 36) = 25.75$; $p < 0.0001$) and SV+SPL surgeries ($F(1, 36) = 4.963$; $p = 0.0322$; Table 3). Thus, the M-ObeseSV ($ES = -1.57$) and M-Obesesp ($ES = -0.54$) groups showed significant reduction of approximately 24% in body weight gain in comparison to M-Obese sham rats ($p < 0.05$, Table 3 and supplementary table 1). Neither SV nor SPL surgeries altered NAL and spleen weight in M-Obese animals. However, SV surgery affected the Lee index ($F(1, 26) = 7.933$; $p = 0.0091$) resulting in smaller Lee index value in M-ObeseSV+SPL rats compared to M-ObeseSHAM animals ($ES = -2.40$; $p < 0.05$; Table 3 and supplementary table 1). Fasting values of glucose and total cholesterol were not modified by SV and/or SPL surgeries ($p > 0.05$). In contrast, SPL surgery affected insulin fasting plasma levels ($F(1, 23) = 7.862$; $p = 0.0101$) resulting in lower levels in M-ObeseSV animals when compared with the M-ObeseSV+SPL

groups ($p < 0.05$; Table 3). Moreover, SV surgery also affected plasma triglycerides levels ($F(1, 17) = 6.573$; $p = 0.201$), promoting significant reductions in M-Obese SV ($ES = -2.02$) and M-Obese SV+SPL ($ES = -1.88$) groups in comparison with M-Obese sham rats ($p < 0.05$, Table 3 and supplementary table S1). Thus, the TyG index was influenced by SV surgery ($F(1, 15) = 25.67$; $p = 0.0001$). Therefore, we found smaller values of TyG index in M-ObeseSV ($ES = -2.17$) and M-ObeseSV+SPL ($ES = -2.01$) groups in relation to M-SHAM rats ($p < 0.05$; Table 3 and supplementary table S1). M-Obese rats did not show significant changes in IL10 plasma levels in any of the surgical procedures.

The influence of SV and/or SPL surgeries on adiposity content and histology of M-Obese rats are shown in Figures 5 and 6. SV surgery altered only WAT-M content and adipocytes size ($F(1, 20) = 9.012$; $p = 0.0070$) and number ($F(1, 20) = 12.42$; $p = 0.0021$) in M-Obese groups. M-ObeseSV ($ES = -1.21$) and M-Obese SV+SPL ($ES = -1.24$) groups showed reduction in WAT-M weight ($p < 0.05$, Figure 6d and supplementary table 1). Moreover, M-ObeseSV ($ES = -1.17$) and M-Obese SV+SPL rats ($ES = -1.44$) showed smaller adipocyte size and increased adipocytes number ($ES = 2.83$ and 3.50 , respectively) compared to WAT-M depots from M-ObeseSHAM rats (Figure 6f and supplementary Table S1), as shown by representative H&E photomicrography (Figure 6a).

Although no significant effect of SV and SPL surgeries on WAT-I content (figure 5) was found, SV surgery affected adipocytes size $F(1, 16) = 13.83$; $p = 0.0019$) and number $F(1, 17) = 16.25$; $p = 0.0009$). M-Obese SV rats displayed smaller adipocyte size ($SE = -2.88$) and increased adipocyte number ($SE = 3.96$) in relation to M-ObeseSHAM animals (Figure 5 and supplementary table 1), as evidenced by H&E photomicrography (Figure 5a). IL10 expression (Figures 5b-c and 6b-c, respectively) was not modified neither by SV nor SPL ablation in both WAT depots. The ES of all surgeries in M-Obese groups is shown in the supplementary table S1.

4. Discussion

Confirming previous studies published for by us (34) and others (20), neonatal MSG administration promoted massive adiposity, insulin resistance, hypertriglyceridemia and hyperinsulinemia. Obesity was characterized by adipocyte hypertrophy in visceral and subcutaneous depots. Elevated insulin lipogenic action (35), reduced SNS activity, and consequent smaller lipolytic responses, associated

with higher cortisol and reduced growth hormone (GH), are all elements involved in adipocyte hypertrophy in this obesity model. Moreover, autonomic unbalance, with higher vagal hyperactivity and lower sympathetic tonus, are evident phenomena in M-Obese treated rodents (27). In addition, herein we confirmed the reduction of spleen weight, also related with histological alterations in white and red pulp in this organ, as previously demonstrated by our research group (36). Despite the spleen atrophy observed in the present study, we did not observe significant reductions in IL10 plasma levels in obese rats, in contrast to a previous study (37).

ANS and immunological functions are differently modulated in obesity and non-obesity conditions (10,24) thus in the present work the effects of SV and/or SPL surgeries were compared for CTL (non-obese) and M-Obese groups, as mentioned below. Our data corroborate previously published studies, showing that SV surgery reduces body weight gain and lowers adiposity in CTL and M-obese animals (38,39). The lower body weight gain and adiposity in vagotomized groups cannot be attributed to a reduction in food intake, since we found no alteration in food intake in vagotomized rats (data not shown). The impact of VN ablation on food intake presents contradictory results, and time and technique surgery procedure are important aspects to consider when interpreting these results (39). In this regard, SV causes a reduction in stomach motility and consequent gastric stasis, with higher food accumulation in this organ (39). Herein, the stomach weight from vagotomized rats (M-obese and CTL) was significantly higher in relation to sham animals, indicating SV surgery efficacy. CTLsv rats showed significant reduction in growth, suggesting an impact of VN in GH action or secretion. Moreover, ghrelin is a GH-releasing factor, altered by gastric stasis (40). Our findings corroborate with a study by (41), which demonstrated that vagotomized animals down-regulate GHRH mRNA in the arcuate nucleus of the hypothalamus and a down-regulate both GHRH and GHS receptors' mRNA at the pituitary level, which are essential for the full GH-releasing effect of ghrelin. These responses were not observed in M-Obese animals due to extensive ARC lesions and a well-recognized reduction in GH releasing in M-Obese treated rats (27).

The VN has important role in glucose homeostasis, in particular by modulating insulin secretion in pancreas (38). In the present work we noted several effects on fasting parameters between CTL and M-Obese animals. Thus, fasting glucose elevation was a consequence of VN ablation in CTL rats and was accentuated by the absence of a spleen, suggesting the participation of both VN and spleen in glucose homeostasis. Recently, we demonstrated that spleen ablation

at 60 days of life reduces fasting glycemia in CTL rats without altering glycemia or insulin during intravenous glucose tolerance test (ivGTT) (42). In contrast, in the same study we showed a reduction in insulin release and improvement in insulin sensitivity in splenectomized M-obese rats. These data indicate that regulation of glucose homeostasis in obesity and non-obesity conditions is differently modulated by the VN and spleen. It is known that M-Obese rats show VN hyperactivity and spleen dysfunctions (9). In the present study, SV surgery reduced fasting insulin and improved insulin sensibility in M-Obese rats, but not in CTL animals. It is well-recognized that vagal hyperactivity is associated with hyperinsulinemia and insulin resistance in M-Obese rodents (10,43). SV surgery provoked a reduction in triglycerides plasma levels, with more pronounced effects in M-obese rats, confirming that vagal dysfunctions impact lipids metabolism (44). Additionally, the VN also can control triglycerides by afferent vagal signals (45). Thus, chronic VNS resulted in a reduction in triglycerides in the plasma of rats (46).

The reduction of body weight and triglycerides levels may be partially explained by the reduction of adiposity observed in CTL and vagotomized M-obese rats. However, WAT reduction induced by vagotomy was more evident in CTL animals, with significant diminution in adipocyte size in visceral and subcutaneous WAT depots. These data suggested that, in the healthy state, the VN has a greater impact in fat mass regulation.

Insulin is a central hormone for adipocyte lipogenesis and proliferation (47). Considering that in CTL rats, neither insulin levels nor insulin sensibility were affected by SV surgery, we believe that VN ablation in this case favors SNS lipolytic action in WAT. The VN appears to be able to affect peripheral SNS flux by a modulatory action on the nucleus of the solitary tract (NTS) and hypothalamic nucleus (48). In this regard, auricular vagal neural stimulation (VNS) elevates norepinephrine levels in WAT depots (46). Moreover, as demonstrated by another study (49), the VN exerts effect on lipogenic pathways in WAT via melanocortin system responses at the hypothalamic level, suggesting that increased VN activity may have a role in the gain of fat mass.

In M-Obese animals, insulin fasting and insulin sensibility were improved by VN ablation, explaining the adipocyte size reduction (12,38). SV surgery in M-obese rats probably corrects vagal hyperactivity by restoring insulin action and exerting anti-adiposity effects, as suggested in other studies (38). Similarly, clinical studies have demonstrated that surgical ablation of the abdominal VN can result in

considerable reduction of body weight (32) and vagal denervation has also been linked to increased weight loss following gastrectomy (13).

Nevertheless, in obesity, vagal afferent signals are disturbed, thus vagal blocking therapy can provide significant weight loss in obese patients (12,50). Vagal-dependent signals are sufficient to mediate the increased WAT lipogenesis in response to reduction in brain melanocortin signaling without diminishing the local SNS tone (14). Finally, VNS is able to increase brown adipose tissue thermogenesis and promote brightening in WAT depot of obese rodents, favoring elevated energy expenditure and fat reduction (3).

In the present study, we also noted that, in M-obese animals, the visceral WAT depot was more responsive to VN ablation, presenting higher reduction in adipocyte size. As previously observed (13), selective vagotomy in gastrectomy results in preferential reduction of visceral WAT, indicating that VN locally regulates the amount of intra-abdominal fat tissue and that surgical denervation of VN may be considered as a reasonable treatment for obesity (13).

We (42) and others (17,51) have demonstrated that the spleen can participate in glucose homeostasis and fat mass distribution. Interestingly, the VN and spleen are involved in common responses, especially immunological and anti-inflammatory activities (8,52,53). Our data indicate, for the first time, that vagal-splenic signals could be participating in WAT mass control. In this context, the vagal reduction in WAT fat content, including diminished adipocyte size, was blockaded in the absence of the spleen, in particular in CTL rats. The spleen has already been reported as an important site of IL10 production (24). According to the authors, IL10 is reduced in splenectomized rats, favoring adipocyte inflammation. In contrast, our study found that splenectomy did not promote significant reductions in IL10 plasma levels in neither CTL nor in M-Obese rats. Interestingly, we observed that, in CTL animals, exclusively, there is a rise in IL10 plasma levels after vagotomy surgery, an effect that does not occur when vagotomy surgery is associated with spleen ablation. The anti-inflammatory effects of SNS on the spleen have been previously observed (54), and involve IL10 production via the beta adrenergic receptor. Thus, we speculate that in vagotomized CTL animals there is an augmented SNS to spleen rate, stimulating IL10 production. This hypothesis is supported by another study that found higher levels of norepinephrine in the spleen after vagotomy (55).

Increased plasma levels of IL10 observed in vagotomized CTL animals does not appear to be dependent of WAT, since IL10 protein expression in visceral or subcutaneous WAT were not influenced by SV surgery. The role of IL-10 in WAT is

largely unknown. Some studies have suggested that IL-10 might create an anti-inflammatory milieu by promoting the activity of M2 macrophages (56–58). In contrast, IL10 adipogenic and pro-inflammatory effects have also been reported (59).

In our study, neither SV nor SPL promoted significant alterations in IL10 plasma levels or IL10 expression in WAT from M-Obese rats, indicating that other factors may be mediating WAT reduction in obesity condition. Moreover, in M-Obese rats, the absence of spleen associated with vagotomy did not influence WAT mass and histology, suggesting that the vagal-splenic circuits are interrupted in obesity. Similarly, other studies have not supported an anti-obesity role for IL-10 as well (60,61). In this sense, loss of IL-10 in mice increased energy expenditure and protected against diet-induced obesity, and did so in the absence of overt systemic or adipose inflammation (62) .

