

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

CASSIANE LISBINSKI NOTTAR

**A PARTICIPAÇÃO ESPLÊNICA E VAGAL NA DEPOSIÇÃO DE
LIPÍDEOS NO TECIDO ADIPOSEO MARROM DE RATOS OBESOS E
NÃO OBESOS**

FRANCISCO BELTRAO - PR

MARÇO/2022

CASSIANE LISBINSKI NOTTAR

**A PARTICIPAÇÃO ESPLÊNICA E VAGAL NA DEPOSIÇÃO DE
LIPÍDEOS NO TECIDO ADIPOSEO MARROM 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/2022

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

Nottar, Cassiane
A PARTICIPAÇÃO ESPLÊNICA E VAGAL NA DEPOSIÇÃO DE LIPÍDEOS
NO TECIDO ADIPOSEO MARROM DE RATOS OBESOS E NÃO OBESOS /
Cassiane Nottar; orientador Sabrina Grassioli. --
Francisco Beltrão, 2018.
65 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Francisco
Beltrão) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro
de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Aplicadas à Saúde, 2018.

1. Tecido adiposo Marrom . 2. Termogênese . 3. ucp 1. I.
Grassioli, Sabrina , orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

CASSIANE LISBINSKI NOTTAR

**A PARTICIPAÇÃO ESPLÊNICA E VAGAL NA DEPOSIÇÃO DE
LIPÍDEOS NO TECIDO ADIPOSEO MARROM 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 pelo(a) Orientador(a) e pela Banca Examinadora.

BANCA EXAMINADORA

Orientador (a): Prof (a). Dr (a). Sabrina Grassioli
UNIOESTE

Membro da banca: Prof (a). Dr (a). Claudiceia Risso Pascotto
UNIOESTE

Membro da banca: Prof (a). Dr. Julio Cezar de Oliveira (PPG - CS)
UFMT

FRANCISCO BELTRÃO, PR
Março/2022

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação de mestrado decorre de uma experiência única e reúne contributos de várias pessoas. Como tal, agradeço a disponibilidade, acompanhamento atento e colaboração demonstrados por todos os colaboradores, nomeadamente:

Aos meus pais, aos meus amigos um agradecimento pelos desabafos e apoio mútuo nesta caminhada. Aos meus colegas de trabalho um agradecimento especial pela paciência e por disponibilizar tempo para os meus estudos.

Aos Professores e banca da UNIOESTE, e minha orientadora Prof (a). Dr (a). Sabrina Grassioli, obrigada pelo apoio, incentivo, confiança e pelo estímulo do meu interesse pelo conhecimento e pela vida académica.

Gratidão a minha amiga Pamela Stefanello, Vanessa Ceglarek e Jean F. Vetorazzi, os quais disponibilizaram tempo para me auxiliar nas análises laboratoriais e me apoiaram em toda essa caminhada.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos os colegas que contribuíram e me ajudaram, os quais são excelentes profissionais da saúde e merecem um universo de conquistas e sucesso.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Delineamento experimental.....	21
---	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - M-treatment modulates BAT histology.....	47
Tabela 2. Histological changes induced by vagotomy and splenectomy surgeries in BAT from non-obese rats.....	48
Tabela 3. Histological changes induced by vagotomy and splenectomy surgeries in BAT from M-obese rats.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP- Adenosina Tri Fosfato
CTL- Controle
CRH- Hormônio liberador Corticotropina
CTL-sham- Controle Falso Operado
CTL-spl- Controle Esplenectomizado
CTL-vag- Controle Vagotomizado
CTL-vag+spl- Controle Vagotomizado e Esplenectomizado
DM 2- Diabetes Mellitus tipo 2
GLP-1- Peptídeo semelhante ao Glucagon
HDL-C- Lipoproteína de Alta Densidade-colesterol
HE- Eosina Hematoxilina
IMC- Índice de massa corporal
M- Obeso
MBH- Hipotálamo Médio Basal
MCR4: Receptor de Melanocortina 4
MSG- Glutamato Monossódico
M-sham- M falso operado
M-spl- M esplenectomizado
M-vag- M vagotomizado
M-vag+esp- M vagotomizado e esplenectomizado
NV- Nervo Vago
RI- Resistência à Insulina
Sham- Falsa Operação
Slp- Esplenectomia
SNC- Sistema Nervoso Central
SPNs- Polimorfismo Nucleotídeo Único
TA- Tecido Adiposo
TAB- Tecido Adiposo Branco
TAG-Triacilglicerol
TAM- Tecido Adiposo Marrom
TG- Triglicérides

UCP- 1- Proteína acopladora -1

UNIOESTE- Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Vag- Vagotomia

A PARTICIPAÇÃO ESPLÊNICA E VAGAL NA DEPOSIÇÃO DE LIPÍDEOS NO TECIDO ADIPOSEO MARROM DE RATOS OBESOS E NÃO OBESOS

Resumo

O Tecido Adiposo Marrom (TAM) é especializado na termogênese, um processo que envolve a degradação de substratos energéticos, em especial os lipídios e a formação de um gradiente eletroquímico mitocondrial que é dissipado pela proteína desacopladora mitocondrial (UCP1) na forma de calor. Classicamente a termogênese é estimulada pela atividade do Sistema Nervoso Simpático (SNS), o qual está reduzido na obesidade. Estudos apontam que o ramo parassimpático, via Nervo Vago (NV) é capaz de influenciar a termogênese no TAM. Obesos tem hiperatividade vagal. O NV também modula a resposta imunológica, e seus efeitos anti-inflamatórios dependem da presença do baço. No presente estudo foram avaliados os parâmetros histológicos do TAM em roedores obesos e não-obesos submetidos a vagotomia associado a esplenectomia. Para tal, a obesidade foi induzida pela injeção subcutânea de glutamato monossódico (M; 4g/Kg) na primeira semana pós-natal. Ratos controles (CTL) ou não-obesos receberam solução salina equimolar. Ratos M e CTL foram desmamados aos 21 dias, e aos 60 dias de vida randomicamente distribuídos nos grupos conforme cirurgia: Esplenectomia (spl) – retirada do baço; vagotomia (vag) – secção NV; spl+vag (ambas as cirurgias) e falso-operados (sham) – simulação estresse cirúrgico (n=6 – 8 ratos/grupo). Aos 150 dias de vida e após 12h de jejum, os animais foram pesados e eutanasiados, e o TAM da região interescapular foi retirado, limpo lavado e pesado. Parte do TAM foi transferida para fixador e submetida a técnica histológica e coloração com hematoxilina e eosina (HE). Dados foram expressos como média±EPM, sendo aplicados o teste t Student's ou ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Ratos M são obesos, apresentando maior peso do TAM, no qual há maior teor de lipídios em relação aos animais CTL ($p < 0,05$). No grupo CTL a vag reduziu o peso corporal, o peso do TAM e a deposição de gordura em relação aos sham. A spl reduz o número de núcleos e eleva a deposição de gordura no TAM de animais CTL. Por outro lado, nos M-obesos a vag não altera significativamente nenhum parâmetro do TAM, enquanto a spl eleva o número núcleos. Assim o presente estudo indica que NV modula o teor de lipídios no

TAM de ratos não-obesos, sem interferência esplênica. Nos obesos, entretanto, o efeito do NV parece estar ausente, enquanto o baço, por via ainda não conhecida influencia o TAM de ratos obesos.

Palavras-chave: termogênese, lipídios, nervo vago, baço, obesidade.



SPLENIC AND VAGAL PARTICIPATION IN LIPID DEPOSITION IN BROWN ADIPOSE TISSUE OF OBESE AND NON-OBESE RATS

Abstract

Brown Adipose Tissue (BAT) is specialized in thermogenesis, a process that involves the degradation of energetic substrates, especially lipids, and the formation of a mitochondrial electrochemical gradient that is dissipated by the mitochondrial uncoupling protein (UCP-1) in the form of heat. Classically, thermogenesis is stimulated by the activity of the Sympathetic Nervous System (SNS), which is reduced in obesity. Studies indicate that the parasympathetic branch, via the Vagus Nerve (NV) is able to influence thermogenesis in BAT. Obese people have vagal hyperactivity. NV also modulates the immune response, and its anti-inflammatory effects depend on the presence of the spleen. In the present study, the histological parameters of BAT in obese and non-obese rodents undergoing vagotomy associated with splenectomy were evaluated. For this, obesity was induced by the subcutaneous injection of monosodium glutamate (M; 4g/Kg) in the first postnatal week. Control (CTL) or non-obese rats received equimolar saline. M and CTL were weaned at 21 days, and at 60 days of life they were randomly assigned to groups according to surgery: Splenectomy (spl) – removal of the spleen; vagotomy (vag) – NV section; spl+vag (both surgeries) and false-operated (sham) – surgical stress simulation (n=6 rats/group). At 150 days of age and after 12 hours of fasting, the animals were weighed and euthanized, and the BAT of the interscapular region was removed, cleaned, washed and weighed. Part of the TAM was transferred to a fixative and submitted to histological technique and staining with hematoxylin and eosin (HE). Data were expressed as mean±SEM, using the Student's t test or two-way ANOVA with Tukey's posttest ($p<0.05$). M rats are smaller, with a higher BAT weight, in which there is a higher lipid content compared to CTL animals ($p<0.05$). In the CTL group, vag reduces body weight, BAT weight and fat deposition in relation to sham. Spl reduces the number of nuclei and increase fat deposition in the BAT of CTL animals. On the other hand, in M-obese patients, vag does not significantly alter any parameter of the SAT, while spl increases the number of nuclei. Thus, the present study indicates that NV modulates the lipid content in the BAT of non-obese rats, without splenic interference. In obese subjects, however, the effect of NV seems to be absent, while the spleen, through an unknown route,

influences the BAT of obese rats.

Keywords: thermogenesis, lipids, vagus nerve, spleen, obesity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	16
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2	Objetivos específicos
19	
3. METODOLOGIA	20
3.1 Animais	20
3.2 Indução da obesidade hipotalâmica.....	20
3.3 Vagotomia e esplenectomia	21
3.4 Coleta e Preparo de Amostras de Tecido Adiposo Marrom para Histologia dos adipócitos	23
4. REFERÊNCIAS	23
ARTIGO CIENTIFICO	25
Vagus nerve and spleen: impact in brown adipose tissue histology and lipids deposition in obese and non-obese rats	29
ARTIGO DE REVISÃO	45
TECIDO ADIPOSEO MARRON UM ALIADO NA LUTA CONTRA OBESIDADE	45
ANEXOS	61
ANEXO A: Coloração HE	61
ANEXO B: Submissão a revista com resposta via e-mail.....	63
ANEXO C: Autorização do CEUA	64

1. INTRODUÇÃO GERAL

De acordo com as definições da Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade é considerada uma doença multifatorial complexa caracterizada por distúrbios nutricionais que predispõem a ocorrência de patologias crônicas como Diabetes Mellitus (DM), doenças cardiovasculares, hipertensão, acidente vascular cerebral e várias formas de câncer (MARIATH et al., 2007).

No Brasil, o sobrepeso e a obesidade vêm aumentando em todas as faixas etárias em ambos os sexos, sendo a velocidade de crescimento mais expressiva na população com menor renda familiar. Em adultos, o excesso de peso e a obesidade atingiram 56,9% e 20,8% da população em 2013, respectivamente. A obesidade ganhou destaque na agenda pública internacional nas três últimas décadas, caracterizando-se como um evento de proporções globais e de prevalência crescente gerando preocupação aos órgãos de saúde pública (DIAS et al., 2017).

A crescente prevalência da obesidade vem sendo atribuída a diversos processos biopsicossociais, no qual, não apenas o indivíduo e suas escolhas são responsáveis, mas sobretudo o “ambiente” (político, econômico, social, cultural), assume um lugar estratégico na análise do problema e nas propostas de intervenções. Neste contexto, o excesso de produtos industrializados, ricos em sódio, açúcares e gorduras, aliado ao sedentarismo tem contribuições importantes para o avanço do sobrepeso e obesidade no mundo todo (DIAS et al., 2017).

Durante instalação da obesidade ocorre desajuste do Tecido Adiposo (TA), com acelerada expansão da massa adiposa e disfunções na sua distribuição e fisiologia. Portanto, compreender a organização e função deste do TA é fundamental ao entendimento das comorbidades atreladas ao excesso de peso. Segundo Fonseca-Alaniz et al. (2006), o TA é o principal reservatório energético do organismo, uma vez que os adipócitos são as únicas células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triacilglicerol (TAG) em seu citoplasma, sem que isto seja nocivo para sua integridade funcional. Deste modo, os adipócitos do TA possuem todas as enzimas e proteínas reguladoras necessárias para sintetizar ácidos graxos (lipogênese) e estocar lipídios em períodos em que a oferta de energia é abundante, e para mobilizá-los pela lipólise quando há déficit calórico. A regulação desses processos ocorre por meio de nutrientes e sinais diferentes dos tradicionais sistemas neurais e hormonais,

e depende das necessidades energéticas do indivíduo (FONSECA-ALANIZ, et al.2006).