We have previously demonstrated that the spleen of M-Obese rats display altered histological distribution of white splenic pulp (36), suggesting splenic dysfunction in this obesity model. However, to date, IL10 production in the spleen of M-Obese rats has not been studied. In addition, the participation of other cytokines in adipocyte vagal-splenic responses cannot be discharged. For example, the IL17 response by spleen cells has been demonstrated to be dependent on the presence of adipocyte-derived mediators (63), suggesting that multiple cytokines participate in cross-directional interactions between spleen and adipocytes.

In conclusion, SV surgery is able to induce WAT mass and adipocyte size reduction in obesity and non-obesity conditions. However, in the healthy state, increased IL10 plasma levels and presence of spleen are necessary for the anti-adiposity effects of vagotomy. In contrast, in M-Obese animals, reductions in triglycerides and insulin plasma levels as well as an improvement in insulin resistance, are important elements for anti-adiposity responses to vagotomy. Thus, metabolism and fat mass are regulated by several interactive mechanisms between vagal and splenic activities in healthy and obesity conditions.

Acknowledgments

We thank Dr. Antonio Carlos Boschero and Dr. Everardo Magalhães Carneiro from the Obesity and Comorbidities Research Center, University of Campinas, for the laboratorial and technical support. We also thank Mrs. Ana Caroline Retamero for histological technical assistance.

Financial Support

This project received financial support from Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), grant number 309633/2016-8.

5. References

1. Lacerda MS, Malheiros GC, Abreu A de OW de. Tecido Adiposo, Uma Nova Visão: As Adipocinas E Seu Papel Endócrino. *Rev Científica da Fac Med Campos*. 2016;11(2):25–31.
2. Gustafson B, Smith U. Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk. *Atherosclerosis* [Internet]. 2015;241(1):27–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.812>
3. van Meijel RLJ, Blaak EE, Goossens GH. Adipose tissue metabolism and inflammation in obesity [Internet]. *Mechanisms and Manifestations of Obesity in Lung Disease*. Elsevier Inc.; 2019. 1–22 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813553-2.00001-4>
4. Klötting N, Blüher M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord*. 2014;15(4):277–87.
5. Chu DT, Minh Nguyet NT, Dinh TC, Thai Lien NV, Nguyen KH, Nhu Ngoc VT, et al. An update on physical health and economic consequences of overweight and obesity. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*. 2018;12(6):1095–100.
6. Martin KA, Mani M V., Mani A. New targets to treat obesity and the metabolic syndrome. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2015;763:64–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.093>
7. Pavlov VA, Tracey KJ. Neural regulation of immunity: Molecular mechanisms and clinical translation. *Nat Neurosci*. 2017;20(2):156–66.
8. Ai XM, Ho LC, Han LL, Lu JJ, Yue X, Yang NY. The role of splenectomy in lipid metabolism and atherosclerosis (AS). *Lipids Health Dis*. 2018;17(1):1–8.
9. Cohen M, Syme C, McCrindle BW, Hamilton J. Autonomic nervous system balance in children and adolescents with craniopharyngioma and hypothalamic obesity. *Eur J Endocrinol*. 2013;168(6):845–52.
10. Balbo SL, Ribeiro RA, Mendes MC, Lubaczeuski C, Maller ACPA, Carneiro EM, et al. Vagotomy diminishes obesity in cafeteria rats by decreasing cholinergic potentiation of insulin release. *J Physiol Biochem*. 2016;72(4):625–33.

11. Giordano A, Song CK, Bowers RR, Ehlen JC, Frontini A, Cinti S, et al. White adipose tissue lacks significant vagal innervation and immunohistochemical evidence of parasympathetic innervation. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2006;291(5):1243–55.
12. Apovian CM, Shah SN, Wolfe BM, Ikramuddin S, Miller CJ, Tweden KS, et al. Two-Year Outcomes of Vagal Nerve Blocking (vBloc) for the Treatment of Obesity in the ReCharge Trial. *Obes Surg* [Internet]. 2017;27(1):169–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11695-016-2325-7>
13. Miyato H, Kitayama J, Hidemura A, Ishigami H, Kaisaki S, Nagawa H. Vagus Nerve Preservation Selectively Restores Visceral Fat Volume in Patients with Early Gastric Cancer who Underwent Gastrectomy. *J Surg Res* [Internet]. 2012;173(1):60–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2010.08.040>
14. Holland J, Sorrell J, Yates E, Smith K, Arbabi S, Rivir M, et al. A Brain-Melanocortin-Vagus Axis Mediates Adipose Tissue Expansion Independently of Energy Intake. 2019;27(8):2399–410.
15. Andrews PL, Rothwell NJ, Stock MJ. Effects of subdiaphragmatic vagotomy on energy balance and thermogenesis in the rat. *J Physiol*. 1985;362(1):1–12.
16. Follesa P, Biggio F, Gorini G, Caria S, Talani G, Dazzi L, et al. Vagus nerve stimulation increases norepinephrine concentration and the gene expression of BDNF and bFGF in the rat brain. *Brain Res*. 2007;1179(1):28–34.
17. Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Sergio I, Valdés-Ferrer YAL, Reardon C, Tusche MW, et al. Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. *Science* (80-). 2015;334(6052):98–101.
18. Berthoud HR, Neuhuber WL. Vagal mechanisms as neuromodulatory targets for the treatment of metabolic disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2019;1454(1):42–55.
19. KING JH. STUDIES IN THE PATHOLOGY OF THE SPLEEN. *Arch Intern Med*. 1914;14(2):146–67.
20. Leite NDC, Montes EG, Fisher SV, Cancian CRC, De Oliveira JC, Martins-Pinge MC, et al. Splenectomy attenuates obesity and decreases insulin hypersecretion in hypothalamic obese rats. *Metabolism* [Internet]. 2015;64(9):1122–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2015.05.003>
21. Turbitt WJ, Collins SD, Meng H, Rogers CJ. Increased adiposity enhances the accumulation of MDSCs in the tumor microenvironment and adipose tissue of pancreatic tumor-bearing mice and in immune organs of tumor-free hosts. *Nutrients*. 2019;11(12).

22. Tanida M, Iwasaki Y, Yamamoto N. Central injection of leptin increases sympathetic nerve outflows to the stomach and spleen in anesthetized rats. *In Vivo (Brooklyn)*. 2019;33(6):1827–32.
23. Zhang J, Deng Z, Jin L, Yang C, Liu J, Song H, et al. Spleen-Derived Anti-Inflammatory Cytokine IL-10 Stimulated by Adipose Tissue-Derived Stem Cells Protects Against Type 2 Diabetes. *Stem Cells Dev*. 2017;26(24):1749–58.
24. Gotoh K, M I, T M, S C, T S, H A, et al. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced hypothalamic inflammation. *J Neurochem*. 2012;120:752–64.
25. Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science (80-)*. 1969;164(3880):719–21.
26. Timper K, Brüning JC. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: Pathways to obesity. *DMM Dis Model Mech*. 2017;10(6):679–89.
27. Coelho CFF, França LM, Nascimento JR, Dos Santos AM, Azevedo-Santos APS, Nascimento FRF, et al. Early onset and progression of non-alcoholic fatty liver disease in young monosodium l-glutamate-induced obese mice. *J Dev Orig Health Dis*. 2019;10(2):188–95.
28. Balbo S, Grassioli S, Ribeiro R, Bonfleur M, Gravena C, Brito M, et al. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. *Endocrine*. 2007;31(2):142–8.
29. Gotoh K, Inoue M, Masaki T, Chiba S, Shimasaki T, Ando H, et al. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced inflammation in white adipose tissue and liver. *Diabetes*. 2012;61(8):1994–2003.
30. Gotoh K, Inoue M, Shiraishi K, Masaki T, Chiba S, Mitsutomi K, et al. Spleen-Derived Interleukin-10 Downregulates the Severity of High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease. *PLoS One*. 2012;7(12):1–13.
31. Guerrero-Romero F, Simental-Mendía LE, González-Ortiz M, Martínez-Abundis E, Ramos-Zavala MG, Hernández-González SO, et al. The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(7):3347–51.
32. Arthur Campfield L, Smith FJ, LeMagnen J. Altered endocrine pancreatic function following vagotomy: possible behavioral and metabolic bases for assessing completeness of vagotomy. *J Auton Nerv Syst*. 1983;9(1):283–300.
33. PATTERSON LLB and BD. Carcass Fat Content in Weanling and Adult Female Rats With Hypothalamic Lesions *J* [*J Endocrinol*. 1968;40(1965):527–8.

34. Grassioli S, Gravena C, de Freitas Mathias PC. Muscarinic M2 receptor is active on pancreatic islets from hypothalamic obese rat. *Eur J Pharmacol.* 2007;556(1–3):223–8.
35. Kulyte A, Ehrlund A, Arner P, Dahlman I. Global transcriptome profiling identifies KLF15 and SLC25A10 as modifiers of adipocytes insulin sensitivity in obese women. *PLoS One.* 2017;12(6):1–20.
36. Paulo J, Amorim DA, Grassioli S. Exercise and Vitamin D Supplementation Modify Spleen Morphology in Lean, but not, in Monosodium-Glutamate-Obese Rat. *J SPLEEN LIVER Res.* 2019;1(3):1–14.
37. Caetano LC, Bonfleur ML, Ribeiro RA, Nardelli TR, Lubaczeuski C, do Nascimento da Silva J, et al. Taurine supplementation regulates I κ -B α protein expression in adipose tissue and serum IL-4 and TNF- α concentrations in MSG obesity. *Eur J Nutr.* 2017;56(2):705–13.
38. Dezfuli G, Gillis RA, Tatge JE, Duncan KR, Dretchen KL, Jackson PG, et al. Subdiaphragmatic vagotomy with Pyloroplasty Ameliorates the obesity caused by genetic deletion of the Melanocortin 4 receptor in the mouse. *Front Neurosci.* 2018;12(MAR):1–16.
39. Souza F de, Marchesini JB, Campos ACL, Malafaia O, Monteiro OG, Ribeiro FB. Efeito da vagotomia troncular em ratos injetados na fase neonatal com glutamato monossódico: estudo biométrico. *Acta Cir Bras.* 2001;16(1):414.
40. Romero CEM, Zanesco A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. *Rev Nutr.* 2006;19(1):85–91.
41. Al-Massadi O, Trujillo ML, Señaris R, Pardo M, Castelao C, Casanueva FF, et al. The vagus nerve as a regulator of growth hormone secretion. *Regul Pept* [Internet]. 2011;166(1–3):3–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.regpep.2010.10.008>
42. de Souza TA, de Souza DW, Siqueira BS, Rentz T, de Oliveria Emílio HR, Grassioli S. Splenic participation in glycemic homeostasis in obese and non-obese male rats. *Obes Res Clin Pract.* 2020;14(5):479–86.
43. Miranda RA, Agostinho AR, Trevenzoli IH, Barella LF, Franco CCS, Trombini AB, et al. Insulin oversecretion in MSG-obese rats is related to alterations in cholinergic muscarinic receptor subtypes in pancreatic islets. *Cell Physiol Biochem.* 2014;33(4):1075–86.
44. Lubaczeuski C, Balbo SL, Ribeiro RA, Vettorazzi JF, Santos-Silva JC, Carneiro EM, et al. Vagotomy ameliorates islet morphofunction and body metabolic homeostasis in MSG-obese rats. *Brazilian J Med Biol Res.* 2015;48(5):447–57.

45. Waise TMZ, Dranse HJ, Lam TKT. The metabolic role of vagal afferent innervation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2018;15(10):625–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41575-018-0062-1>
46. Chen SH, Chen HC, Hsieh CL, Chao PM. Electric stimulation of ears accelerates body weight loss mediated by high-fat to low-fat diet switch accompanied by increased white adipose tissue browning in C57BL/6 J mice 11 *Medical and Health Sciences 1111 Nutrition and Dietetics. BMC Complement Altern Med.* 2018;18(1):1–8.
47. Seoane-Collazo P, Fernø J, Gonzalez F, Diéguez C, Leis R, Nogueiras R, et al. Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine.* 2015;50(2):276–91.
48. McDougal DH, Hermann GE, Rogers RC. Vagal Afferent Stimulation Activates Astrocytes in the Nucleus of the Solitary Tract Via AMPA Receptors: Evidence of an Atypical Neural-Glial Interaction in the Brainstem. *J Neurosci.* 2011;31(39):14037–45.
49. Holland J, Sorrell J, Yates E, Smith K, Arbabi S, Rivir M, et al. Expansion Independently of Energy Intake. 2019;27(8):2399–410.
50. Ikramuddin S, Blackstone RP, Brancatisano A, Toouli J, Shah SN, Wolfe BM, et al. Effect of reversible intermittent intra-abdominal vagal nerve blockade on morbid obesity: The ReCharge randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2014;312(9):915–22.
51. Wu L, Parekh V V., Hsiao J, Kitamura D, Van Kaer L. Spleen supports a pool of innate-like B cells in white adipose tissue that protects against obesity-associated insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(43):E4638–47.
52. DiSpirito JR, Mathis D. Immunological contributions to adipose tissue homeostasis. *Semin Immunol* [Internet]. 2015;27(5):315–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2015.10.005>
53. Serhan CN, Levy BD. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators Protection versus uncontrolled inflammation: first responders and resolution. *J Clin Invest* [Internet]. 2018;128(7):2657–69. Available from: <http://jci.me/97943/pdf>
54. Bonaz B, Sinniger V, Pellissier S. Anti-inflammatory properties of the vagus nerve: potential therapeutic implications of vagus nerve stimulation. *J Physiol.* 2016;594(20):5781–90.

55. Pongratz G, Melzer M, Straub RH. The sympathetic nervous system stimulates anti-inflammatory B cells in collagen-type II-induced arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(3):432–9.
56. Steen EH, Wang X, Balaji S, Butte MJ, Bollyky PL, Keswani SG. The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis. *Adv Wound Care.* 2020;9(4):184–98.
57. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007;117(1):175–84.
58. Almeida VL, Santana ITS, Fontes GS, Lima IFP, Matos ALP, Matos FR, et al. Influência de interleucinas no prognóstico de pacientes portadores de carcinoma de células escamosas intraoral. *J Bras Pato Med Lab.* 2019;55(5):559–67.
59. Acosta JR, Tavira B, Douagi I, Kulyté A, Arner P, Rydén M, et al. Human-Specific Function of IL-10 in Adipose Tissue Linked to Insulin Resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(10):4552–62.
60. Den Boer JJ, Oostendorp RAB, Beems T, Munneke M, Oerlemans M, Evers AWM. A systematic review of bio-psychosocial risk factors for an unfavourable outcome after lumbar disc surgery. *Eur Spine J.* 2006;15(5):527–36.
61. Jan Mauer, Chaurasia B, Goldau J, Vogt MC, Ruud J, Nguyen KD, et al. Interleukin-6 signaling promotes alternative macrophage activation to limit obesity-associated insulin resistance and endotoxemia. *Physiol Behav.* 2016;176(1):139–
62. Rajbhandari P, Thomas BJ, Feng AC, Hong C, Wang J, Vergnes L, et al. IL-10 Signaling Remodels Adipose Chromatin Architecture to Limit Thermogenesis and Energy Expenditure. *Cell* [Internet]. 2018;172(1–2):218-233.e17. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.019>
63. SILVANA A. VIELMA, KLEIN RL, LEVINGSTON CA, YOUNG and MRI. Premalignant Lesions Skew Spleen Cell Responses to Immune Modulation by Adipocytes. *Physiol Behav.* 2016;176(1):139–48.

Tables:

Table 1: Adiposity, biometric and metabolic profile of M treated rats.

Parameters	CTL	M-Obese	p-value	Effect size
Body weight (g)	433±9	306±5	<0.0001	-3.83
NAL (cm)	23.26±0.11	19.36±0.28	< 0.0001	-10.30
Lee Index	0.32±0.02	0.34±0.02	0.0008	2.59
WAT-I (g/100g)	0.27± 0.03	0.55± 0.05	0.0007	3.12
WAT-M (g/100g)	0.99± 0.060	2.26±0.25	0.0004	7.89
Stomach (g/100g)	0.48±0.01	0.49±0.02	0.6064	0.55
Spleen (g/100g)	0.14±0.01	0.10±0.01	0.0049	-1.29
Insulinemia (ng/mL)	0.09 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.0206	1.60
Glucose (mg/dL)	93±8	75±6	0.1124	-0.78
Triglycerides (mg/dL)	121.1±16	217.1±35	0.0337	2.44
TyG	2.00±0.03	2.13±0.04	0.0157	2.01
Cholesterol (mg/dL)	113±3.8	146±16.4	0.0722	3.25
IL-10 (pg/mL)	39.31±4.57	50.13 ± 3.94	0.1122	0.68

Data are mean ± SEM, n = 8-11 rats per group. NAL - nasoanal length; TyG: Triglycerides and glucose index; IL10: Interleukin 10; g, grams; cm, centimeters; mg, milligrams; dL, deciliters; ng, nanogram; mL, milliliters; CTL: control, M-Obese: MSG; WAT-I: Inguinal white adipose tissue; WAT-M: Mesenteric white Adipose Tissue; Student's t test (p <0.05).

Table 2. Effects of SV and/or SPL surgeries on biometric and biochemical parameters from non-obese rats (CTL)

	p-value						
	CTL _{SHAM}	CTL _{SPL}	CTL _{SV}	CTL _{SV+SPL}	SPL	SV	I
Body Weight gain (g)	149±5.1 ^{c,d}	129±4.8 ^{c,d}	98±7.4 ^{a,b}	98±10 ^{a,b}	0.2290	0.0001	0.2098
NAL (cm)	23.16±0.14 ^c	23.00±0.26	22.12±0.28 ^a	22.44±0.25	0.7521	0.0023	0.3186
Lee Index	0.32±0.002	0.31±0.004	0.32±0.003	0.31±0.002	0.0330	0.7143	0.8095
Stomach (g/100g)	0.48±0.01 ^{c,d}	0.52±0.03 ^{c,d}	1.04±0.06 ^{a,b}	1.02±0.05 ^{a,b}	0.8762	< 0.0001	0.4618
Spleen (g/100g)	0.14±0.01	N/A	0.13±0.01	N/A		0.2828	
Glucose (mg/dl)	93±8 ^d	74±5 ^d	103±11 ^d	152±17 ^{a,b,d}	0.2055	< 0.0010	0.0075
Insulinemia (ng/mL)	0.09±0.02	0.10±0.03	0.19±0.03	0.19±0.02	0.9126	0.0049	0.8911
Cholesterol (mg/dL)	113±3.8	202±35.2	147±23	179±28	0.0304	0.8226	0.2928
Triglycerides (mg/dL)	120±13	129±10 ^d	88±5.7	78±14 ^b	0.9433	0.0018	0.4220
TyG	2.03±0.03	1.97±0.02	1.96±0.03	2.05±0.02	0.6856	0.9318	0.0102
IL-10 pg/ml	30.17±3.29 ^b	36.17±4.04 ^{a,d}	56.43±10.72	25.11±2.18 ^b	0.0271	0.1537	0.0027

CTL_{SHAM}, Sham surgery control; CTL_{SPL}, splenectomized control; CTL_{SV}, subdiaphragmatic vagotomy control; CTL_{SV+SPL}, subdiaphragmatic vagotomy + splenectomized control; SPL, splenectomy; V, subdiaphragmatic vagotomy; I, Interaction; NAL, naso-anal length; TyG, Triglycerides and glucose index; IL-10, Interleukin 10; g, grams; cm, centimeters; mg, milligrams; dL, deciliters; ng, nanogram; mL, milliliters; N/A, not applicable. Data are mean ± SEM, (n = 8-11/ group). Different letters indicate statistical differences between groups – (a) CTL_{SHAM}; (b) CTL_{SP}; (c) CTL_{SV}; (d) CTL_{SV+SPL}. Two-way ANOVA, Tukey post-test (p <0.05).

Table 3: Effect of SV and/or SPL surgeries on biometric and biochemical parameters of M-Obese animals

	p-value						
	M-Obese _{SHAM}	M-Obese _{SPL}	M-Obese _{SV}	M-Obese _{SV+SPL}	SPL	SV	I
Weight gain (g)	132±9 ^{c,d}	117±3 ^c	88±5 ^{a,b}	100±5 ^a	0.7855	0.0001	0.0322
NAL (cm)	19.3±0.28	19.8±0.3	20.1±0.4	19.8±0.4	0.8143	0.3359	0.3096
Lee Index	0.343±0.003 ^d	0.334±0.003	0.329±0.005	0.327±0.003 ^a	0.1047	0.0091	0.3600
Stomach (g/100g)	0.49±0.02 ^{c,d}	0.45±0.01 ^{c,d}	0.85±0.06 ^{a,b}	1.04±0.10 ^{a,b}	0.2008	< 0.0001	0.0441
Spleen (g/100g)	0.102±0.002	N/A	0.100±0.003	N/A		0.6974	
Glucose (mg/dL)	75±6	81±5	85±6	89±2	0.3650	0.0961	0.8604
Insulinemia (ng/mL)	0.18±0.02	0.21±0.01	0.13±0.02 ^d	0.23±0.02 ^c	0.0101	0.4676	0.1309
Cholesterol (mg/dL)	146±16	131±33	116±26	126±32	0.9420	0.6015	0.7203
Triglycerides (mg/dL)	217±31	236±32	145±27	150±23	0.6945	0.0201	0.8149
TyG	2.16±0.03 ^{c,d}	2.10±0.02	2.00±0.02 ^a	2.00±0.02 ^a	0.2878	0.0002	0.2017
IL-10 (pg/ml)	53.58±5.85	57.56±7.62	61.53±8.67	61.37±14.95	0.5635	0.5042	0.8985

M-Obese_{SHAM} Sham surgery MSG; M-Obese_{SPL} splenectomized MSG; M-Obese_{SV} subdiaphragmatic vagotomy MSG; M-Obese_{SV+SPL} subdiaphragmatic vagotomy + splenectomized MSG; SPL, splenectomy; V, subdiaphragmatic vagotomy; I, Interaction; NAL, nasoanal length; TyG, Triglycerides and glucose index; IL-10, Interleukin 10; g, grams; cm, centimeters; mg, milligrams; dL, deciliters; ng, nanogram; mL, milliliters; N/A, not applicable. Data are mean ± SEM, (n = 8-11/ group. Letters above numbers represent statistical difference between groups – (a) CTL_{SHAM}; (b) CTL_{SP}; (c) CTL_{SV}; (d) CTL_{SV+SPL}. Two-way ANOVA, Tukey post-test (p < 0.05).

Supplementary table S1: Effect of splenectomy versus vagotomy versus splenectomy and vagotomy on body and metabolic parameters in non-obese or M-obese animals.