Nos mamíferos, existem dois tipos principais de TA o Tecido Adiposo Branco (TAB) e o Tecido Adiposo Marrom (TAM), havendo entre eles diferenças na distribuição, histologia e função. O TAB existe em maior quantidade no indivíduo, tendo ampla distribuição subcutânea e visceral, baixo metabolismo e produz uma série de adipocinas com efeitos prejudiciais à saúde (CORRÊA; HEYN; MAGALHAES ,2019).

O TAB é especializado no armazenamento de energia, na forma de triglicerídeos (TG), sendo uma de suas características a grande capacidade de expansão. Assim, nos adipócitos do TAB há uma grande e única gotícula de TG depositada de forma unilocular e ocupando quase todo o citosol. Por outro lado, adipócitos do TAM, são especializados na termogênese, um processo bioquímico de oxidação mitocondrial de lipídios que gera calor (BROETTO; BRITO, 2012). Assim adipócitos no TAM tem perfil de deposição lipídica multilocular, havendo várias gotículas de diversos tamanhos dispersas pelo citosol, abundantes mitocôndrias e alta vascularização e inervação (BROETTO; BRITO, 2012).

Na obesidade há disfunções do TA, e ao longo dos anos os aspectos deletérios do TAB foram mais estudados e explorados. Entretanto, evidências da participação do TAM no controle do metabolismo em humanos e seu impacto sobre a saúde nos obesos, tem revelado novos aspectos deste tipo de TA que podem ser relevantes no combate a obesidade. O TAM está presente exclusivamente em mamíferos, nos quais, sua principal função é termorregulação via termogênese sem tremores. O TAM é encontrado em grande quantidade em recém-natos de mamíferos roedores e hibernantes, sendo o principal local da termogênese adaptativa, onde ocorre o gasto de energia e produção de calor (HALPERN; MANCINI; CORREA, 2014). Durante muitos anos acreditou-se que o TAM era encontrado apenas em pequenos mamíferos, animais em hibernação e recém-nascidos. No entanto, pesquisas recentes mostraram que o TAM pode estar presente e funcional em humanos adultos, tendo sido encontrado na região interescapular e pescoço (CORRÊA; HEYN; MAGALHAES ,2019).

É no TAM que encontramos grande quantidade de mitocôndria, organela responsável pela termogênese. Nas cristas mitocondriais estão inseridas múltiplas

cópias da proteína desacopladora 1 ou UCP-1, do inglês *Uncoupling Protein – 1*, responsável pela termogênese. A UCP-1 desacopla a produção de energia na mitocôndria, desviando o gradiente de prótons do espaço intermembrana e gerando calor. Por sua vez a UCP-1 é considerada um marcador termogênico nos adipócitos (HALPERN; MANCINI; CORREA, 2014). A principal fonte de substratos energéticos para manter o gradiente de prótons mitocondrial no TAM são os lipídios, os quais são degradados via beta-oxidação. A termogênese, incluindo o aumento de mitocôndrias, maior expressão de UCP1 e beta oxidação de lipídios são estimulados pelo Sistema Nervoso Simpático (SNS) via norepinefrina e ativação dos receptores beta adrenérgicos (SILVEIRA, et al 2011).

Deste modo, a termogênese no TAM está sobretudo sob o controle do SNS, de tal modo, que situações fisiológicas que acionam o ramo simpático, como frio, jejum ou exercício físico são capazes de acionar a termogênese (HALPERN; MANCINI; CORREA,2014).

Interessantemente, a termogênese também pode ser modulada via dieta, sendo que dietas ricas em calorias podem causar uma ativação do TAM para queimar gordura (HALPERN; MANCINI; CORREA,2014), um mecanismo que poderia envolver o ramo parassimpático. Neste aspecto, novos dados indicam que pode haver um papel do Nervo Vago (NV), principal ramo parassimpático, na modulação da termogênese no TAM. O NV, embora não inerve diretamente o TAM diretamente, é capaz, via aferências, de controlar os sinais periféricos do SNS para os adipócitos do TAM. A estimulação nervosa do NV gera perda de peso em roedores e ativação da termogênese (VIJGEN GHEJ et al., 2013).

O TAM está inversamente relacionado com a obesidade e positivamente relacionado com a energia e supostamente a queima de gordura. Na obesidade há redução da termogênese, menor expressão da UCP1 e acúmulo de gordura no TAM. A descoberta de novos papéis do TAM em adultos, trouxe aspectos adicionais sobre o impacto deste tecido na saúde. Deste modo, descobriu-se que a regulação neural da termogênese era mais complexa, e que o NV teria a capacidade de modular a termogênese do TAM indiretamente. Estudos posteriores mostraram que o NV era capaz de captar sinais de nutrientes periféricos e encaminhar ao Sistema Nervoso Central (SNC) o qual via ramo eferente do SNS alterava a termogênese (CHEN LIU et al, 2014)

Na obesidade ocorre um desajuste autonômico, caracterizado pela redução do

SNS e aumento da atividade do Sistema Nervoso Parassimpático (SNP), sobretudo caracterizada por hiperatividade vagal. A hiperfunção do NV é um evento bem conhecido na hiperinsulinemia, adiposidade e Resistência à Insulina (RI) em obesos (VIJGEN GHEJ et al., 2013).

O NV é também hábil em modular respostas anti-inflamatórias importantes no metabolismo (VIJGEN GHEJ et al., 2013). As ações anti-inflamatórias vagais são dependentes de órgãos imunes, em particular o baço. O baço é um órgão linfóide relacionado ao mecanismo inflamatório e obesidade. Diferentes estudos, têm demonstrado que o baço pode modular a adiposidade, a secreção e a ação da insulina na obesidade (LEITE et al., 2015; WU et al., 2013). Recente nosso grupo de pesquisa comprovou que NV e o baço interagem para modular o TAB em roedores obesos e não obesos (KUCHLER, et al. 2021). Se esta interação modula a termogênese no TAM alterando a deposição de gordura, ainda é desconhecido.

Roedores tratados neonatalmente com glutamato monossódico (M) desenvolvem obesidade, dislipidemia, RI e intolerância à glicose, sem hiperfagia, sugerindo baixo metabolismo basal. Importante, roedores M-obesos tem maior deposição de gordura no TAM e baixa termogênese, associado com menor liberação das catecolaminas locais (VOLTERA, et al. 2008).

Este modelo de obesidade hipotalâmica, tem conhecida hiperatividade do NV e disfunções esplênicas. A ablação do NV (vagotomia) e do baço (esplenectomia) melhora a adiposidade e comorbidades neste modelo experimental (CHEN L. et al. 2014). Nossa hipótese é que o NV e o baço possam modular a termogênese no TAM alterando o teor de lipídios depositado no tecido, sendo esta regulação diferente em ratos não-obesos e ratos M-obesos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da vagotomia associada a esplenectomia sobre os parâmetros histológicos e deposição de lipídios no TAM de ratos M-obesos e não obesos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da vagotomia associada a esplenectomia sobre o peso do TAM

em ratos M-obesos e não obesos.

- Caracterizar aspectos morfológicos de área dos adipócitos e número de núcleos do TAM em ratos vagotomizados e esplenectomizados M-obesos e não obesos.
- Verificar o impacto da vagotomia associada esplenectomia sobre a deposição de lipídios no TAM de ratos M-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), sendo recorte de um projeto maior intitulado: A participação esplênica e vagal na deposição de lipídeos no tecido adiposo marrom de ratos obesos e não obesos. Coordenado pela Dr^a. Sabrina Grassioli. A amostra foi composta por *Rattus Norvegicus* da linhagem Wistar, machos, em um número de 48 ratos divididos em obesos (n=24) e não-obesos (n=24) submetidos as cirurgias de vagotomia (VAG), Esplenectomia (ESP) ou Falso-Operados (FO).

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE no dia 16 de março de 2017 (ANEXO A). “A interação bidirecional entre atividade autonômica e esplênica pode modular o controle secretor de insulina em ratos obesosMSG? ”, coordenado pela Dr^a. Sabrina Grassioli.

3.1 Animais

As ratas prenhas oriundas do biotério central da UNIOESTE, foram alojadas em caixas individuais, tendo água e ração a vontade, permanecendo no biotério setorial do Laboratórios de Fisiologia Endócrina e Metabolismo (LAFEM), sob condições controladas de luminosidade (12 horas claro – 12 horas escuro) e temperatura ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) até o nascimento da prole. No dia do nascimento as ninhadas foram ajustadas para 6 filhotes machos por ratas, sendo randomicamente distribuídos em obesos e não-obesos como explicado a seguir.

3.2 Indução da obesidade hipotalâmica

A partir do segundo dia de vida os ratos receberam injeções de M (4g/Kg de peso corporal) via subcutânea, com agulha de insulina (nº0,25x6) na região do dorso do animal até o sexto dia de vida. Em igual período animais do grupo Controle (C) não obesos, receberam salina equimolar. O desmame ocorreu aos 21 dias de vida, e randomicamente os animais foram distribuídos em subgrupos conforme procedimentos cirúrgicos descrito a seguir. Durante todo o desenvolvimento da pesquisa estes animais permaneceram em caixas plásticas (3 ratos/caixa), com condições controladas de luminosidade (12 horas claro – 12 horas escuro) e temperaturas ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e receberam ração e água *ad libitum*.

3.3 Vagotomia e esplenectomia

A vagotomia subdiafragmática (vag) e esplenectomia (spl) ocorreram aos 60 dias de vida do animal conforme protocolos de Balbo et al. (2007) e Gotho et al. (2012), respectivamente. Brevemente, os animais em jejum (12 horas) prévio foram anestesiados com isoflurano (1%), sob oxigênio a 1 mL/min em máscara e ventilação espontânea. Após atestada a eficácia da anestesia, para os animais realizou-se uma incisão ventral (± 2 cm) logo abaixo do esterno, afastou-se o intestino e o fígado para permitir melhor visualização do esôfago e, com auxílio de uma lupa, os ramos anterior e posterior do NV foram identificados, afastados da parede do esôfago e amarrados com fio cirúrgico sendo imediatamente seccionados.

Para a retirada do baço, os animais foram anestesiados e a incisão realizada de forma semelhante ao procedimento feito para a vag. O baço foi localizado, exteriorizado da cavidade abdominal, com auxílio de uma pinça, os vasos sanguíneos amarrados com fio de algodão (0,10) e seccionados para retirada do órgão. Para os animais vag + spl, os procedimentos foram realizados em ato cirúrgico único.

Nos animais selecionados para a falsa-operação (sham), realizamos a laparotomia exploratória, manuseando e afastando o NV do esôfago, porém não o seccionando, o baço foi exteriorizado, porém não retirado. As incisões cirúrgicas musculares foram fechadas com fio de sutura absorvível, enquanto a incisão cutânea feita com fio de sutura nylon. Durante o período de recuperação dos procedimentos cirúrgicos os animais ficaram alojados em caixas individuais por aproximadamente 7 dias, garantindo uma melhor cicatrização. Posteriormente reagrupados em caixas (3 ratos/caixa) conforme grupo experimental abaixo:

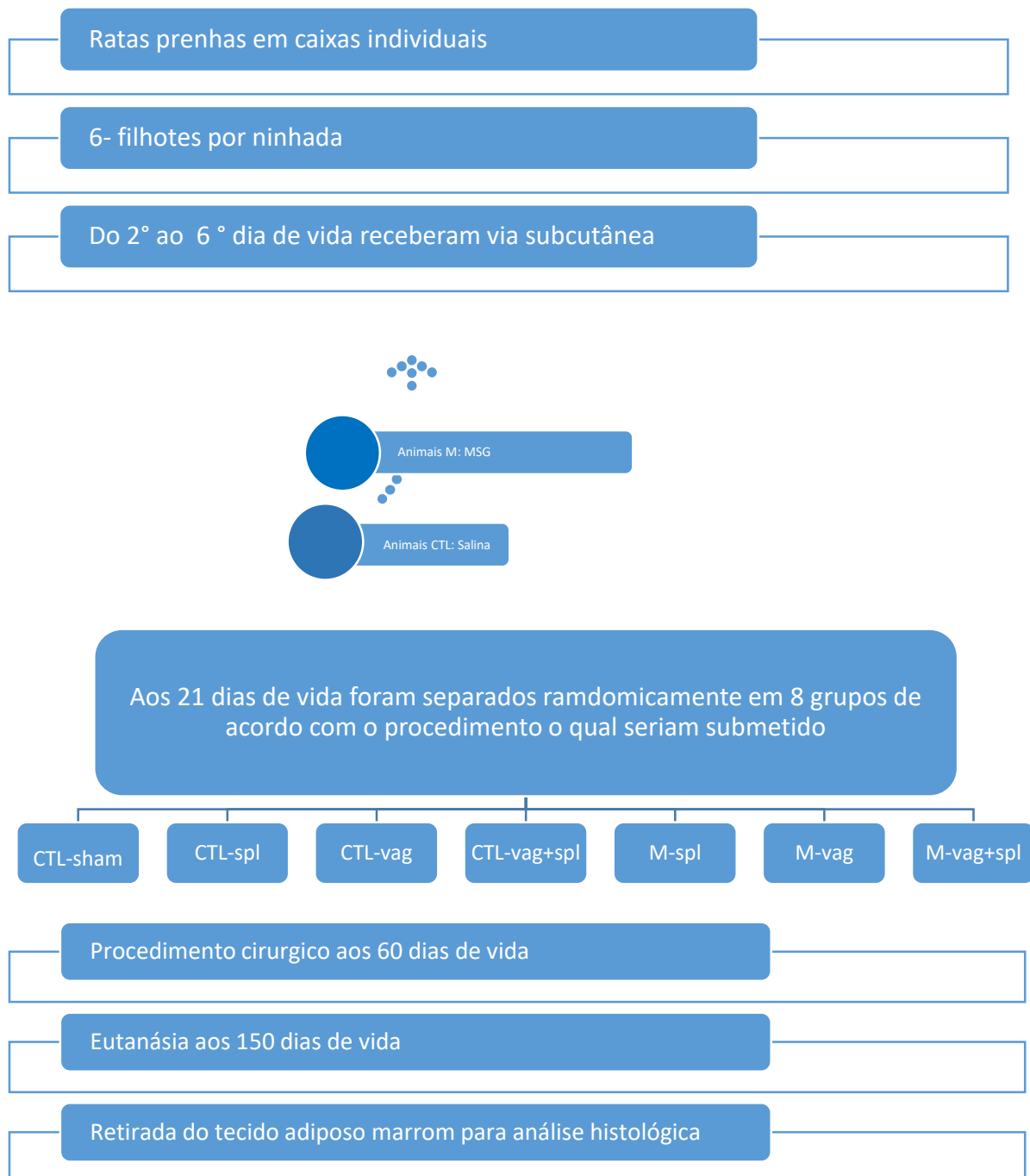


Figura 1: Delineamento experimental.

Os animais controles foram divididos em: Controle Falso Operado, Controle Vagotomizado, Controle Esplenectomizado e Controle Vagotomizado + Esplenectomizado. Obeso Falso Operado, Obeso Vagotomizado, Obeso Esplenectomizado e Obeso Vagotomizado + Esplenectomizado. Destes foram selecionados randomicamente 5-6 animais por grupo para análise do TAM feita no presente estudo.

3.4 Coleta e Preparo de Amostras de Tecido Adiposo Marrom para Histologia dos adipócitos

Aos 150 dias de vida os animais foram eutanasiados e os depósitos TAM 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 TAM 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 paraplast (McCormick™) sendo submetidos a procedimentos de microtomia. Foram realizados cortes semisseriais (5µm) que foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). Cinco a seis ratos por grupos foram usados para montar 3 fatias por ratos contendo pelo menos 3 cortes por fatia. Posteriormente as lâminas foram colocadas em estufa a 40°C, até secarem e, por fim fixada lamínulas. As lâminas foram analisadas em fotomicroscópio (OLYMPUS BX60) em aumento de 40x. O tamanho dos adipócitos (µm²) 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 (KUCHLER, 2021; SIQUEIRA, 2019).

4. REFERÊNCIAS

BROETTO, F. N.; MARIA DO NASCIMENTO BRITO. Tecido adiposo marrom e obesidade em humanos. Rev. **Saúde e Pesquisa**, v.5, n.1, 2012.

CHEN, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204–7218, 2018.

CHEN, L. et al. PPAR γ em neurônios vagais regula a termogênese induzida por dieta rica em gordura. **Revista Cell Metabolism**, v. 19, e. 4, p. 722-730, 2014.

CORRÊA LH, HEYN GS, MAGALHAES KG. The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. **Cells**, v.30, n.8, p.662, 2019.

DIAS, P. C. et al. Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro. **Cad. Saúde Pública**, v. 33, n. 7, 2017.

FONSECA-ALANIZ, MIRIAM H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia [online]**, v. 50, n. 2 p. 216-229, 2006.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de pediatria**, v. 83, n.5, p. 192-203, 2007.

HALPERN, B; MANCINI, M. C; HALPERN, A. Brown adipose tissue: what have we learned since its recent identification in human adults. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 58, n. 9, p. 889-899, 2014.

KUCHLER J. C et al. The Vagus Nerve and Spleen: Influence on White Adipose Mass and Histology of Obese and Non-obese Rats. **Front Physiol**, v.25, e. 12, p. 1- 15, 2021.L

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.

MARIATH, A. B. et al. Obesidade e fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis entre usuários de unidade de alimentação e nutrição. **Cadernos de Saúde Pública [online]**, v. 23, n. 4, p. 897-905, 2007.

SILVEIRA, LEONARDO R. et al. Regulação do metabolismo de glicose e ácido graxo no músculo esquelético durante exercício físico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia [online]**, v. 55, n. 5, p. 303-313, 2011.

VIJGEN G. et al. A estimulação do nervo vago aumenta o gasto de energia: relação com a atividade do tecido adiposo marrom. **PLoS ONE**, v.8, n. 10, 2013.

WU, L. et al. Spleen supports a pool of innate-like B cells in white adipose tissue that protects against obesity-associated insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 43, p. 4638-4647, 2013.

ARTIGO CIENTIFICO

Vagus nerve and spleen: impact in brown adipose tissue histology and lipids deposition in obese and non-obese rats

Artigo submetido no dia 22 de fevereiro de 2022 em Journal: Clinical and Experimental Gastroenterology

1 ORIGINAL RESEARCH

2 3 4 Vagus nerve and spleen: impact in brown adipose tissue histology 5 and lipids deposition in obese and non-obese rats

6 Cassiane Lisbinski Nottar¹, Vanessa Marieli Ceglarek², Bruna Schumaker Siqueira³, Sandra
7 Lucinei Balbo³, Pamela Rufina Stefanello⁴, Jean Franciesco Vettorazzi⁵, Sabrina Grassioli³

8
9 ¹Postgraduate Program in Applied Health Sciences, Western Paraná State University, Francisco

10 Beltrão, Brazil. ²Postgraduate Program in Biological Sciences: Physiology; Department of

11 Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. ³Postgraduate

12 Program in Biosciences and Health; Laboratory of Endocrine and Metabolic Physiology,

13 Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Brazil. ⁴Postgraduate Program in

14 Pharmaceutical Sciences, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Brazil.

15 ⁵Laboratory of Endocrine and Metabolic Physiology, Universidade Estadual do Oeste do

16 Paraná, Cascavel, Brazil

17
18 Correspondence author: Sabrina Grassioli

19 Street Universitária, n 1619; Jardim Universitário, Cascavel –PR - Brazil. Postal Cod 85810119

20 Tel +55 45 32203257

21 Email sgrassioli@gmail.com

22
23
24 **Abstract:** The vagus nerve (VN) and spleen can influence metabolism and adipose tissue
25 mass. Thermogenesis is a biochemistry process of lipids degradation that results in heat
26 production, contributing to energy expenditure and body weight control. Brown adipose tissue
27 (BAT) is the primary site of thermogenesis and the VN can influence this process. Herein, we
28 evaluated the impact of vagotomy associated with splenectomy on BAT histology and lipids
29 deposition in non-obese and hypothalamic obese male rats. For this, obesity was induced by
30 neonatal glutamate monosodium (M; 4g/Kg) administration while non-obese or Control (CTL)

31 rats received equimolar saline. At 60 days of life, M and CTL groups were randomly distributed
32 at subgroups, according to surgical process: vagotomy (vag); splenectomy (spl); vag+spl; and
33 sham. At 150 days of life, the animals were weighed, measured, and euthanized t removal of
34 white adipose retroperitoneal (WAT-R), BAT depots, and blood analysis. BAT depots were
35 submitted to histological process and were evaluated nuclei number, adipocytes area, and
36 qualitative description of lipids droplets fat. Elevated adiposity, hyperinsulinemia, and smaller
37 growth were found in M-obese in relation to CTL. Vagotomy reduced the WAT-R content in CTL
38 and M-obese. Despite vag reduces the BAT weight, no was modified nuclei number or brown
39 adipocyte area in BAT from CTL animals. The absence of vag effects was found in the BAT of
40 M-obese rats. The spl reduced the nuclei number and increased lipids deposition in BAT from
41 CTL rats. In the contrast, M-obese submitted to spl showed a reduction in nuclei number and
42 lipids deposition in BAT. Thus, we concluded that VN ablation no modified histology or lipids
43 deposition in BAT, suggesting the absence of the vagal effects in thermogenesis at
44 thermoneutrality conditions. However, the spleen can modulate lipids deposition and nuclei
45 proliferation in BAT, exerting opposite effects in non-obese and M-obese states.

46 **Keywords:** Hypothalamic obese. Glutamate monosodium. Thermogenesis. Vagotomy.
47 Splenectomy. Adipocyte.

48

49 Introduction

50 Adipose tissue is a complex organ that modulates energy metabolism, regulates body
51 temperature, besides exert important endocrine action via adipokines¹. The white adipose tissue
52 (WAT) and brown adipose tissue (BAT) are principal adipose tissue depots having a direct
53 impact on health². In this sense, despite smaller quantity, the BAT depot is able, in human and
54 rodents, to influences energy expenditure, modulating lipids and carbohydrates homeostasis³.
55 Obesity can impact the amount and activity of BAT contributing to the installation of
56 comorbidities such as diabetes and cardiovascular diseases⁴. The BAT amount and activity
57 were reported to be 4-fold higher in lean individuals than overweight/obese individuals,
58 suggesting BAT's role in weight control. Moreover, the inverse relationship between BAT activity
59 and body fatness suggests that BAT, because of its energy dissipating activity, is protective

60 against body fat accumulation⁵.

61 Brown adipocyte organization and the profile of lipids deposition determine the
62 functional state and directly reflect innervation, thermogenesis activity, and the neuronal control
63 of BAT³. Since the recent rediscovery of BAT in adult humans, this thermogenic tissue has been
64 attracting increasing interest, in particular, in controlling energy metabolism⁶. In this regard, in
65 health conditions the intracellular lipid droplet (LD) accumulated in brown adipocytes present
66 profile multilocular of deposition, being observed small and numerous lipids droplets dispersed
67 in cytosol⁷. Moreover, normally active BAT shows higher mitochondria content, elevated nuclei
68 number, and augmented presence of innervation and vascularization⁶. In the contrast, at obesity
69 state the brown adipocytes can present large unilocular LD in which the area of the contact site
70 of the LD with lipase becomes small, resulting in the restriction of lipolysis and high lipids
71 deposition⁸. Thus, at health states the brown adipocytes can quickly oxidize their fat stores and
72 circulating substrates, thus producing heat and increasing metabolic rate, a process nominated
73 thermogenesis³. BAT is the major thermogenic organ in rodents and humans⁹. Thermogenesis
74 in BAT is possible due to the elevated expression of the tissue-specific uncoupling protein 1
75 (UCP1) found in mitochondrial internal membrane¹⁰. The UCP1 protein effectively conducts
76 thermogenesis by uncoupling substrate oxidation and adenosine triphosphate production
77 through the proton leak¹¹. In this respect, the fatty acids released from brown adipocyte LDs by
78 lipolysis are thought to activate and fuel UCP1-mediated thermogenesis. Thus, BAT functions to
79 facilitate adaptive thermogenesis or the uncoupling of ATP production and substrate oxidation¹².

80 Important, BAT thermogenic process is regulated by the sympathetic nervous system
81 (SNS) which via norepinephrine (NE) and beta-adrenergic receptor stimulates mitochondrial
82 beta-oxidation guarantying energy substrates to sustain thermogenic process¹¹. However, more
83 recent data have indicated that the parasympathetic nervous system (PNS), in particular, the
84 vagus nerve (VN) could also modulate BAT activity and function².

85 The VN is an important agent in metabolism control. High vagal activity is intimately
86 related to hyperinsulinemia, insulin resistance (IR), and glucose intolerance in several obesity
87 models. Moreover, reduction of WAT content and restoring in lipids homeostasis is found in
88 rodents and human obese submitted to vagotomy¹³. However, the role of VN in modulating the

89 thermogenic process is unclear. In this point, a study of Szekely¹⁴ showed that viscerosensory
90 afferents, with axons in the VN, synapsing on second-order neurons in the nucleus of the
91 solitary tract (NTS) can also influence BAT activity. Similarly, was demonstrated that vagal
92 afferents played a role in BAT thermogenesis in humans, showing that VN stimulation
93 significantly increases whole-body energy expenditure in parallel with BAT activity¹³. In rats,
94 peripherally administered cholecystokinin (CCK) activates the SNS–BAT axis via the CCK
95 receptor and vagal afferent nerves. Interestingly, vagal sensory neurons promote diet-
96 induced thermogenesis (DIT) and may serve as an early protective mechanism against HFD-
97 induced weight gain⁹. The SNS and SNP interact at multiple levels along the neural axis and
98 NTS neurons not only receive and integrate metabolic signals from vagal afferents but also
99 regulate sympathetic output through relay circuits within the ventrolateral medulla⁹. In this
100 respect, ghrelin induces NE liberation in BAT, an event blocked by vagotomy¹⁵.