PARAMETERS	CTL			M-Obese		
	SPL vs SHAM	SV vs SHAM	SV+SPL vs SHAM	SPL vs SHAM	SV vs SHAM	SV+SPL vs SHAM
Biometric	ES	ES	ES	ES	ES	ES
Body weight gain	-1.242	-3.25	-3.23	-0.54	-1.57	-1.15
NAL	-0.38	-2.41	-1.67	0.64	1.00	0.61
Lee index	-0.91	0.28	-0.85	-1.39	-2.0	-2.40
WAT-I	0.95	-0.80	-0.49	0.28	0.67	-0.00
WAT-M	0.02	-2.58	-1.47	0.25	-1.21	-1.24
Stomach	0.93	12.37	11.76	-0.60	4.67	7.24
Spleen	N/A	-0.46	N/A	N/A		N/A
Biochemical						
Glycemia	-0.82	0.41	2.60	0.31	0.53	0.74
Insulin	0.13	1.74	1.72	0.13	1.74	1.72
Cholesterol	8.69	3.36	6.50	-0.34	-0.70	-0.47
Triglycerides	0.24	-0.88	-1.17	0.55	-2.02	-1.88
TyG index	-0.69	-0.95	0.084	-0.84	-2.17	-2.01
IL-10 plasma	0.69	3.13	-0.58	0.30	0.61	0.60
IL-10 WAT-I	-0.15	-0.70	-0.20	0.94	1.82	1.28
IL-10 WAT-M	-0.03	-0.50	0.24	-0.15	-0.76	-0.28
Histological						
Adipocytes size WAT-I	0.22	-1.09	0.50	-1.27	-2.88	-2.33
Adipocytes number WAT-I	0.35	3.21	0.33	-0.45	3.96	2.11
Adipocytes size WAT-M	-1.61	-4.14	-2.06	-0.82	-1.17	-1.44
Adipocytes number WAT-M	0.65	4.74	2.32	0.67	2.83	3.50

M, Monosodium glutamate; D, SPL, splenectomy; SV, vagotomy; *d*, Cohen's *d* effect size; NAL, Naso-anal length; WAT-I, Inguinal white adipose tissue; WAT-M, Mesenteric white adipose tissue; IL, Interleukin; N/A, not applicable. The *delta Glass* values were defined as the difference between the means, divided by SD of CTL relevance was interpreted as small ($\delta = 0.2$), medium ($\delta = 0.5$), or large ($\delta = 0.8$).

FIGURAS:

Figure 1: Experimental design.

CTL animals were divided into CTL_{SHAM}, Sham surgery control; CTL_{SPL}, splenectomized control; CTL_{SV}, subdiaphragmatic vagotomy control; CTL_{SV+SPL}, subdiaphragmatic vagotomy + splenectomized control; M-Obese_{SHAM}, simulated surgery MSG; M-Obese_{SPL}, Splenectomized MSG; M-Obese_{SV}, subdiaphragmatic vagotomy MSG; M-Obese_{SV+SPL}, subdiaphragmatic vagotomy + splenectomized MSG N = number of animals. The dashed line indicates the events at long of time (from birth to euthanasia), with vertical arrows evidencing specific points.

Figure 2: Effects of hypothalamic obesity on the histology of white adipose tissue

(A): Representative photomicrographs of WAT-I and WAT-M, respectively, stained with H&E, under light microscopy, 40-fold magnification; (B) and (D) illustrate the average adipocyte size; (C) and (E) Number of adipocytes per field in WAT-I and WAT-M, respectively. The adipocyte nuclei are indicated by arrows, and the deposition of fat in the cytosol is marked by the star. CTL: control, M-obese: MSG; WAT-I: Inguinal white adipose tissue; WAT-M: Mesenteric white adipose tissue; ES, effect size (Delta Glass). Data are mean \pm SEM (n = 6/group). Asterisk (*) represent statistical differences between the groups. Student's T-Test (p <0.05).

Figure 3: Effects of SV and/or SPL surgeries on WAT subcutaneous depot histology and IL10 expression in non-obese rats.

(A) Representative photomicrographs of the broad WAT-I, stained with H&E, magnification 40X; adipocyte nuclei (arrow) and fat deposition (asterisk); (B) Representative WB band densitometry; 50 kDa region (tubulin); 17 kDa region IL10; In graphical data are mean \pm SEM (C) IL-10 expression (n = 4 rats/group); (D) weight of WAT-I (n= 6rats/group); (E) size of adipocytes; (F) number of adipocytes (n=6 rats/group). The line and symbols (SPL, SV and I) above bars show significant F effect in Two-way Anova with letters representing statistical difference between groups – (a) CTL_{SHAM}; (b) CTL_{SP}; (c) CTL_{SV}; (d) CTL_{SV+SPL} in Tukey posttest (p<0.05). CTL_{SHAM}, simulated surgery control; CTL_{SPL}, splenectomized control; CTL_{SV}, subdiaphragmatic vagotomy control; CTL_{SV+SPL}, subdiaphragmatic vagotomy + splenectomized control; WAT-I: white adipose tissue - inguinal; IL-10, Interleukin 10; I: interaction.

Figure 4: Effects of SV and/or SPL surgeries on WAT visceral depot histology and IL10 expression in non-obese rats

(A) Representative photomicrographs of the broad WAT-M, stained with H&E, magnification 40X; adipocyte nuclei (arrow) and fat deposition (asterisk); (B) Representative WB band

densitometry; 50 kDa region (tubulin); 17 kDa region IL10; In graphical data are mean \pm SEM (C) IL-10 expression (n = 4 rats/group); (D) weight of WAT-I (n= 6rats/group); (E) size of adipocytes; (F) number of adipocytes (n=6 rats/group). The line and symbols (SPL, SV and I) above bars show significant F effect in Two-way Anova with letters representing statistical difference between groups – (a) CTL_{SHAM}; (b) CTL_{SP}; (c) CTL_{SV}; (d) CTL_{SV+SPL} in Tukey posttest (p<0.05). CTL_{SHAM}, simulated surgery control; CTL_{SPL}, splenectomized control; CTL_{SV}, subdiaphragmatic vagotomy control; CTL_{SV+SPL}, subdiaphragmatic vagotomy + splenectomized control; WAT-I: white adipose tissue - inguinal; IL-10, Interleukin 10; I: interaction.

Figure 5: Effects of SV and/or SPL surgeries on WAT subcutaneous depot histology and IL10 expression in rats M-Obese.

(A) Representative photomicrographs of the broad WAT-I, stained with H&E, magnification 40X; adipocyte nuclei (arrow) and fat deposition (asterisk); (B) Representative WB band densitometry; 50 kDa region (tubulin); 17 kDa region IL10; In graphical data are mean \pm SEM (C) IL-10 expression (n = 4 rats/group); (D) weight of WAT-I (n= 6rats/group); (E) size of adipocytes; (F) number of adipocytes (n=6 rats/group). The line and symbols (SPL, SV and I) above bars show significant F effect in Two-way Anova with letters representing statistical difference between groups – (a) M-Obese_{SHAM}; (b) M-Obese_{SPL}; (c) M-Obese_{SV}; (d) Obese_{SV+SPL} in Tukey posttest (p<0.05). M-Obese_{SHAM}, simulated surgery MSG; M-Obese_{SPL}, Splenectomized MSG; M-Obese_{SV}, subdiaphragmatic vagotomy MSG; M-Obese_{SV+SPL}, subdiaphragmatic vagotomy + splenectomized MSG; WAT-I: white adipose tissue - inguinal; IL-10, Interleukin 10; I: interaction.

Figure 6: Effects of SV and/or SPL surgeries on WAT visceral depot histology and IL10 expression in rats M-Obese.

(A) Representative photomicrographs of the broad WAT-M, stained with H&E, magnification 40X; adipocyte nuclei (arrow) and fat deposition (asterisk); (B) Representative WB band densitometry; 50 kDa region (tubulin); 17 kDa region IL10; In graphical data are mean \pm SEM (C) IL-10 expression (n = 4 rats/group); (D) weight of WAT-I (n= 6rats/group); (E) size of adipocytes; (F) number of adipocytes (n=6 rats/group). The line and symbols (SPL, SV and I) above bars show significant F effect in Two-way Anova with letters representing statistical difference between groups – (a) M-Obese_{SHAM}; (b) M-Obese_{SPL}; (c) M-Obese_{SV}; (d) Obese_{SV+SPL} in Tukey posttest (p<0.05). M-Obese_{SHAM}, simulated surgery MSG; M-Obese_{SPL}, Splenectomized MSG; M-Obese_{SV}, subdiaphragmatic vagotomy MSG; M-Obese_{SV+SPL}, subdiaphragmatic vagotomy + splenectomized MSG; WAT-I: white adipose tissue - inguinal; IL-10, Interleukin 10; I: interaction.

Figure 1.JPEG

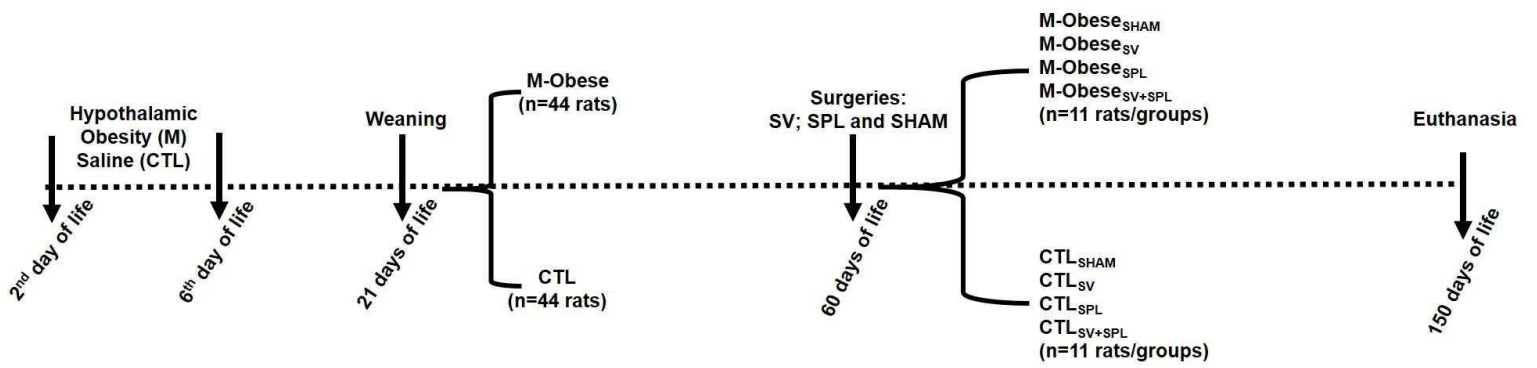


Figure 2.JPEG

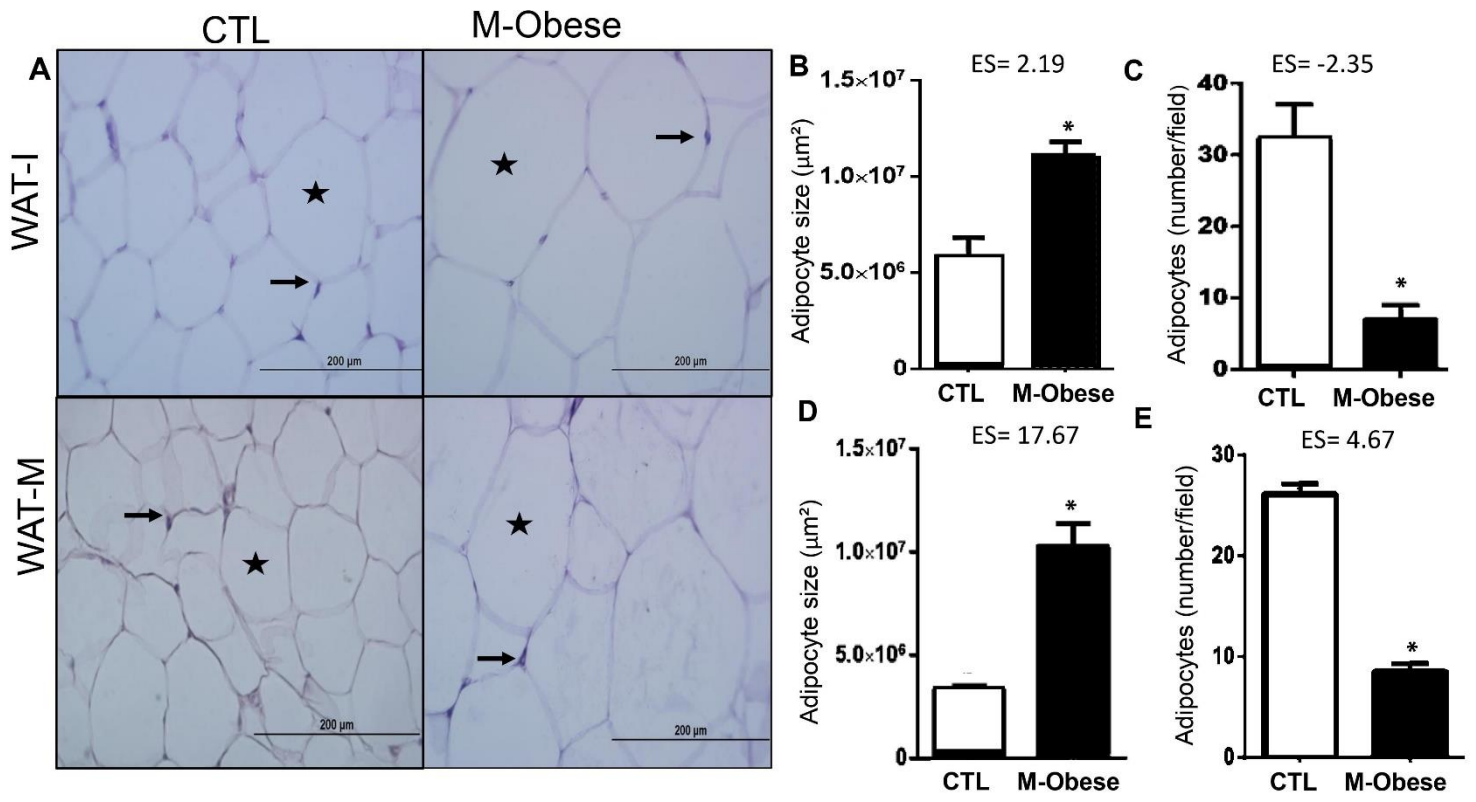


Figure 3.JPEG

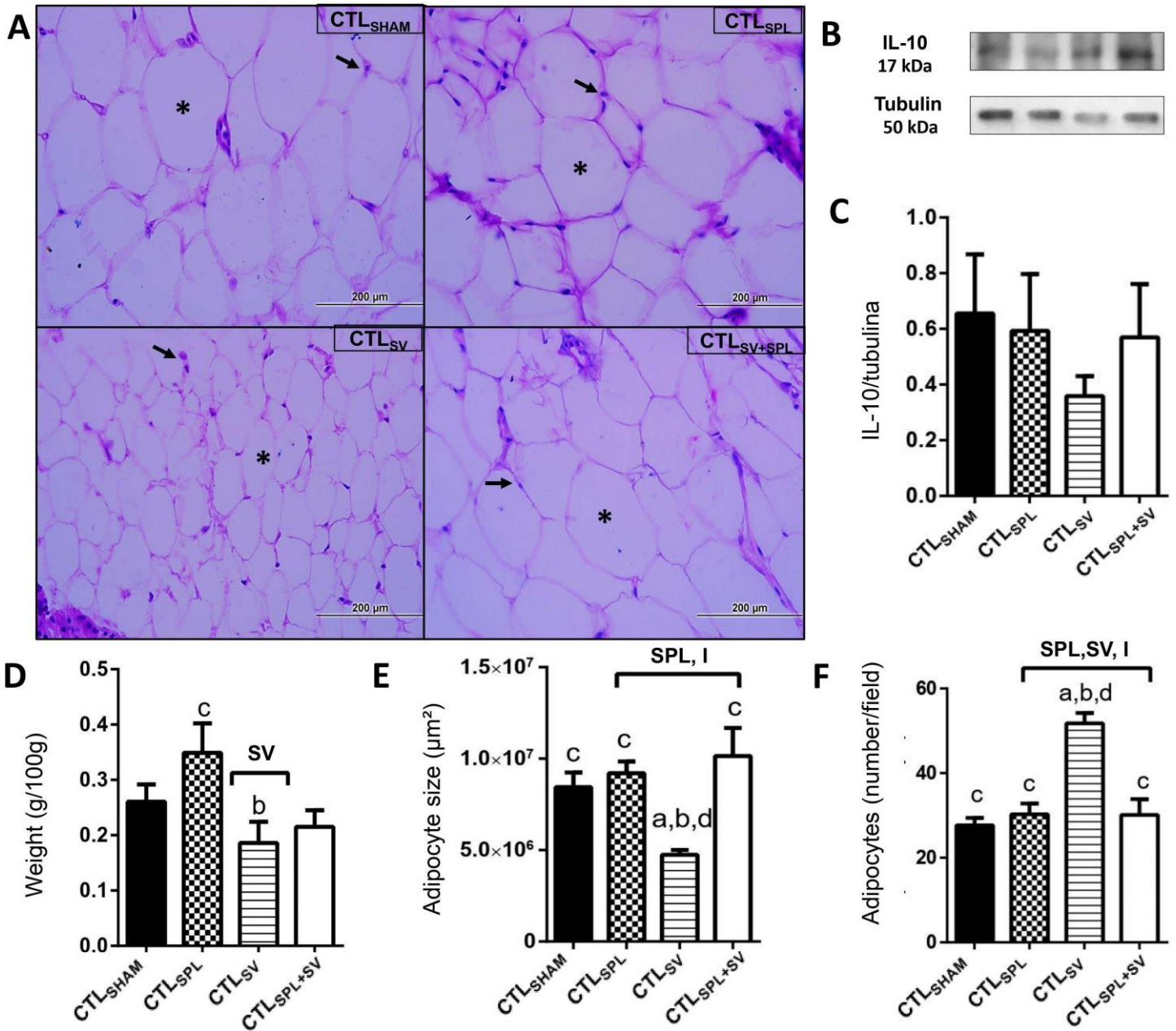


Figure 4.JPEG

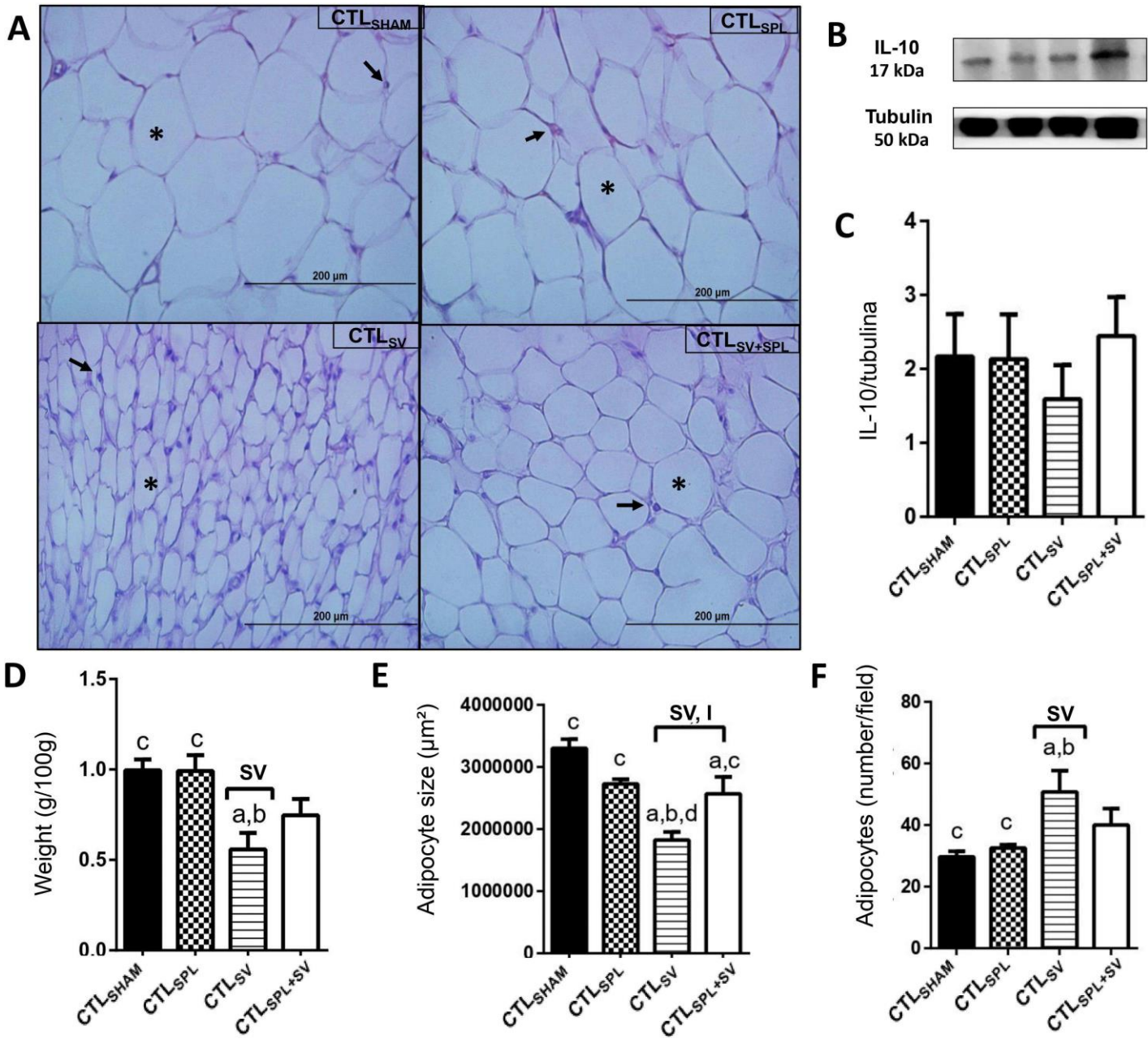


Figure 5.JPEG

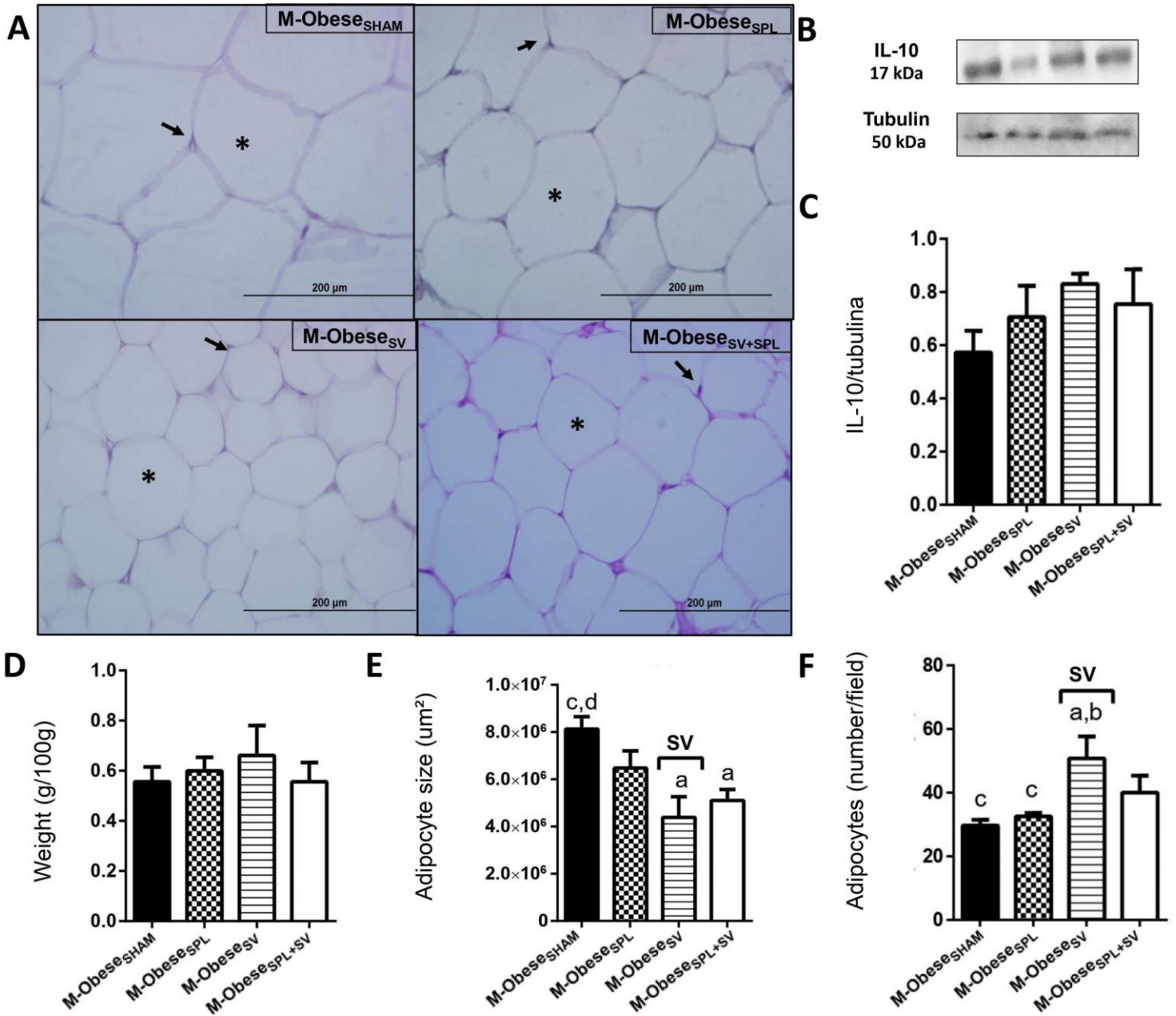
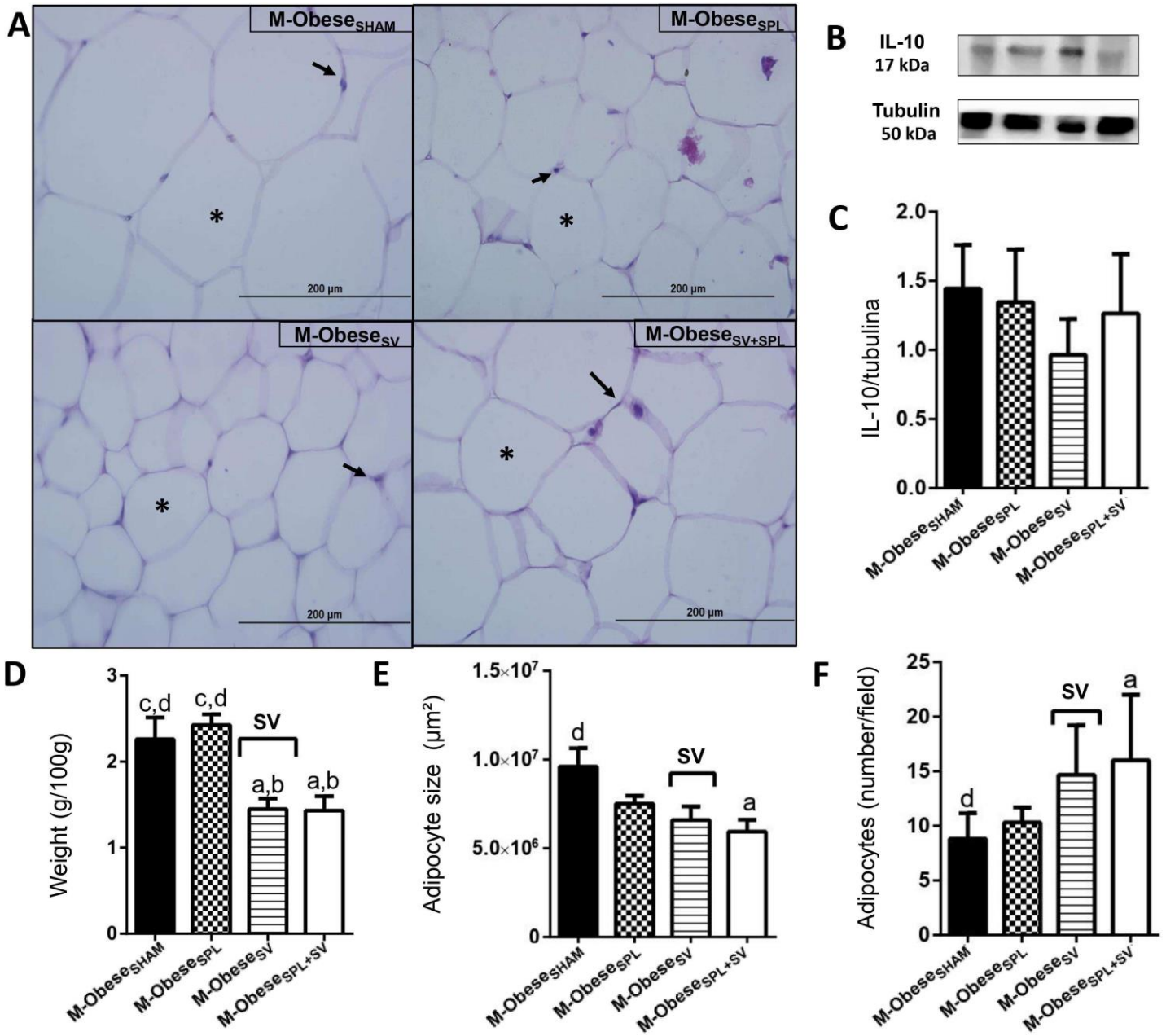


Figure 6.JPEG



6. ANEXOS

ANEXO I - 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

ANEXO II – Normas publicação revista

5.1 1. Padrões gerais

5.1.1 1.1. Tipo de Artigo

A Frontiers requer que os autores selecionem cuidadosamente o tipo de artigo apropriado para seu manuscrito e cumpram as descrições de tipo de artigo definidas na página "Tipos de artigo" da revista, que pode ser vista no menu "Para autores" em qualquer página da revista Frontiers. Preste muita atenção aos limites de contagem de palavras.

5.1.2 1.2. Modelos

Se estiver trabalhando com o Word, use nossos modelos do Frontiers Word . Se você deseja enviar seu artigo como LaTeX, recomendamos nossos modelos Frontiers LaTeX .

Para arquivos LaTeX, certifique-se de que todos os arquivos manuscritos relevantes sejam carregados: arquivo .tex, PDF e arquivo .bib (se a bibliografia ainda não estiver incluída no arquivo .tex).

Durante a revisão interativa , os autores são incentivados a fazer upload de versões usando "Rastrear alterações". Editores e revisores podem apenas baixar o arquivo PDF do manuscrito submetido.

5.1.3 1.3. Comprimento do manuscrito

A Frontiers encoraja os autores a seguirem de perto os tamanhos de contagem de palavras dos artigos fornecidos na página "Tipos de artigos" das revistas. O comprimento do manuscrito inclui apenas o corpo principal do texto, notas de rodapé e todas as citações nele contidas, e exclui o resumo, títulos das seções, legendas de figuras e tabelas, declaração de financiamento, agradecimentos e referências na bibliografia. Por favor, indique o número de palavras e o número de figuras e tabelas incluídas em seu manuscrito na primeira página.

5.1.4 1.4. Edição de linguagem

A Frontiers exige que os manuscritos enviados atendam aos padrões internacionais da língua inglesa sejam considerados para publicação.

Para os autores que desejam que seu manuscrito receba edição ou revisão linguística para melhorar a clareza do manuscrito e ajudar a destacar sua pesquisa,

a Frontiers recomenda os serviços de edição linguística fornecidos pelos seguintes parceiros externos:

Editage

A Frontiers tem o prazer de recomendar o serviço de edição linguística fornecido por nosso parceiro externo Editage para autores que acreditam que seus manuscritos se beneficiariam de uma edição profissional. Esses serviços podem ser particularmente úteis para pesquisadores para os quais o inglês não é o idioma principal. Eles podem ajudar a melhorar a gramática, a sintaxe e o fluxo do seu manuscrito antes do envio. Os autores do Frontiers receberão um desconto de 10% acessando o seguinte link: <https://editage.com/frontiers/> .

The Charlesworth Group

A Frontiers recomenda os serviços de autoria do Charlesworth Group, que possui um histórico de longa data em edição e revisão de idiomas. Este é um serviço terceirizado para o qual os autores do Frontiers receberão um desconto de 10% visitando o seguinte link: <https://www.cwauthors.com/frontiers/> .