101 The VN also modulates inflammatory condition, exerting, via splenic tissue, an anti-
102 inflammatory vagal reflex that improves comorbidities associated with obesity and diabetes¹⁶.
103 The spleen is an important immune and hematological organ whose activity can affect
104 metabolism, including glucose and lipids homeostasis¹⁷. Interesting splenic signals can
105 influence BAT thermogenesis having the potential to modulate UCP1 expression as well as
106 brown adipocytes development¹⁸. Thus, VN and spleen may interact to modulate BAT lipids
107 deposition. Thus, in the present work, we evaluated the impact of vagotomy associated with
108 splenectomy on BAT lipids deposition in non-obese and hypothalamic obese male rats.

109

110 **Material and methods**

111 **Animal Care**

112 The present study was used Wistar male rats, maintained sob-controlled conditions de
113 luminosity (12h dark/light) and temperature (23 ±2 °C) and free access to water and food intake.
114 The project was previously approved by Animal Ethical Commit (CEUA) of State University of
115 West Parana (UNIOESTE), Cascavel – Brazil on 09/06/2017, respecting the Brazilian Animal
116 Care Law established by the National Council for the Control of Animal Experimentation

117 (CONCEA) and conforming to the principles and regulations of ARRIVES guidelines.

118 **Obesity hypothalamic induction**

119 Ten Wistar pregnant rats were allocated in local bioterium of Laboratory of Endocrine
120 and Physiology and Metabolism (LAFEM) – Unioeste – Cascavel – Brazil until the offspring
121 birth. At birth, the offspring size was adjusted to 6 pups by dams to guarantee adequate milk
122 ingestion. Only male pups were maintained to avoid hormonal sex female influences. Twenty-
123 four male pups were randomly selected and received from 2nd to 6th post-natal days
124 subcutaneous injections of monosodium glutamate (MSG) in a diary dose of 4g/Kg of body
125 weight (BW) according to originally proposed by Onley¹⁹ with adaptations. At the same period
126 and via non-obese or Control (CTL; n= 24 rats) rats received saline (NaCl) hyperosmolar
127 solution at a dose of 1.25g/Kg/BW. The CTL and M rats were weaned at 21 days of life and
128 distributed in cages (n=3 – 4 rats/cages) and received water and rodent chow (Biobase; Santa
129 Catarina; Brazil) ad libitum, being maintained sob-controlled conditions de luminosity (12h
130 dark/light) and temperature (23 ±2 °C) until of 60 days of life.

131 **Vagus Nerve and splenic ablation**

132 At 60 days of life and after 12h of fasting 6 rats of CTL and M groups were randomly
133 selected for surgical procedures as described below. The subdiaphragmatic vagotomy (SV) was
134 performed according to the protocol established by Balbo *et al.*²⁰. Briefly, the animals in the
135 previous fasting (12 hours), were anesthetized with isoflurane (1%), under oxygen at 1mL/min in
136 a mask and spontaneous ventilation. In next, the abdominal wall was laparotomized and the
137 liver and stomach separated to facilitate access to the vagus nerve (VN) in the esophagus wall.
138 Thus, VN was isolated and cut. After vag, the abdominal muscle and skin were sutured. The
139 spleen ablation, splenectomy (spl), was performed according to the protocol established by
140 Balbo *et al.*²⁰ e Gotoh *et al.*²¹. Briefly, after anesthesia and abdominal laparotomy the spleen
141 was located, the blood vessels tied, and the organ was excised. After spl, the abdominal muscle
142 and skin were sutured. Some animals received VN and spl at the same surgical procedures.
143 Sham-operated rats were used as surgical control. After VN and spl surgeries the animals were
144 transferred to individual cages received water and rodent chow ad libitum for 7 days. Thus,

145 considering obesity and surgeries procedures were originated 8 experimental groups (6
146 rats/group): CTL-sham: non-obese sham-operated; CTL-vag: non-obese submitted at
147 subdiaphragmatic vagotomy; CTL-spl; non-obese splenectomized; CTL-vag+spl: non-obese
148 submitted at subdiaphragmatic vagotomy and splenectomized; M-sham: obese sham-operated;
149 M-vag : obese submitted at subdiaphragmatic vagotomy; M-spl: obese splenectomized and M-
150 vag+spl: obese submitted at subdiaphragmatic vagotomy and splenectomized. After 7 post-
151 surgical days, the animals were regrouped (3 rats/cages) and received water and food intake ad
152 libitum.

153 **Biometric, adiposity, and plasma biochemistry analysis**

154 Next, the rats were desensitized with CO₂ and decapitate. The blood was collected in
155 heparinized tubes, centrifuged (5000 rpm/15min, 10°C) and plasma separated to glucose and
156 insulin dosage. Glucose was measured by colorimetric kit and insulin by radioimmunoassay
157 technical. Immediately the interscapular BAT was excised, cleaned, and weighted, being
158 transferred to fixation solution (ALFAC) by 24h. Moreover, the visceral WAT retroperitoneal
159 (WAT-R) depot was excised and weighted to adiposity analysis.

160 **Brown adipose tissue histological procedures and analysis**

161 Twenty-four hours after fixation of the BAT, the tissue exemplars (n=6 rats/group) were
162 transferred to alcohol (70%) and submitted to histological procedures. Briefly, the samples were
163 dehydrated in growing alcohol solution (80 – 100%), diaphanized in xylol, and embedded in
164 paraplast (McCormickTM; Leica Microsystems Pty Ltd; Australia). Next, the tissue was
165 sectioned at microtome (Microsystems Inc., Wetzlar, Germany) to obtain 3 -5 cuts of 5-7 µm-
166 thick sections. Dewaxed sections are then stained with hematoxylin and eosin (H&E) and
167 photographed using an Olympus BX51 (Olympus Microscope, Shinjuku, Japan), and digital
168 photographs were taken with a digital still 36-bit color camera, 1280x1024 pixels, with a DP71
169 Controller (Olympus). The ImageJ 1.42q software (National Institutes of Health [NIH], Bethesda,
170 Md), available from the NIH site (<http://rsb.info.nih.gov/ij>, accessed on January 18, 2019). For
171 this, in each cut of BAT tissue was selected a quadrant 20.0000 µm² and photomicrography
172 registered. Inside of quadrant were evaluated nuclei number and brown adipocyte area (µm²).

173 Moreover, a qualitative description of the droplet's fat profile was done.

174 **Statistical Analysis**

175 The data are presented as mean± standard error mean (SEM). All data were submitted
176 to the Shapiro Wilk normality test and submitted to two-way analysis of variance to obtain F
177 values to vag, spl, and interaction (vag versus spl). The Tukey post-test was used to analyze
178 mean differences. Two-way ANOVA and Tukey post-test were performed to inside of non-obese
179 (CTL) and obese (M) groups. Student t-test was used to evaluate the obesity effect, comparing
180 CTL and M rats. In all statistical analyses $p < 0.05$ was adopted as the significant criterion.

181

182 **Results**

183 M-obese rats presented massive adiposity, hyperinsulinemia, smaller growth, in
184 comparison to CTL, confirming hypothalamic obesity characteristics (Table 1). Moreover, M-
185 obese showed increased BAT weight, associated with a reduction in nuclei number and higher
186 lipids deposition in relation to BAT of CTL rats, as demonstrated in Figure 1 and respective
187 photomicrographs (Figure 1d and 1e). BAT from CTL animals showed elevated nuclei density,
188 vascularization, and adipocytes containing numerous and small LD disperses at cytosol (Figure
189 1d). In contrast, smaller nuclei density and elevated unilocular LD profile were observed in BAT
190 from M-obese animals (Figure 1 e). In non-obese rats (CTL) was noted vagotomy influences
191 BW ($F_{(1, 20)} = 9.789$; $p = 0.0053$) and WAT-R content ($F_{(1,19)} = 4.624$; $p = 0.0446$). Thus, BW
192 reduction was found in CTL-vag rats concerning CTL-sham ($p = 0.0381$; Table 2).

193 Despite of reduction in WAT-R, CTL-vag not was statistically different of CTL-sham at
194 post-test ($p = 0.1186$). Neither vagotomy nor splenectomy influences fasting glucose levels in
195 CTL rats. However, interaction (vag x spl) was noted ($F_{(1,20)} = 6.539$; $p = 0.0188$). Thus, CTL-spl
196 rats had reduction of fasting glucose in comparison to CTL-vag+spl animals (0.0492).
197 Splenectomy no affected fasting insulin. On contrast, vagotomy influences insulin plasma levels
198 ($F_{(1,12)} = 9.71$; $p = 0.0089$); but without significant effect at post-test. In M-obese rats neither
199 vagotomy ($F_{(1,20)} = 0.04536$; $p = 0.8335$) nor splenectomy influences BW ($F_{(1,20)} = 0.1092$;
200 $p = 0.7445$). However, vagotomy ($F_{(1,20)} = 14.01$; $p = 0.0013$) alter WAT-R content. In this regard,

201 M-vag ($p=0.0019$) and M-vag+spl ($p= 0.0026$) groups presented significant reduction in WAT-R
 202 content in relation to M-sham animals (Table 3). Moreover spleen ($F_{(1,20)} = 4.855$; $p=0.0394$)
 203 and interaction ($F_{(1,20)} = 5.813$; $p=0.0256$) also modified WAT-R in M-obese group. Thus, M-spl,
 204 MSG-vag and MSGvag+spl groups showed smaller WAT-R in relation to M-sham rats. Neither
 205 vagotomy nor splenectomy altered significantly fasting glucose and insulin values in M-obese
 206 groups.

207 The impact of vagotomy and/or splenectomy in BAT weight and histology from non-
 208 obese and M-obese rats are shown in Figures 2 and 3, respectively. In CTL groups was
 209 observed vagotomy effect in BAT weight ($F_{(1,20)} = 1.242$; $p=0.2783$) having CTL-vag and CTL-
 210 vag+spl groups smaller BAT weight in relation to CTL-spl rats. Splenectomy ($F_{(1,20)} = 6.493$;
 211 $p=0.0192$) and interaction ($F_{(1,20)} = 4.773$; $p=0.0410$) effects were found in nuclei number of
 212 BAT from CTL animals (Figure 2a). Thus, CTL-spl rats had smaller nuclei numbers in relation to
 213 CTL-sham and CTL-vag groups (Figure 2b). Moreover, splenectomy ($F_{(1,20)} = 4.692$;
 214 $p=0.0426$) influences adipocyte area in BAT of non-obese animals, but without
 215 significant effect at post-test. Qualitative histological analysis of BAT confirms these data. Thus,
 216 it is possible to note that BAT from CTL-spl rats have high nuclei number and rises in LD
 217 infiltration in comparison to BAT from CTL-sham (Figure 2).

218 In M-obese animals were not observed effects of vagotomy neither in BAT weight ($F_{(1,20)} = 3.444$;
 219 $p=0.0783$; Figure 3 e) and nuclei ($F_{(1,20)} = 3.199$; $p=0.0888$; Figure 3 e) nor in
 220 brown adipocytes area ($F_{(1,20)} = 1.100$; $p=0.3069$; Figure 3 g). Similar, BAT weight ($F_{(1,20)} =$
 221 1.521 ; $p=0.2318$) and adipocytes area ($F_{(1,20)} = 1.462$; $p=0.2407$) no were affected by
 222 splenectomy in M-obese groups. However, the BAT nuclei number was influenced by
 223 splenectomy ($F_{(1,20)} = 16.52$; $p=0.0006$), presenting M-spl animals higher nuclei number in BAT
 224 in relation to M-sham and M-vag groups. Qualitative histological analysis pointed higher nuclei
 225 number in BAT from M-spl rats compared to BAT of M-sham animals (Figure 3).

226

227 Discussion

228 A high dose of monosodium L-glutamate administered at first post-natal days induces

229 obesity and metabolic abnormalities at long of a life as confirmed at present work²². Insulin is a
230 primary lipogenic hormone, thus, hyperinsulinemia has a central role in adiposity in M-treated
231 rats²³. Moreover, M-treated rats have hypothalamic ARC lesions resulting and diminished GH
232 secretion²⁴, event-related with smaller NAL and BW in these animals, as also shown here. M-
233 treated rats do not have hyperphagia and lower resting metabolism has greater influences on
234 adiposity induced by M-treatment. In this sense, the BAT is an important energy expenditure
235 tissue²⁵. The BAT hypoactivity has been registered in rodents M-treated (Virtue e Vidal-Puig,
236 2013).