Fronteiras. : www.cwauthors.com.cn/frontiers/ .

Observe que o envio de seu manuscrito para edição no idioma não implica ou garante que ele será aceito para publicação por um periódico da Frontiers. As decisões editoriais sobre o conteúdo científico de um manuscrito são independentes se ele recebeu edição ou revisão linguística pelos serviços de parceiros ou outros serviços.

5.1.51,5. Estilo de Linguagem

O estilo de idioma padrão na Frontiers é o inglês americano. Se você preferir que seu artigo seja formatado em inglês britânico, especifique isso na primeira página do seu manuscrito. Para qualquer dúvida sobre estilo, a Frontiers recomenda aos autores que consultem o Chicago Manual of Style.

5.1.61.6. Otimização de mecanismos de pesquisa (SEO)

Existem algumas maneiras simples de maximizar a descoberta do seu artigo. Siga as etapas abaixo para melhorar os resultados da pesquisa de seu artigo:

- inclua algumas das palavras-chave do seu artigo no título do artigo;
- não use títulos longos de artigos;

- escolha 5 a 8 palavras-chave usando uma combinação de termos genéricos e mais específicos sobre o (s) assunto (s) do artigo;
- usar o máximo de palavras-chave nas 2 primeiras frases do resumo;
- use algumas das palavras-chave nos títulos de nível 1.

5.1.71.7. Política CrossMark

CrossMark é uma iniciativa de vários editores para fornecer uma maneira padrão para os leitores localizarem a versão atual de um determinado conteúdo. Ao aplicar o logotipo da CrossMark, a Frontiers se compromete a manter o conteúdo que publica e a alertar os leitores sobre as mudanças, se e quando elas ocorrerem. Clicar no logotipo da CrossMark informará o status atual de um documento e também poderá fornecer informações adicionais de registro de publicação sobre o documento.

5.1.81.8. Título

O título deve ser conciso, omitindo termos implícitos e, quando possível, ser uma declaração do resultado principal ou conclusão apresentada no manuscrito. Abreviações devem ser evitadas no título.

Títulos espirituosos ou criativos são bem-vindos, mas apenas se relevantes e dentro dos limites. Considere se um título que pretende ser instigante pode ser mal interpretado como ofensivo ou alarmante. Em casos extremos, a redação pode vetar um título e propor uma alternativa.

Os autores devem tentar evitar, se possível:

- títulos que são mera pergunta sem dar a resposta;
- títulos pouco ambiciosos, por exemplo, começando com "Em direção", "Uma descrição de", "Uma caracterização de", "Estudo preliminar sobre;"
- títulos vagos, por exemplo, começando com "Função de ...", "Link entre ...", "Efeito de ..." que não especificam a função, vínculo ou efeito;
- inclua termos que estão fora do lugar, por exemplo, a afiliação taxonômica além do nome da espécie.

Para corrigenda, resenhas de livros, comentários gerais e editoriais, o título do seu manuscrito deve ter o seguinte formato:

- "Corrigenda: Título do Artigo Original"

- "Resenha de livro: título do livro"
- Comentários Gerais
 - "Comentário: Título do Artigo Original"
 - "Resposta: Comentário: Título do Artigo Original"
- "Editorial: Título do Tópico de Pesquisa"

O título corrente deve ter no máximo 5 palavras.