237 Corroborating, we showed increased BAT weight associated with higher lipids
238 deposition, suggesting a reducing thermogenesis process. Important, to record, that
239 thermogenesis activity oscillates according to temperature²⁶. Thus, decreases in BAT
240 mitochondrial GDP binding and oxygen consumption as well as lowered resting metabolic rate
241 were found in M-treated mice at thermoneutrality condition²⁷. However, at cold exposition
242 increased norepinephrine turnover and normal thermogenesis were noted in mice M-treated^{28,29}.
243 M-treated rodents present reduce sympathetic flux and this process can justify smaller
244 thermogenesis activity in this obese model. In addition, insulin stimulates glucose and lipids
245 uptake in brown adipocytes favoring thermogenesis³⁰.

246 As demonstrated by our research group M-treated rats are IR an event that can
247 contribute to higher BAT lipids deposition³¹. Activated brown adipocytes dissipate energy,
248 resulting in heat production. Thus, BAT burns fat and increases the metabolic rate, promoting a
249 negative energy balance. For this metabolic profile, BAT activity can alleviate metabolic
250 complications like dyslipidemia, IR, and type 2 diabetes³².

251 The anti-obesity contribution of BAT thermogenesis has been well documented in
252 rodent-obesity models. More recently studies human studies showed that BAT specific depots
253 could be reactively contributing to energy balance and body weight control. In this, sense obese
254 subjects present diminished BAT activation³³. Here we noted that vagotomy promoted WAT-R
255 depot reduction in non-obese and M-obese states, but this effect was more accented in M-
256 treated rats. Vagal hyperactivity is a common characteristic of M-obese animals³³, an event that
257 can explain the greater effect of VN ablation in WAT from the M-obese group. Hyperinsulinemia

258 and high vagal activity have a relationship with WAT content in M-treated rats³⁴. Moreover,
259 while splenectomy does not affect WAT-R content in non-obese, in M-obese animals the spleen
260 ablation provoked a reduction in WAT-R content, suggesting splenic participation in WAT
261 visceral regulation. This data, confirm previous findings published by us and others splenectomy
262 modify adiposity and metabolic state³⁴. As above mentioned, BAT thermogenesis is directly
263 stimulated by SNS and norepinephrine. However, parasympathetic activity, via VN is also able
264 in modulates BAT function, a mechanism unclear³⁵.

265 According to our data, in non-obese rats the vagotomy reduced BAT weight without
266 modified lipids or histologic aspects of BAT. Moreover, in M-obese we did not note the effect of
267 vagotomy in BAT weight, brown adipocytes size, and lipids deposition from M-obese animals.
268 Taken together, these finding appears to indicate that VN no modulates lipid deposition in BAT,
269 in contrast, those indicated by several studies state³⁴. It is well recognized the VN does not
270 direct innervate the brown adipocytes. However, VN afferent signals to NTS appear to be
271 important to BAT stimulus and vagal thermogenic effects³⁶. In this regard, many anti-diabetic
272 and anti-obesity agents directly act on vagal afferents neurons, including agonists for the
273 glucagon-like peptide 1 (GLP1) receptor and cannabinoid 1 receptor (CB1)³⁷. A recent study by
274 Hibi *et al.*³⁸ has shown that selective VN afferent interruption signals can modulate BAT
275 thermogenesis induced by a high-fat diet. Thus, BAT thermogenesis may action by VN afferent
276 signal be more relevant to DIT or cold-induced thermogenesis³⁸. Is important, to record that in
277 the present work, animals consumed regular chow rodents and were maintained at
278 thermoneutrality conditions. Interestingly, we observed that spleen ablation modifies BAT
279 histology and lipids deposition, exerting contrary effects in obese and non-obese states³⁹.

280 In this sense, elevated BAT weight, with reduced nuclei number and higher lipid
281 deposition was noted in non-obese splenectomized rats. Gotoh *et al.*²¹ have demonstrated that
282 splenectomy elevated lipids deposition in the liver, in special in the presence of a high-fat diet.
283 Moreover, while removal of the spleen intends to alter lipid values, especially with an elevated
284 LDL, splenic auto-transplantation can normalize this lipid alteration⁴⁰. Uptake of circulating lipids
285 into thermogenic adipocytes is necessary for body temperature regulation and whole-body lipid
286 homeostasis⁴¹. Thus, spleen ablation may promote lipids redistribution favoring lipid deposition

287 in BAT.

288 In contrast, the spleen ablation in M-obese increased nuclei number and apparent
289 reduced lipids infiltration at this tissue, suggesting distinct splenic participation in thermogenesis
290 in the obesity. Spleen tyrosine kinase (SYK) is critical for survival, differentiation, and activation
291 of several types of hematopoietic cells being required for β -adrenergic stimulated upregulation
292 of UCP1 in mature brown adipocytes¹⁸. BAT-specific deletion to SKY decreased proliferation
293 and differentiation of brown adipocyte precursors in vitro and prevented normal BAT
294 development¹⁸. M-treated rats have reduced spleen weight and altered the organization of white
295 pulp⁴². Further studies are necessary to evaluate if SKY splenic expression or function are
296 altered in M-treated. VN and spleen interactions are essential to anti-inflammatory vagal reflex
297 and these neuro-immune circuits have been well established to reduce the severity of several
298 immunopathologies, such as diabetes and obesity¹³. In the present work was no confirming
299 interaction effects on BAT histology or lipids deposition, suggesting the VN-spleen axis does not
300 modulate BAT. In contrast, we previously demonstrated that WAT content is modulated by
301 bidirectional interaction between spleen and VN⁴⁰.

302

303 **Conclusion**

304 In the present work, we revealed that VN no modified histology and lipids deposition in
305 BAT from non-obese and M-obese rats at thermoneutrality and normal chow diet. However,
306 while in non-obese the spleen ablation results in high lipids deposition in BAT, in M-obese
307 condition splenectomy improves proliferation and reduces lipids deposition suggesting a distinct
308 role of the spleen in BAT in obesity state.

309

310 **Disclosure**

311 The authors report no conflicts of interest in this work.

312

313 **Authors' contributions**

314 Cassiane Lisbinski Nottar contributed to the conception, analysis, interpretation of data, and
 315 experimental histological procedures. Vanessa Marieli Ceglarek contributed to the conception,
 316 acquisition, statistical analysis, and interpretation of data analysis. Bruna Schumaker Siqueira
 317 contributed to animal care and experimental procedures. Sandra Lucinei Balbo performed the
 318 experiments. Pamela Rufina Stefanello contributed to experimental histological procedures.
 319 Jean Franciesco Vettorazzi contributed to acquisition data. Sabrina Grassioli contributed to the
 320 conception, analysis, interpretation of data, and drafted the manuscript. All authors approved
 321 the version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work in
 322 ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are
 323 appropriately investigated and resolved.

324

325 References

- 326 1. Prado WL do, Lofrano MC, Oyama LM, Dâmaso AR. Obesidade e adipocinas
 327 inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. *Rev Bras Med Esporte*.
 328 2009;15(5):378-383. doi:10.1590/S1517-86922009000600012
- 329 2. Corrêa, Heyn, Magalhaes. The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation
 330 and Cancer Progression. *Cells*. 2019;8(7):662. doi:10.3390/cells8070662
- 331 3. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. [The adipose tissue as a
 332 regulatory center of the metabolism]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;50(2):216-229.
 333 doi:10.1590/s0004-27302006000200008
- 334 4. Mariath AB, Grillo LP, Silva RO da, et al. [Obesity and risk factors for the development
 335 of chronic non-transmissible diseases among consumers in a foodservice unit]. *Cad Saude*
 336 *Publica*. 2007;23(4):897-905. doi:10.1590/s0102-311x2007000400017
- 337 5. Worku MG, Seretew WS, Angaw DA, Tesema GA. Prevalence and Associated Factor
 338 of Brown Adipose Tissue: Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed Res Int*.
 339 2020;2020:9106976. doi:10.1155/2020/9106976
- 340 6. Boschini RP, Garcia Júnior JR. Regulação da expressão gênica das UCP2 e UCP3
 341 pela restrição energética, jejum e exercício físico. *Rev Nutr*. 2005;18(6):753-764.
 342 doi:10.1590/S1415-52732005000600006
- 343 7. Francine Naiara Broetto, Maria do Nascimento Brito. Tecido adiposo marrom e
 344 obesidade em humanos. *Rev Saúde E Pesqui*. 2012;5(1):121-135.
- 345 8. Bolsoni-Lopes A, Alonso-Vale MIC. Lipolysis and lipases in white adipose tissue – An
 346 update. *Arch Endocrinol Metab*. 2015;59(4):335-342. doi:10.1590/2359-3997000000067
- 347 9. Chen L, Deng H, Cui H, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated
 348 diseases in organs. *Oncotarget*. 2018;9(6):7204-7218. doi:10.18632/oncotarget.23208
- 349 10. Porter C. Quantification of UCP1 function in human brown adipose tissue. *Adipocyte*.
 350 2017;6(2):167-174. doi:10.1080/21623945.2017.1319535
- 351 11. Adilson Domingos dos Reis Filho, Roberto Carlos Vieira Junior, Fabrício Azevedo
 352 Voltarelli. Exercício físico, proteína desacopladora-3 e termogênese. *Rev Bras Prescrição E*
 353 *Fisiol Exerc*. 2013;7(38):176-183.
- 354 12. Depieri TZ, Pinto RR, Catarin JK, de Carli MCL, Garcia Júnior JR. [UCP-3: regulation of
 355 genic expression on skeletal muscle and possible role on body weight control]. *Arq Bras*
 356 *Endocrinol Metabol*. 2004;48(3):337-344. doi:10.1590/s0004-27302004000300003
- 357 13. Vijgen GHEJ, Bouvy ND, Leenen L, et al. Vagus nerve stimulation increases energy
 358 expenditure: relation to brown adipose tissue activity. *PLoS One*. 2013;8(10):e77221.

- 359 doi:10.1371/journal.pone.0077221
- 360 14. Székely M. The vagus nerve in thermoregulation and energy metabolism. *Auton*
- 361 *Neurosci Basic Clin.* 2000;85(1-3):26-38. doi:10.1016/S1566-0702(00)00217-4
- 362 15. Mano-Otagiri A, Iwasaki-Sekino A, Nemoto T, et al. Genetic suppression of ghrelin
- 363 receptors activates brown adipocyte function and decreases fat storage in rats. *Regul Pept.*
- 364 2010;160(1-3):81-90. doi:10.1016/j.regpep.2009.11.010
- 365 16. Matteoli G, Gomez-Pinilla PJ, Nemethova A, et al. A distinct vagal anti-inflammatory
- 366 pathway modulates intestinal muscularis resident macrophages independent of the spleen. *Gut.*
- 367 2014;63(6):938-948. doi:10.1136/gutjnl-2013-304676
- 368 17. Tarantino G, Scalera A, Finelli C. Liver-spleen axis: intersection between immunity,
- 369 infections and metabolism. *World J Gastroenterol.* 2013;19(23):3534-3542.
- 370 doi:10.3748/wjg.v19.i23.3534
- 371 18. Knoll M, Winther S, Natarajan A, et al. SYK kinase mediates brown fat differentiation
- 372 and activation. *Nat Commun.* 2017;8(1):2115. doi:10.1038/s41467-017-02162-3
- 373 19. Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with
- 374 monosodium glutamate. *Science.* 1969;164(3880):719-721. doi:10.1126/science.164.3880.719
- 375 20. Balbo SL, Grassioli S, Ribeiro RA, et al. Fat storage is partially dependent on vagal
- 376 activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. *Endocrine.* 2007;31(2):142-148.
- 377 doi:10.1007/s12020-007-0021-z
- 378 21. Gotoh K, Inoue M, Shiraiishi K, et al. Spleen-derived interleukin-10 downregulates the
- 379 severity of high-fat diet-induced non-alcoholic fatty pancreas disease. *PLoS One.*
- 380 2012;7(12):e53154. doi:10.1371/journal.pone.0053154
- 381 22. Konrad S, Farah V, Rodrigues B, et al. Monosodium glutamate neonatal treatment
- 382 induces cardiovascular autonomic function changes in rodents. *Clinics.* 2012;67(10):1209-1214.
- 383 doi:10.6061/clinics/2012(10)14
- 384 23. Voltera AF, Cesaretti MLR, Ginoza M, Kohlmann O. [Effects of neuroendocrine obesity
- 385 induction on systemic hemodynamics and left ventricular function of normotensive rats]. *Arq*
- 386 *Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(1):47-54. doi:10.1590/s0004-27302008000100008
- 387 24. Corder R, Saudan P, Mazlan M, McLean C, Gaillard RC. Depletion of Hypothalamic
- 388 Growth Hormone-Releasing Hormone by Neonatal Monosodium Glutamate Treatment Reveals
- 389 an Inhibitory Effect of Betamethasone on Growth Hormone Secretion in Adult Rats.
- 390 *Neuroendocrinology.* 1990;51(1):85-92. doi:10.1159/000125321
- 391 25. Nishimoto Y, Tamori Y. CIDE Family-Mediated Unique Lipid Droplet Morphology in
- 392 White Adipose Tissue and Brown Adipose Tissue Determines the Adipocyte Energy
- 393 Metabolism. *J Atheroscler Thromb.* 2017;24(10):989-998. doi:10.5551/jat.RV17011
- 394 26. Cypess AM, Kahn CR. The Role and Importance of Brown Adipose Tissue in Energy
- 395 Homeostasis. *Curr Opin Pediatr.* 2010;22(4):478-484. doi:10.1097/MOP.0b013e32833a8d6e
- 396 27. Yoshioka K, Yoshida T, Kondo M. Reduced brown adipose tissue thermogenesis and
- 397 metabolic rate in pre-obese mice treated with monosodium-L-glutamate. *Endocrinol Jpn.*
- 398 1991;38(1):75-79. doi:10.1507/endocrj1954.38.75
- 399 28. Yoshioka K, Yoshida T, Kondo M. Effect of acute cold-exposure on norepinephrine
- 400 turnover and thermogenesis in brown adipose tissue and metabolic rate in MSG-induced obese
- 401 mice. *Jpn J Physiol.* 1989;39(6):957-962. doi:10.2170/jjphysiol.39.957
- 402 29. Saito M, Matsushita M, Yoneshiro T, Okamatsu-Ogura Y. Brown Adipose Tissue, Diet-
- 403 Induced Thermogenesis, and Thermogenic Food Ingredients: From Mice to Men. *Front*
- 404 *Endocrinol.* 2020;11:222. doi:10.3389/fendo.2020.00222
- 405 30. Carpentier AC, Blondin DP, Virtanen KA, Richard D, Haman F, Turcotte ÉE. Brown
- 406 Adipose Tissue Energy Metabolism in Humans. *Front Endocrinol.* 2018;9:447.
- 407 doi:10.3389/fendo.2018.00447
- 408 31. Maliszewska K, Kretowski A. Brown Adipose Tissue and Its Role in Insulin and Glucose
- 409 Homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(4):1530. doi:10.3390/ijms22041530
- 410 32. Chait A, den Hartigh LJ. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic
- 411 Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med.*
- 412 2020;7:22. doi:10.3389/fcvm.2020.00022
- 413 33. Brondani L de A, Assmann TS, Duarte GCK, Gross JL, Canani LH, Crispim D. The role
- 414 of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus.
- 415 *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2012;56(4):215-225. doi:10.1590/S0004-27302012000400001
- 416 34. Kuchler JC, Siqueira BS, Ceglarek VM, et al. The Vagus Nerve and Spleen: Influence