5.1.91.9. Autores e Afiliações

Todos os nomes são listados juntos e separados por vírgulas. Forneça nomes de autores exatos e corretos, pois eles serão indexados em arquivos oficiais. As afiliações devem ser digitadas no nome do autor com números sobrescritos e listadas da seguinte forma: Laboratório, Instituto, Departamento, Organização, Cidade, abreviatura do Estado (apenas para Estados Unidos, Canadá e Austrália) e País (sem informações detalhadas de endereço, como códigos postais de cidades ou nomes de ruas).

Exemplo: Max Maximus ¹

¹ Departamento de Excelência, International University of Science, New York, NY, Estados Unidos.

Correspondência:

Os autores correspondentes devem ser marcados com um asterisco na lista de autores. Forneça o endereço de e-mail de contato exato do (s) autor (es) correspondente (s) em uma seção separada.

Exemplo: Max Maximus

maximus@iuscience.edu

Se algum autor deseja incluir uma mudança de endereço, liste o (s) endereço (s) presente (s) abaixo dos detalhes da correspondência usando um símbolo sobrescrito exclusivo ligado ao autor (es) na lista de autores.

Contribuições iguais:

Os autores que contribuíram igualmente devem ser marcados com um símbolo (†) na lista de autores dos arquivos doc / latex e pdf do manuscrito carregado no momento da submissão.

Declarações padrão a serem incluídas na lista de autores:

Exemplo: Max Maximus 1 † , John Smith2 † e Barbara Smith1

† Esses autores contribuíram igualmente para este trabalho e compartilham a primeira autoria

5.1.10 1,10. Consórcio / Grupo e Autores Colaborativos

Autoria de consórcio / grupo deve ser listada no manuscrito com o (s) outro (s) autor (es).

Nos casos em que a autoria é retida pelo consórcio / grupo, o consórcio / grupo deve ser listado como um autor separado por “,” ou “e”. O nome do consórcio / grupo aparecerá na lista de autores, na citação e nos direitos autorais. Se fornecido, os membros do consórcio / grupo serão listados em uma seção separada no final do artigo.

Para que os colaboradores do consórcio / grupo sejam indexados no PubMed, eles não precisam estar inseridos no sistema de submissão do Frontiers individualmente. Porém, no próprio manuscrito, fornecer uma seção com o nome do consórcio / grupo como título seguido da lista de colaboradores, para que possam ser devidamente etiquetados e indexados adequadamente.

Exemplo: John Smith, Barbara Smith e The Collaborative Working Group.

Nos casos em que o trabalho é apresentado pelo (s) autor (es) em nome de um consórcio / grupo, ele deve ser incluído na lista de autores separados com a menção “para” ou “em nome de”. O consórcio / grupo não manterá a autoria e só aparecerá na lista de autores.

Exemplo: John Smith e Barbara Smith em nome do The Collaborative Working Group.

5.1.11 1,11. Resumo

Como objetivo principal, o resumo deve tornar o significado geral e o avanço conceitual do trabalho claramente acessível a um amplo leitor. No resumo, minimize o uso de abreviaturas e não cite referências, figuras ou tabelas.

Para artigos de ensaios clínicos, inclua o identificador único e o URL do site de acesso público no qual o ensaio está registrado.

5.1.12 1,12. Palavras-chave

Todos os tipos de artigo requerem um mínimo de 5 e um máximo de 8 palavras-chave.

5.1.13 1,13. Texto

Todo o documento deve ter espaçamento simples e deve conter números de página e linha para facilitar o processo de revisão. O manuscrito deve ser escrito usando Word ou LaTeX. Para modelos, consulte [1.2. Modelos](#) .

5.1.14 1,14. Nomenclatura

- O uso de abreviações deve ser mínimo. Abreviações fora do padrão devem ser evitadas, a menos que apareçam pelo menos quatro vezes e sejam definidas na primeira utilização no texto principal. Considere também fornecer uma lista de abreviações não padronizadas no final, imediatamente antes dos Agradecimentos.
- As equações devem ser inseridas em formato editável no editor de equações.
- Itálico símbolos de genes e usar a nomenclatura de genes aprovada onde estiver disponível. Para genes humanos, consulte o HUGO Gene Nomenclature Committee ([HGNC](#)). Novos símbolos de genes devem ser apresentados [aqui](#) . Aliases de genes alternativos comuns também podem ser relatados, mas não devem ser usados sozinhos no lugar do símbolo HGNC. Comitês de nomenclatura para outras espécies estão listados [aqui](#) . Os produtos proteicos não estão em itálico.
- Nós encorajamos o uso de Unidades Internacionais Padrão em todos os manuscritos.
- Os compostos químicos e biomoléculas devem ser referidos utilizando nomenclatura sistemática, preferencialmente utilizando as recomendações da IUPAC.
- Os objetos astronômicos devem ser referidos usando a nomenclatura fornecida pela União Astronômica Internacional fornecida [aqui](#) .
- Identificadores de Ciências da Vida (LSIDs) para nomes registrados no ZOOBANK ou atos nomenclaturais devem ser listados no manuscrito antes das palavras-chave. Um LSID é representado como um nome de recurso uniforme (URN) com o seguinte formato: urn: lsid: <Authority>: <Namespace>: <ObjectID> [: <Version>]

Para obter mais informações sobre LSIDs, consulte a seção [Código](#) .

5.1.15 1,15. Seções

O manuscrito está organizado por títulos e subtítulos. Os títulos das seções devem ser os apropriados para o seu campo e para a própria pesquisa. Você pode inserir até 5 níveis de título em seu manuscrito (ou seja, 3.2.2.1.2 Título do título).

Para artigos de pesquisa original, é recomendado organizar seu manuscrito nas seguintes seções ou seus equivalentes para sua área:

INTRODUÇÃO

Sucinto, sem subtítulos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção pode ser dividida por subtítulos e deve conter detalhes suficientes para que, quando lida em conjunto com as referências citadas, todos os procedimentos possam ser repetidos. Para experimentos que relatam resultados em pesquisas com animais ou seres humanos, uma declaração de aprovação de ética deve ser incluída nesta seção (para obter mais informações, consulte a seção de [Bioética](#)).

RESULTADOS

Esta seção pode ser dividida por subtítulos. Notas de rodapé não devem ser utilizadas e devem ser transferidas para o texto principal.

DISCUSSÃO

Esta seção pode ser dividida por subtítulos. As discussões devem cobrir as principais descobertas do estudo: discutir qualquer pesquisa anterior relacionada ao assunto para colocar a novidade da descoberta no contexto apropriado, discutir as possíveis deficiências e limitações em suas interpretações, discutir sua integração na compreensão atual do problema e como isso avança as visões atuais, especula sobre a direção futura da pesquisa e postula livremente teorias que poderiam ser testadas no futuro.

Para maiores informações, consulte as descrições definidas na página "Tipos de artigos" da revista, que pode ser vista no menu "Para autores" de qualquer página da revista *Frontiers*.

5.1.16 1,16. Agradecimentos

Este é um pequeno texto para agradecer as contribuições de colegas, instituições ou agências específicas que auxiliaram os esforços dos autores. Caso o conteúdo do manuscrito já tenha aparecido online anteriormente, como em uma tese ou pré-

impressão, isso deve ser mencionado aqui, além de listar a fonte na lista de referências.

5.1.17 1,17. Contribuição para a declaração de campo

Ao enviar seu manuscrito, você deverá resumir brevemente em 200 palavras a contribuição de seu manuscrito e sua posição na literatura existente em sua área. Isso deve ser escrito evitando qualquer linguagem técnica ou acrônimos não padronizados. O objetivo deve ser transmitir o significado e a importância desta pesquisa a um não especialista. Enquanto a *Frontiers* avalia os artigos usando critérios objetivos, ao invés de impacto ou novidade, sua declaração deve enquadrar as questões que você abordou em seu trabalho no contexto do corpo de conhecimento atual, fornecendo evidências de que as descobertas - sejam positivas ou negativas - contribuir para o progresso em sua disciplina de pesquisa. Isso ajudará os Editores Chefes a determinar se o seu manuscrito se encaixa no escopo de uma especialidade, conforme definido em sua declaração de missão;

Exemplo de declaração sobre: Markram K e Markram H (2010) The Intense World Theory - uma teoria unificadora da neurobiologia do autismo. *Front. Zumbir. Neurosci.* 4: 224. doi: 10.3389 / fnhum.2010.00224

Os transtornos do espectro do autismo são um grupo de transtornos do neurodesenvolvimento que afetam até 1 em cada 100 indivíduos. Pessoas com autismo exibem uma série de sintomas que abrangem processamento emocional, sociabilidade, percepção e memória, e apresentam-se de forma tão única quanto o indivíduo. Nenhuma teoria sugeriu uma única neuropatologia subjacente para explicar esses diversos sintomas. A Teoria do Mundo Intensa, aqui proposta, descreve uma patologia unificadora que produz o amplo espectro de manifestações observadas em autistas. Essa teoria se concentra no neocórtex, fundamental para as funções cognitivas superiores, e no sistema límbico, chave para o processamento de emoções e sinais sociais. Com base em descobertas em modelos animais e estudos de neuroimagem em indivíduos com autismo, propomos como uma combinação de genética, a exposição a toxinas e / ou estresse ambiental podem produzir hiper-reatividade e hiper-plasticidade nos microcircuitos envolvidos com percepção, atenção, memória e emocionalidade. Esses circuitos hiperfuncionantes acabarão por dominar seus vizinhos, levando à hipersensibilidade aos estímulos que chegam, superespecialização em tarefas e uma síndrome de hiperprefeitura. Argumentamos que esta teoria da função cerebral aprimorada no autismo explica muitos dos resultados passados variados e resolve descobertas e visões conflitantes e faz algumas previsões experimentais

testáveis. superespecialização em tarefas e uma síndrome de hiperprefeitura. Argumentamos que esta teoria da função cerebral aprimorada no autismo explica muitos dos resultados passados variados e resolve descobertas e visões conflitantes e faz algumas previsões experimentais testáveis. superespecialização em tarefas e uma síndrome de hiperprefeitura. Argumentamos que esta teoria da função cerebral aprimorada no autismo explica muitos dos resultados passados variados e resolve descobertas e visões conflitantes e faz algumas previsões experimentais testáveis.

5.2 2. Diretrizes de Figura e Tabela

5.2.12.1. Licença CC-BY

Todas as figuras, tabelas e imagens serão publicadas sob uma licença Creative Commons CC-BY , e deve-se obter permissão para o uso de material protegido por direitos autorais de outras fontes (incluindo figuras republicadas / adaptadas / modificadas / parciais e imagens da internet) . É responsabilidade dos autores adquirir as licenças, seguir as instruções de citação solicitadas por terceiros detentores de direitos e arcar com os custos adicionais.

Para obter informações adicionais, consulte a seção Manipulação de imagem .

5.2.22.2. Requisitos de figura e diretrizes de estilo

- O Frontiers exige que as figuras sejam submetidas individualmente, na mesma ordem em que são referidas no manuscrito; as figuras serão automaticamente incorporadas ao final do manuscrito submetido. Certifique-se de que cada figura é mencionada no texto e em ordem numérica.
- Para figuras com mais de um painel, os painéis devem ser claramente indicados com etiquetas (A), (B), (C), (D), etc. No entanto, não incorpore as etiquetas das peças sobre qualquer parte da imagem, essas etiquetas será substituído durante a composição de acordo com o estilo de diário da Frontiers. Para gráficos, deve haver uma etiqueta autoexplicativa (incluindo unidades) ao longo de cada eixo.
- Para arquivos LaTeX, as figuras devem ser incluídas no PDF fornecido. Em caso de aceitação, nosso Escritório de Produção pode exigir arquivos de alta resolução das figuras incluídas no manuscrito em formato EPS, JPEG ou TIF / TIFF.

- Para poder carregar mais de uma figura por vez, salve as figuras (rotuladas em ordem de aparecimento no manuscrito) em um arquivo zip e carregue-as como 'Apresentação de material suplementar'.

Observe que os números que não estiverem de acordo com as diretrizes causarão um atraso substancial durante o processo de produção.