- 417 on White Adipose Mass and Histology of Obese and Non-obese Rats. *Front Physiol.*
418 2021;12:672027. doi:10.3389/fphys.2021.672027
- 419 35. Bartness TJ, Vaughan CH, Song CK. Sympathetic and sensory innervation of brown
420 adipose tissue. *Int J Obes.* 2010;34(S1):S36-S42. doi:10.1038/ijo.2010.182
- 421 36. Madden CJ, Santos da Conceicao EP, Morrison SF. Vagal afferent activation
422 decreases brown adipose tissue (BAT) sympathetic nerve activity and BAT thermogenesis.
423 *Temp Austin Tex.* 2017;4(1):89-96. doi:10.1080/23328940.2016.1257407
- 424 37. Anandhakrishnan A, Korbonits M. Glucagon-like peptide 1 in the pathophysiology and
425 pharmacotherapy of clinical obesity. *World J Diabetes.* 2016;7(20):572-598.
426 doi:10.4239/wjd.v7.i20.572
- 427 38. Hibi M, Oishi S, Matsushita M, et al. Brown adipose tissue is involved in diet-induced
428 thermogenesis and whole-body fat utilization in healthy humans. *Int J Obes* 2005.
429 2016;40(11):1655-1661. doi:10.1038/ijo.2016.124
- 430 39. Mayoral R, Osborn O, McNelis J, et al. Adipocyte SIRT1 knockout promotes PPAR γ
431 activity, adipogenesis and insulin sensitivity in chronic-HFD and obesity. *Mol Metab.*
432 2015;4(5):378-391. doi:10.1016/j.molmet.2015.02.007
- 433 40. Ai XM, Ho LC, Han LL, Lu JJ, Yue X, Yang NY. The role of splenectomy in lipid
434 metabolism and atherosclerosis (AS). *Lipids Health Dis.* 2018;17(1):186. doi:10.1186/s12944-
435 018-0841-2
- 436 41. Wade G, McGahee A, Ntambi JM, Simcox J. Lipid Transport in Brown Adipocyte
437 Thermogenesis. *Front Physiol.* 2021;12:787535. doi:10.3389/fphys.2021.787535
- 438 42. Himel AR, Taylor EB, Phillips CL, et al. Splenectomy fails to attenuate immuno-
439 hematologic changes after rodent vertical sleeve gastrectomy. *Exp Biol Med Maywood NJ.*
440 2019;244(13):1125-1135. doi:10.1177/1535370219857991

Table 1: Biometric, adiposity and metabolic profile of M-obese rats

	CTL-sham	M-sham	p-value
BW (g)	412.7 ± 18.47	291.5 ± 15.95	<0.0001
NAL (cm)	23.25±0.17	19.42±0.33	0.0022#
WAT-R (g)	1.96 ± 0.21	6.05 ± 1.33	0.0111
Glucose (mg/dL)	71.17 ± 3.84	68.50 ± 5.40	0.0708
Insulin (µU/mL)	2.34 ± 0.55	4.50 ± 0.86	0.0305

Notes: Data are mean ± SEM; (n= 6 rats/group). Student's t test. #Mann-whitney.

Abbreviations: BW: body weight; NAL: naso-anal length; WAT-R: white adipose tissue – retroperitoneal.

Table 2: Biometric, adiposity and metabolic profile of non-obese (CTL) rats submitted to VAG and/or SPL surgeries

	CTL-sham	CTL-vag	CTL-spl	CTL-vag+spl	p-value		
					V	S	I
BW (g)	412.7 ±	344.0 ±	386.3 ±	351.3 ±	0.0034	0.1831	0.2783
	18.47 ^b	18.53 ^a	8.07	18.66			
WAT-R (g)	1.96 ±	0.92 ±	1.82 ±	1.49 ±	0.0446	0.4939	0.2798
	0.21	0.23	0.39	0.41			
Glucose (mg/dL)	71.17 ±	65.83 ±	55.17 ±	73.67 ±	0.1731	0.3913	0.0188
	3.84	3.44	3.44 ^d	3.96 ^c			
Insulin (µU/mL)	2.34 ±	4.67 ±	1.49 ±	4.87 ±	0.0089	0.7283	0.5724
	0.55	1.08	0.45	1.30			

Notes: Data are mean ± SEM; (n= 6 rats/group). The p-value column shows the F effect in two-way

Anova. V: vagotomy; S: splenectomy; I: interaction. Letters above of number indicate Tukey post-test (p<0.05). ^aCTL-sham; ^bCTL-vag; ^cCTL-spl; ^dCTL- vag+spl. **Abbreviations:** BW: body weight; WAT-R: white adipose tissue – retroperitoneal.

Table 3: Biometric, adiposity and metabolic profile of M-obese rats submitted to VAG and/or SPL surgeries

	M-sham	M-vag	M-spl	M-vag+spl	p-value		
					V	S	I
BW (g)	291.5 ±	290.7 ±	289.3 ±	285.3 ±	0.8335	0.7445	0.8904
	15.95	7.33	4.84	13.55			
WAT-R (g)	6.05 ±	1.83 ±	2.89 ±	1.97 ±	0.0013	0.0394	0.0256
	1.33 ^{b,c,d}	0.11 ^a	0.25 ^a	0.21 ^a			
Glucose (mg/dL)	68.50 ±	80.50 ±	67.5 ±	70.33 ±	0.0968	0.2044	0.2944
	5.40	3.12	4.30	3.89			
Insulin (μU/mL)	4.50 ±	3.80 ±	5.30 ±	5.26 ± 0.70	0.5667	0.0958	0.6076
	0.86	0.41	0.47				

Notes: Data are mean ± SEM; (n= 6 rats/group). The p-value column shows the F effect in Two-way Anova. V: vagotomy; S: splenectomy; I: interaction. Letters above of number indicate Tukey post-test (p<0.05). ^aM-sham; ^bM-vag; ^cM-spl; ^dM-vag+spl. **Abbreviations:** BW: body weight; WAT-R: white adipose tissue – retroperitoneal.

Figure 1. M-treatment modulates BAT histology.

Data are mean±SEM (n=6 rats for the group). Weight of BAT (Figure 1a); BAT nuclei (Figure 1b) and Brown adipocytes area (Figure 1c). Representative BAT photomicrographs (Figure 1d; CTL and Figure 1e M-obese), HE stained showed in grayscale; 40x (magnification). P values in Student's t test (p<0.05).

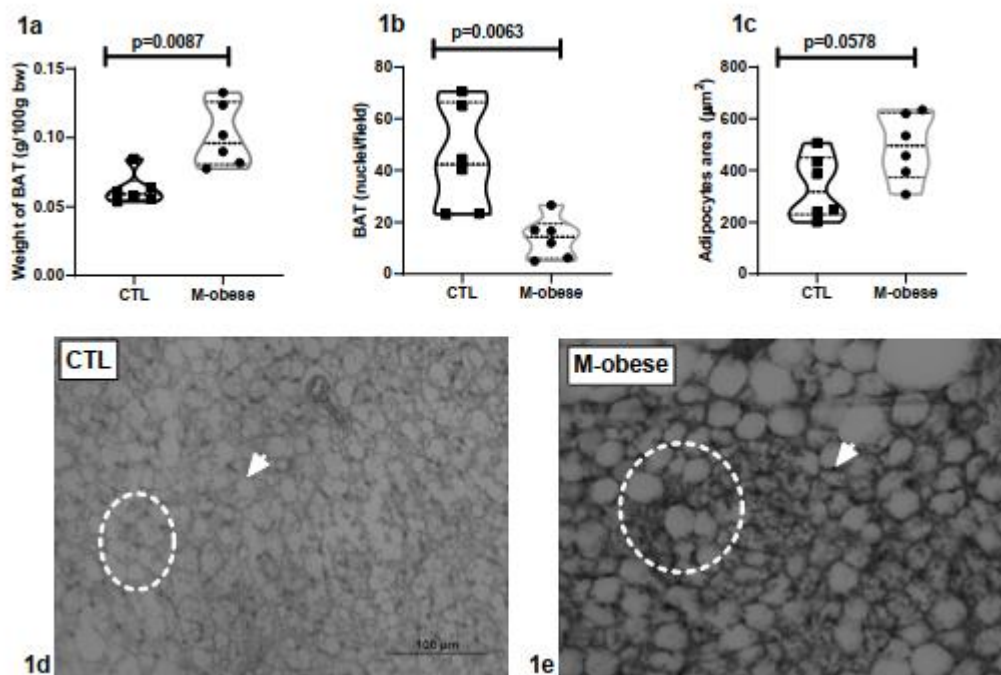
Figure 2. Histological changes induced by vagotomy and splenectomy surgeries in BAT from non-obese rats.

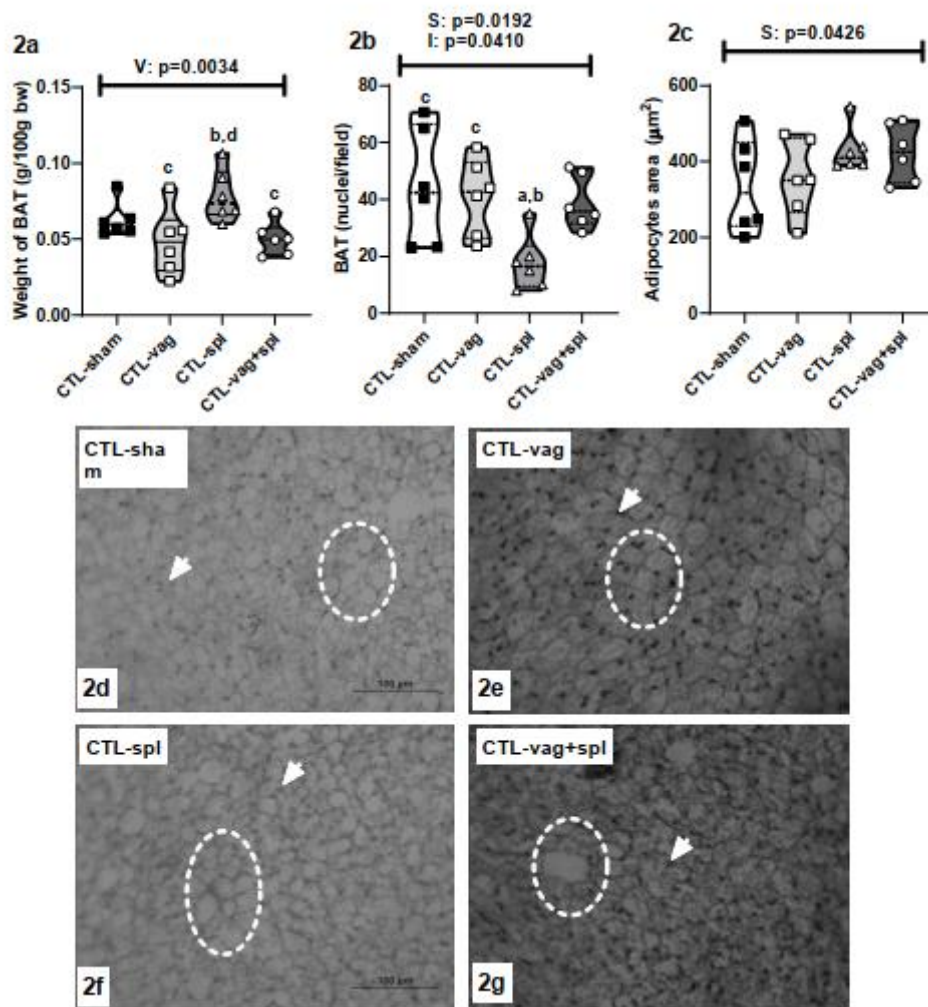
Data are mean±SEM (n=6 rats/group). Weight of BAT (Figure 2a); BAT nuclei (Figure 2b) and Brown adipocytes area (Figure 2c). Representative photomicrography of BAT, HE stained, showed in grayscale, 40x magnification (Figure 2d-g). Arrows indicate nuclei and dashed circle droplet lipids. The capital letter above lines indicates the F effect in the Anova-two way. vag: vagotomy; spl: splenectomy; I: interaction. The letter above the bar showed a significant effect at Tukey-posttest (p<0.05). ^aCTL-sham; ^bCTL-vag; ^cCTL-spl and ^dCTL-vag+spl.