5.2.2.1 2.2.1. Legendas

As legendas devem ser precedidas da etiqueta apropriada, por exemplo "Figura 1". As legendas das figuras devem ser colocadas no final do manuscrito. Painéis de figuras são referidos por letras maiúsculas em negrito entre colchetes: (A), (B), (C), (D), etc.

5.2.2.2 2.2.2. Requisitos de tamanho e resolução de imagem

As figuras devem ser preparadas com o layout PDF em mente. As figuras individuais não devem ultrapassar uma página e ter uma largura que corresponda a 1 coluna (85 mm) ou 2 colunas (180 mm).

Todas as imagens devem ter resolução de 300 dpi no tamanho final. Verifique a resolução da sua figura ampliando-a para 150%. Se a imagem parecer borrada, irregular ou tiver um efeito de escada, a resolução está muito baixa.

- O texto deve ser legível e de alta qualidade. O menor texto visível não deve ter menos de 8 pontos de altura quando visto em tamanho real.
- As linhas sólidas não devem ser quebradas. Todas as linhas do gráfico não devem ter menos de 2 pontos de largura.

Observe que salvar uma figura diretamente como um arquivo de imagem (JPEG, TIF) pode afetar muito a resolução da imagem. Para evitar isso, uma opção é exportar o arquivo como PDF e, em seguida, converter para TIFF ou EPS usando um software gráfico.

5.2.2.3 2.2.3. Formato e modo de imagem colorida

- Os seguintes formatos são aceitos: TIF / TIFF (.tif / .tiff), JPEG (.jpg) e EPS (.eps) (mediante aceitação).
- As imagens devem ser enviadas no modo de cores RGB.

5.2.2.4 2.2.4. Estruturas Químicas

As estruturas químicas devem ser preparadas usando ChemDraw ou um programa semelhante. Se estiver trabalhando com ChemDraw, use nosso [template Frontiers ChemDraw](#). Se estiver trabalhando com outro programa, siga as diretrizes fornecidas abaixo:

- Configurações de desenho: ângulo da corrente, espaçamento de ligação de 120 °, largura de 18%; comprimento fixo, 14,4 pt; largura em negrito, 2,0 pt; largura da linha, 0,6 pt; largura da margem, 1,6 pt; espaçamento hash, 2,5 pt. Ajustes de escala 100% Atom Label: fonte, Arial; tamanho, 8 pt.
- Atribua a todos os compostos químicos um número arábico em negrito na ordem em que os compostos são apresentados no texto do manuscrito.

5.2.32.3. Requisitos de tabela e diretrizes de estilo

- As tabelas devem ser inseridas no final do manuscrito em formato editável. Se você usa um processador de texto, construa sua tabela no Word. Se você usa um processador LaTeX, construa sua tabela em LaTeX. Uma linha em branco deve ser deixada antes e depois da mesa.
- As legendas das tabelas devem ser colocadas imediatamente antes da mesa. As legendas devem ser precedidas da etiqueta apropriada, por exemplo "Tabela 1". Por favor, use apenas um único parágrafo para a legenda.
- Certifique-se de que cada tabela é mencionada no texto e em ordem numérica.
- Observe que tabelas grandes cobrindo várias páginas não podem ser incluídas no PDF final por motivos de formatação. Essas tabelas serão publicadas como material complementar.

Observe que as tabelas que não estão de acordo com as diretrizes causarão atrasos substanciais durante o processo de produção.

5.2.42.4. Acessibilidade

A Frontiers incentiva os autores a tornarem as figuras e elementos visuais de seus artigos acessíveis para os deficientes visuais. O uso eficaz da cor pode ajudar as pessoas com baixa acuidade visual, ou daltonismo, a compreender todo o conteúdo de um artigo.

Essas diretrizes são fáceis de implementar e estão de acordo com as [Diretrizes de Acessibilidade de Conteúdo da Web W3C \(WCAG 2.1\)](#), o padrão para as melhores práticas de acessibilidade da web.

A. Garanta contraste suficiente entre o texto e seu fundo

Pessoas com baixa acuidade visual ou daltonismo podem ter dificuldade em ler textos com cores de fundo de baixo contraste. Tente usar cores que forneçam contraste máximo.

WC3 recomenda os seguintes níveis de razão de contraste:

- Nível AA, relação de contraste de pelo menos 4,5: 1
- WebAIM
- Cor segura

B. Evite usar indicadores vermelhos ou verdes

Mais de 99% das pessoas daltônicas têm deficiência visual para as cores vermelho-verde.

C. Evite usar apenas cores para comunicar informações

Elementos com informações complexas como tabelas e gráficos podem ser difíceis de ler quando apenas a cor é usada para distinguir os dados. Tente usar outros aspectos visuais para comunicar informações, como forma, rótulos e tamanho. A incorporação de padrões nos preenchimentos de forma também torna as diferenças mais claras; para um exemplo, veja abaixo:

5.3 3. Material Suplementar

Dados que não são de importância primária para o texto, ou que não podem ser incluídos no artigo porque são muito grandes ou o formato atual não permite (como vídeos, rastreamentos de dados brutos, apresentações em PowerPoint, etc.), podem ser carregado como material suplementar durante o procedimento de submissão e será exibido junto com o artigo publicado. Todos os arquivos suplementares são depositados no Figshare para armazenamento permanente e recebem um DOI.

O material suplementar não é formatado, portanto, certifique-se de que todas as informações sejam apresentadas de forma clara, sem alterações rastreadas / texto destacado / números de linha, e que a legenda apropriada seja incluída no arquivo. Para evitar discrepâncias entre o artigo publicado e o material suplementar, por favor, não adicione o título, lista de autores, afiliações ou correspondência nos arquivos suplementares.

O material suplementar pode ser carregado como folha de dados (arquivos Word, Excel, CSV, CDX, FASTA, PDF ou Zip), apresentação (arquivos PowerPoint, PDF ou Zip), imagem (CDX, EPS, JPEG, PDF, PNG ou TIF / TIFF), Tabela (Word, Excel,

CSV ou PDF), Áudio (MP3, WAV ou WMA) ou Vídeo (AVI, DIVX, FLV, MOV, MP4, MPEG, MPG ou WMV).

Para modelos de Material Suplementar (LaTeX e Word), consulte nossos modelos de Material Suplementar .

5.4 4. Referências

- Todas as citações no texto, figuras ou tabelas devem constar da lista de referências e vice-versa.
- Os nomes dos seis primeiros autores seguidos de et al. e o DOI (quando disponível) deve ser fornecido.
- A lista de referências deve incluir apenas artigos publicados ou aceitos.
- Dados não publicados, manuscritos submetidos ou comunicações pessoais devem ser citados apenas no texto, para os tipos de artigos que permitem tais inclusões.
- Para trabalhos aceitos, mas não publicados, use "no prelo" em vez de números de página.
- Os conjuntos de dados que foram depositados em um repositório online devem ser incluídos na lista de referência. Inclua a versão e o identificador exclusivo quando disponível.
- As comunicações pessoais devem ser documentadas por uma carta de permissão.
- URLs de sites devem ser incluídos como notas de rodapé.
- Qualquer inclusão de texto literal deve estar entre aspas e fazer uma referência clara à fonte original.
- As pré-impressões podem ser citadas desde que um DOI ou URL de arquivo esteja disponível, e a citação menciona claramente que a contribuição é uma pré-impressão. Se existir uma publicação em periódico revisado por pares para o mesmo pré-impresso, a publicação em periódico oficial é a fonte preferida. Consulte a seção Pré - impressões para obter mais informações.

5.4.1 4.1. Revistas de Ciências, Engenharia e Humanidades e Sustentabilidade

(Lista completa de periódicos e estilo de referência correspondente)

5.4.1.1 4.1.1. Citações no texto

- Para obras de um único autor, incluir o sobrenome, seguido do ano.
- Para obras de dois autores, incluir os dois sobrenomes, seguidos do ano.
- Para trabalhos com mais de dois autores, incluir apenas o sobrenome do primeiro autor seguido de et al., Seguido do ano.
- Para artigos de Humanidades e Ciências Sociais, inclua os números das páginas.

5.4.1.2 4.1.2. Lista de referência

ARTIGO EM UM DIÁRIO DE IMPRESSÃO

Sondheimer, N. e Lindquist, S. (2000). Rnq1: um modificador epigenético da função da proteína na levedura. *Mol. Célula*. 5, 163-172.

ARTIGO EM UM DIÁRIO ONLINE

Tahimic, CGT, Wang, Y., Bikle, DD (2013). Efeitos anabólicos da sinalização do IGF-1 no esqueleto. *Frente. Endocrinol.* 4: 6. doi: 10.3389 / fendo.2013.00006

ARTIGO OU CAPÍTULO EM UM LIVRO

Sorenson, PW e Caprio, JC (1998). "Chemoreception", em *The Physiology of Fishes*, ed. DH Evans (Boca Raton, FL: CRC Press), 375-405.

LIVRO

Cowan, WM, Jessell, TM e Zipursky, SL (1997). *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*. | _____ ãss.

RESUMO

Hendricks, J., Applebaum, R. e Kunkel, S. (2010). Um mundo à parte? Preenchendo a lacuna entre a teoria e gerontologia social aplicada. *Gerontologist* 50, 284-293. Resumo obtido na base de dados Abstracts in Social Gerontology. (No. de Acesso 50360869)

LOCAL NA REDE INTERNET

Organização Mundial da Saúde. (2018). E. coli. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli> [Acessado em 15 de março de 2018].

PATENTE

Marshall, SP (2000). Método e aparelho para rastreamento ocular e monitoramento da dilatação da pupila para avaliar a atividade cognitiva. Patente US Nº 6.090.051. Washington, DC: US Patent and Trademark Office.

DADOS

Perdiguer P, Venturas M, Cervera MT, Gil L, Collada C. Dados de: Massive sequencing of Ulms minor's transcriptome fornece novas ferramentas moleculares para um gênero sob a constante ameaça da doença do olmo holandês. Repositório Digital Dryad. (2015) <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.ps837>

TESES E DISSERTAÇÕES

Smith, J. (2008) Discurso pós-estruturalista relativo às buscas fenomenológicas na arena desconstrutivista. [dissertação / dissertação de mestrado]. [Chicago (IL)]: Universidade de Chicago

PRÉ-IMPRESSÃO

Smith, J. (2008). Título do documento. Nome do repositório de pré-impressão [Pré-impressão]. Disponível em: [https:// persistent-url](https://persistent-url) (acessado em 15 de março de 2018).

Anexo III – Comprovante de Submissão do Artigo

REVIEW FORUM Submitting Author
[? Need Help ? Contact us](#)

1. **Initial Validation** 2. Editorial Assignment 3. Independent Review 4. Interactive Review 5. Review Finalized 6. Final Validation 7. Final Decision

The vagus nerve and spleen: influences in white adipose mass and histology in obese and non-obese rats

Joice Cristina Kuchler^{*}, Bruna Schumaker Siqueira, Vanessa Marieli Ceglarek, Fernanda Vigilato Chasko, Islany Carvalho Moura, Bruna Fatima Sczepanhak, Jean Franciesco Vettorazzi, Sandra Lucinei Balbo and Sabrina Grassioli


Original Research, Front. Physiol. - Autonomic Neuroscience


Received on: 25 Feb 2021, Edited by: No Associate Editor assigned.


Manuscript ID: 672027


Research Topic: [New Insights into the Role of the Vagus Nerve in Health and Disease: Basic and Clinical Studies](#)


Keywords: Vagotomy, Splenectomy, Autonomic Nervous System, Obesity, Adipocyte

 [Download latest manuscript](#)

 [Supplementary materials](#)

 [View submitted files history](#)

 [View invoice](#)

 **NO ACTION IS REQUIRED FROM YOU**

Your manuscript has been submitted successfully and is being verified by the editorial office as part of the initial manuscript validation.