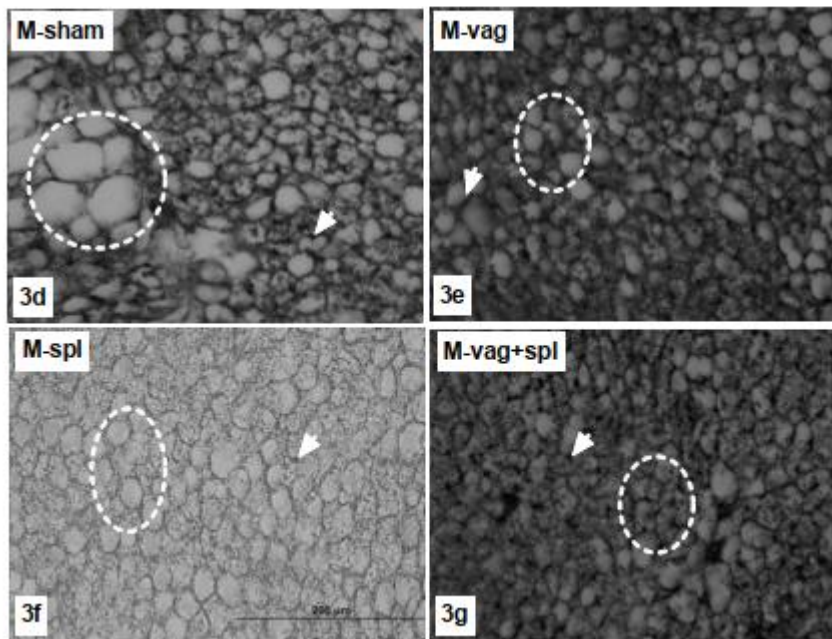
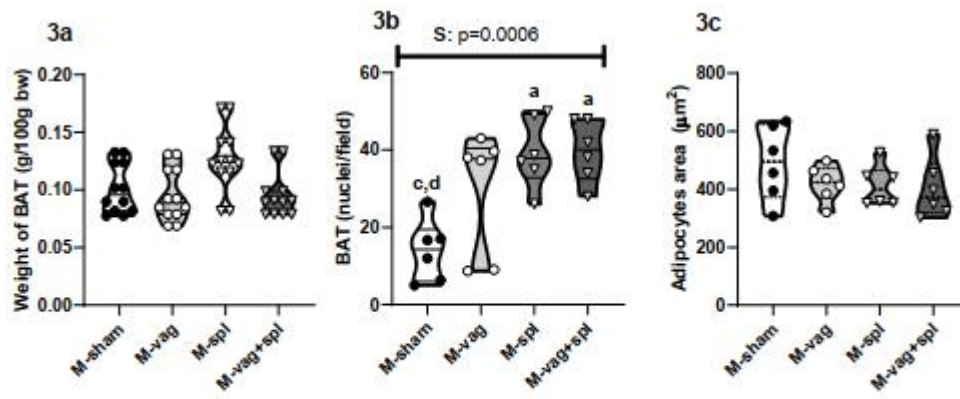
Figure 3. Histological changes induced by vagotomy and splenectomy surgeries in BAT from M-obese rats.

Data are mean \pm SEM (n=6 rats/group). Weight of BAT (Figure 3a); BAT nuclei (Figure 3b) and Brown adipocytes area (Figure 3c). Representative photomicrography of BAT, HE stained, showed in grayscale, 40x magnification (Figure 3d-g). Arrows indicate nuclei and dashed circle droplet lipids. The capital letter above lines indicates the F effect in the Anova-two way. vag: vagotomy; spl: splenectomy; I: interaction. The letter above the bar showed a significant effect at Tukey-posttest ($p < 0.05$). ^aM-sham; ^bM-vag; ^cM-spl and ^dM-vag+spl.

FIGURE







ARTIGO DE REVISÃO

Publicado em:

Acta Elit Salutis- AES – (2021) V.5 (1)

ISSN online 2675-1208 – Revisão Sistemática

TECIDO ADIPOSEO MARROM UM ALIADO NA LUTA CONTRA OBESIDADE

BROWN ADIPOSE TISSUE AN ALLY IN THE FIGHT AGAINST OBESITY

Nottar, CL¹, Trentin, STF², Grassioli, S³, Casaril, KBPB³

Afiliações: 1- Discente do mestrado em Ciências Aplicadas a Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. 2- Docente do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. 3- Docente do Programa de Mestrado em Ciências Aplicadas a Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE.

Endereço do autor de correspondência: Rodovia Vitório Traiano, Km2, Bairro Água Branca, Paraná – PR, CEP: 85.601-970 cassianenottar@outlook.com.br

Resumo

Realizou-se uma revisão sistemática da literatura nacional e internacional sobre a expansão do Tecido Adiposo (TA) sendo fator central na obesidade e suas comorbidades. Há múltiplos subtipos do TA, sendo o Tecido Adiposo Marrom (TAM) importante para o combate a obesidade. Objetivou-se abordar descobertas do TAM e sua importância na queima de gordura e regulação de peso corporal, consequentemente a diminuição de doenças relacionadas a esse distúrbio metabólico. Após delimitação dos critérios de inclusão, exclusão e busca manual nas bases Scielo e PubMed, dez estudos foram selecionados. Os artigos mostram que o TAM, pode ser o principal responsável pela termogênese, processo no qual há queima de lipídios com geração de calor, contribuindo para elevar o gasto energético favorecendo a perda de peso e combate as comorbidades. O TAM pode ser reativado na vida adulta, em particular frente a estímulos simpáticos, como frio e exercício físico. Além disso, a presença de adipócitos intermediários (bege) indica que em adultos, é possível sobre estímulos simpáticos elevar a conversão destes a adipócitos marrom. Dos artigos, grande parte relatam a termogênese como elemento fundamental e

necessário para a perda de peso, norteando a pesquisa científica para a descoberta de novos fármacos que atuam como termogênicos.

Palavras-chave: Obesidade, Mitocôndria, Tecido Adiposo Marrom e Termogênese.

Abstract

The present study carried out a systematic review of the national and international literature on the expansion of adipose tissue (AT), which is a central factor in obesity and its comorbidities. Recently, it has been discovered that there are multiple subtypes of AT, with brown adipose tissue (TAM) being an important target for combating obesity. The present exploratory study of systematic review aims to address findings of TAM and its importance in burning fat and regulating body weight, consequently the reduction of diseases related to this metabolic disorder. After considering the inclusion, exclusion and manual search criteria in the article references, eleven studies were reviewed in the Scielo, PubMed and. The articles show that TAM, may be the main responsible for thermogenesis, a process in which lipids burn with heat generation, contributing to increase energy expenditure, favoring weight loss and combating comorbidities. Interestingly, TAM can be reactivated in adulthood, particularly in the face of sympathetic stimuli, such as cold and physical exercise. In addition, the presence of intermediate adipocytes, called beige adipocytes, indicates that in adults, it is possible on sympathetic stimuli to increase their conversion to brown adipocytes. Of the articles read, most of them report thermogenesis as a fundamental and necessary element for weight loss, guiding scientific research for the discovery of new drugs that act as thermogenic.

Keywords: Obesity, Mitochondria, Adipose Tissue Brown and Thermogenesis

Introdução

Observou-se no Brasil, que o aumento do sobrepeso e da obesidade ocorrem de maneira independente do sexo e da faixa etária, no entanto, há um maior crescimento na população de menor renda familiar ¹. Entre os anos 2003 e 2019, observou-se um aumento de 12,2% para 26,8% de pessoas obesas em idade adulta e 43,3% para 61,7% em excesso de peso¹.

A obesidade ganhou destaque na agenda pública internacional nas três últimas

décadas, caracterizando-se como um evento de proporções globais e de prevalência crescente gerando preocupação aos órgãos de saúde pública².

Um claro exemplo deste impacto, vem sendo a elevada taxa de mortalidade e morbidade observada em obesos contaminados com Sarscov-2².

De acordo com as definições da Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade é considerada uma doença multifatorial complexa caracterizada por distúrbios nutricionais no qual conseqüentemente leva a ocorrência de patologias crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares, hipertensão, acidente vascular cerebral e vários tipos de câncer. Desta forma fatores como o nível de atividade física e a alteração na ingestão calórica são importantes agentes desencadeadores da obesidade³. É uma doença que traz agravantes como o aumento da concentração de lipídios na circulação, e um risco maior de mortalidade e morbidades, trazendo riscos para a saúde em função de dificuldades metabólicas, dentre elas, aumento da pressão arterial, resistência à insulina, níveis de colesterol e triglicerídeos³⁻⁵.

Segundo Fonseca-Alaniz e colaboradores⁶, o tecido adiposo (TA) é o principal reservatório energético do organismo.

Os adipócitos são as únicas células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triacilglicerol (TAG) no citoplasma, sem que prejudique a integridade funcional.

Nos mamíferos, existem dois tipos principais de TA, o Tecido Adiposo Branco (TAB) e o Tecido Adiposo Marrom (TAM). O adipócito branco maduro armazena o TAG em uma única e grande gota lipídica que ocupa de 85-90% do citoplasma e empurra o núcleo e uma fina camada de citosol para a periferia da célula e o TAM é composto por adipócitos com inúmeras mitocôndrias e por inúmeras gotículas de gordura sendo inervado pelo sistema nervoso simpático (SNS). O TAM é encontrado

em recém natos, roedores e mamíferos hibernantes, e é o principal local da termogênese adaptativa, onde ocorre o gasto de energia e produção de calor⁷. Adicionalmente, a descoberta recente de adipócitos denominados de Bege, com características intermediárias entre o TAB e TAM, e sua possível conversão para adipócitos marrom, favorecendo o gasto energético e a perda de peso, resgataram o interesse na termogênese como estratégia no combate a obesidade. Esse tecido possui grande versatilidade, podendo sair de sua forma de TAB para TAM ou bege num processo chamado de Brite (também conhecido como tecido adiposo marrom induzível), mas também pode voltar para seu estado inicial dependendo do estímulo. Essa versatilidade do tecido adiposo é considerada uma alternativa para a ciência médica e indústria farmacêutica na busca de novos fármacos⁸.

Em 2010 um estudo de Langin⁹, apontou que o TAM pode ajudar no controle da obesidade, pois ele aumenta a eficácia metabólica justamente por ser um tecido especializado na termogênese, a qual é induzida pela exposição ao frio, exercícios físicos ou a bioativos da dieta.

Inicialmente, acreditava-se que a TAM era encontrada apenas em pequenos mamíferos, animais em hibernação e recém-nascidos. No entanto, pesquisas recentes mostraram que esse tecido funcional está presente em adultos em locais limitados, como a região interescapular e pescoço⁸. Neste sentido, pessoas adultas expostas a condição de estímulo simpático crônico, como baixas temperaturas, apresentam aumento da massa do TAM, favorecendo a redução do peso. Contudo, interessante o processo de reativação do TAM parece estar prejudicado em obesos.

O TAM, presente exclusivamente em mamíferos, tem como função principal a termorregulação via termogênese sem tremores. A termogênese ocorre devido a uma

única e específica proteína, chamada UCP-1 do inglês uncoupling protein 1, esta proteína desacopla a produção de energia na forma de ATP na mitocôndria, desviando o gradiente de prótons e gerando calor. Portanto, a UCP-1 é a proteína que promove o vazamento de prótons, dissipando seu gradiente eletroquímico e liberando a energia na forma de calor. Este processo é regulado pela norepinefrina liberada pelos terminais do sistema nervoso central e via ativação de receptores beta adrenérgicos⁷.

Estudos relatam que a termogênese adaptativa é o caminho para a perda de peso, pensando nisso foram propostos alguns testes de ativação do TAM, como a exposição ao frio, dieta e regulação de alguns hormônios como os tireoidianos. A partir desses fatores foi possível o escurecimento do TAM, os adipócitos bege “brite”, com capacidade de realizar termogênese¹⁰.

Levando em conta essa resposta adaptativa do TAM, o estudo de Marlatt e Ravussin¹⁰, demonstrou um retardo no crescimento da placa aterosclerótica com apenas 8 semanas de exposição ao frio. No entanto, isso pode ter sido o resultado de uma exposição rápida em vez de uma aclimação gradual. Essa exposição ao frio resultou numa alta expressão de UCP1, aumento do consumo de energia e diminuição de triglicérido.

Intervenções farmacológicas já existem para ativar a TAM e entre esses agentes estão os agonistas do adrenoreceptor β_3 , os quais são bem conhecidos por induzir a expressão da UCP1 e termogênese *in vivo* em roedores e *in vitro* em adipócitos marrons isolados.

Dessa forma a presente revisão tem como principal objetivo relatar as novas descobertas sobre o TAM enfatizando o aumento da UCP1 e conseqüentemente o aumento da termogênese como caminho para a perda de peso e diminuição da obesidade.

Métodos

Trata-se de uma Revisão Sistemática de Literatura, que sumariza os resultados de outros trabalhos científicos, possibilitando usar os dados para uma conclusão geral sobre o problema apresentado. A busca ocorreu no mês de maio de 2021, nos bancos de dados eletrônicos Pubmed, a base de dados eletrônica e Scientific Electronic Library Online (SciELO), com a seguinte estratégia de pesquisa no Pubmed: (((Adipose Tissue)) AND (AND (Brown))) AND (thermogenesis); no SciELO: (adipose tissue) AND (brown) AND (thermogenesis).

Os critérios de inclusão foram os textos disponíveis em inglês e português, publicados entre 2011 e 2021, realizados com seres humanos e animais sobre obesidade, tecido adiposo marrom e termogênese. Foram excluídos os estudos que não abordavam o tema, relacionado com a condição de peso do indivíduo com tecido adiposo marrom, textos incompletos e que não estivessem integralmente disponíveis na busca on-line. Os artigos duplicados foram contados somente uma vez.

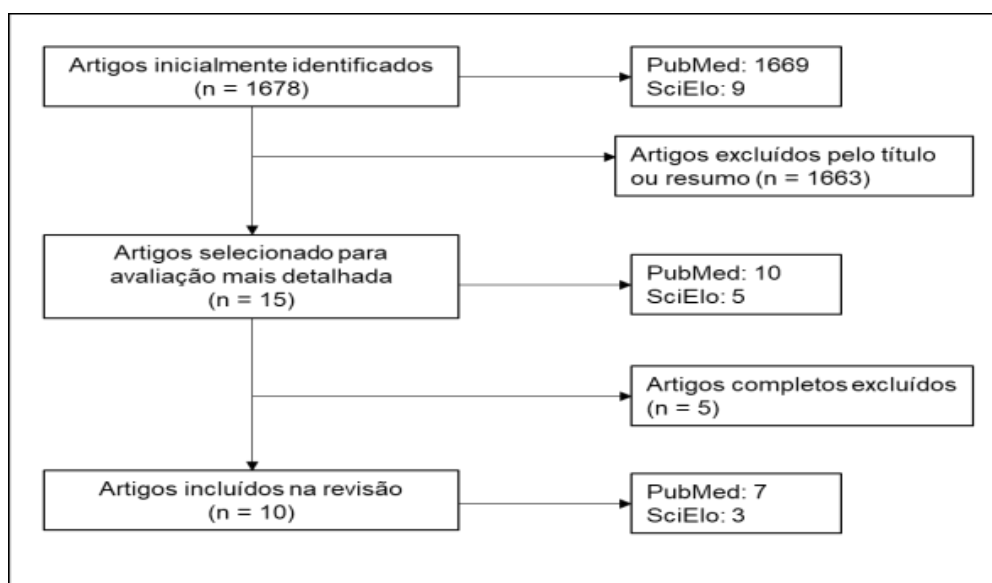


Figura 1 - Diagrama de fluxo da literatura pesquisada

Resultados

A busca realizada encontrou 1669 artigos no PubMed e nove na base Scielo. Os trabalhos em duplicata foram descartados e após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, 10 foram selecionados para leitura na íntegra e não foram excluídos artigos de revisão.

Com o aumento das doenças relacionadas ao acúmulo de gordura no organismo, é importante ressaltar a capacidade formidável do TAM para o gasto de energia. Seu papel no metabolismo dos ácidos graxos e da glicose é indispensável para a perda de peso, dessa forma considera-se um potencial terapêutico promissor para combater a obesidade¹¹.

Tabela 1 – Caracterização geral dos artigos selecionados

Título do estudo	Autor	Período de publicação/ano	Tipo de estudo/metodologia	População do estudo	Principais resultados
FGF6 and FGF9 regulate UCP1 expression independent of brown adipogenesis	SHAMSI et al.	Nature Communications / 2020	Estudo experimental	Ratos C57Bl / 6J (stock n.º000664) foram adquiridos no The Jackson Laboratory.	A perda de FGF9 prejudica a termogênese TAM. A administração in vivo de FGF9 aumenta a expressão de UCP1 e a capacidade termogênica.
Origins and early development of the concept that brown adipose tissue thermogenesis is linked to energy balance and obesity	TRAYHURN, PAUL	Biochimie / 2017	Estudo de análise histórica	Ratos e humanos	Em cada caso, os índices de atividade e capacidade BAT (conteúdo mitocondrial, ligação do PIB, quantidade de UCP1) indicou que o tecido desempenha um papel na DIT e que a obesidade é caracterizada por termogênese reduzida.

Brown adipose Tissue, Whole-Body Energy Expenditure, and Thermogenesis in Healthy Adult Men	YONES HIRO et al.	Obesity / 2011	Ensaio clínico	Humanos	Uma correlação positiva ($P < 0,05$) foi encontrada entre o aumento induzido pelo frio no gasto de energia e a atividade BAT quantificada a partir da captação de FDG.
New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond	CHOUCHANI et al.	Cell Metabolism / 2019	Estudo de revisão	Humanos e ratos	Os adipócitos termogênicos impulsionam a produção de calor por meio da coordenação estreita do suprimento de substrato com o maquinário oxidativo mitocondrial e os efetores que controlam a taxa de oxidação do substrato.
Brown adipose tissue: what have we learned since its recent identification in human adults	HALPERN, MANCINI, HALPERN	Arq Bras Endocrinol Metab/2014	Estudo de Revisão		A identificação do tecido adiposo marrom em adultos com o desenvolvimento e uso da tomografia de emissão de pósitron marcado com 18-fluorodesoxiglicose (PET-FDG) gerou questões sobre sua real importância para nosso metabolismo.
The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer	CORRÊA LH. et al.	Cells/ 2019	Estudo de revisão	Animais e humanos	Alterações na secreção de citocinas e adipocinas pelos adipócitos no órgão adiposo podem influenciar a resposta do sistema imunológico, que está relacionada a

Progression						um pior prognóstico no desenvolvimento do câncer. Aumentar o TAM seria uma forma de diminuir essas comorbidades.
Challenges in obesity research	PALOU	Nutr. Hosp /2013	Estudo de revisão	Humanos		O desenvolvimento de tecnologias de imagem em relação à fome, saciedade, referências alimentares, percepção do sabor e a produção de calor aplicável a estudos humanos também é visto como um desafio na pesquisa da obesidade, bem como o desenvolvimento de novos métodos não invasivos ou microinvasivos técnicas para análise de composição de tecido e o fornecimento de biópsias de tecido para estudos ômicos.
The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus	BRONDI, L.A., et al.	Arq Bras Endocrinol Metab/2012	Estudo de revisão	Humanos		De fato, vários estudos relataram que os polimorfismos -3826A/G, -1766A/G e -112A/C na região do promotor, Ala64Thr no exon 2 e Met299Leu no exon 5 do gene UCP1 estão possivelmente associados à obesidade e / ou DM2.
Quantification of UCP1 function in	PORTER C.	Adipocyte /2017	Estudo de revisão	Humanos e animais		Utilizando esta abordagem, dados recentes demonstraram que

human brown adipose tissue					as mitocôndrias BAT supraclaviculares humanas têm UCP1 funcional, e que a função UCP1 em humanos e roedores BAT são comparáveis.
The role of autophagy in brown and beige adipose tissue plasticity	CAIRÓ M, VILLARR OYA J.	J Physiol Biochem /2020	Estudo de revisão	Humanos e animal	A degradação autofágica das mitocôndrias parece ser importante para a inativação da gordura marrom e a transição do tecido adiposo bege para branco. Além disso, a desregulação autofágica do tecido adiposo tem sido associada à obesidade.

A má alimentação e o sedentarismo geram vários problemas de saúde, quando relacionados com a obesidade, sobrecarga de TAB, principalmente nas vísceras e associado a complicações metabólicas e a problemas cardiovasculares. A obesidade pode levar ao desenvolvimento de resistência à insulina, que é fator do diabetes mellitus II e está totalmente ligado a riscos de problemas cardiovasculares. O tecido adiposo armazena um número grande de condições que estão envolvidas na modulação da resistência à insulina como a leptina e adiponectina, secretados pelos adipócitos¹².

Na revisão de Cairó e Villarroya¹³ os autores descrevem que a gordura marrom ou bege ativa, aumenta o gasto energético e está associada à redução da hiperglicemia e hiperlipidemia, enquanto sua atrofia e inativação têm sido associadas à obesidade e ao envelhecimento, sendo de extrema importância manter esse tecido metabolicamente ativo.

O TAM foi há muito tempo considerado ausente ou insignificante, mas estudos recentes usando emissão de pósitron-fluorodeoxiglicos em combinação com

tomografia computadorizada onde demonstrou a existência de TAM metabolicamente ativo em humanos adultos saudáveis¹⁴. Yoneshiro e colaboradores¹⁵ que analisaram as diferenças entre indivíduos TAMpositivos e TAM-negativos, relatou que TAM-sujeitos positivos não ganharam peso com a idade por outro lado TAM-negativos, como é em humanos, aumentou o IMC, a gordura corporal total massa e massa de gordura abdominal, apoiando a noção que o tecido adiposo marrom ajuda a proteger contra o peso ganho e o desenvolvimento da obesidade.

É importante ressaltar também que o papel dos hormônios na remodelação do TAM é de extrema importância tanto nas vias parácrinas quanto nas autócrinas. Entre esses hormônios esta as catecolaminas, os hormônios tiroidianos que regulam o processo de escurecimento aumentando a termogênese levando ao emagrecimento. Hormônios peptídicos, como o fator de crescimento de fibroblasto 21 (FGF21), são amplamente produzidos em temperaturas mais baixas e podem se ligar ao receptor β 3adrenérgico, induzindo o fenótipo de adipócito marrom no TAB, ou seja, o processo de escurecimento do tecido adiposo branco se inicia com a ativação simpática e liberação de norepinefrina que atuará pela ligação aos receptores β -3 adrenérgicos no tecido adiposo⁸.

Discussão

A obesidade no Brasil e no mundo vem sendo um fator de preocupação pública, estando associada a inúmeras comorbidades. Nos artigos avaliados o TAM é considerado uma expectativa para a medicina no combate dessas doenças relacionadas ao aumento do tecido adiposo. O TAM é composto por inúmeras mitocôndrias capazes de fazer termogêneses. Associado a TAM temos o SNC,

hormônios e fatores externos como o frio. Esses fatores auxiliam na estimulação da TAM para a queima de gordura.

Além da exposição ao frio, estímulo dos receptores β 3-adrenérgico, atividade física e alimentação. Esses hormônios são produzidos em resposta para ativar o receptor β 3adrenérgico, promover o escurecimento do tecido adiposo e ativar o mecanismo de termogênese através da UCP1⁸.

Estudos revelam que a estimulação externa do TAM mostra a capacidade termogênica dessas células, tanto em cultura quanto in vivo. Um estudo experimental em mamíferos e humanos mostrou que o frio ambiental foi um gatilho poderoso para o aumento da termogêneses¹⁶.

Muitos estudos baseados no uso de drogas falam que ativar o receptor β 3 adrenérgico no sistema nervoso simpático era o principal trigger de ativação e indução da UCP1. A UCP1 também foi expressa ectopicamente no esqueleto, músculos de camundongos, e esses animais mostraram melhora na tolerância à glicose após serem alimentados com uma dieta rica em gorduras, quando em comparação com camundongos do tipo selvagem¹⁷.

Além da expressão estabelecida de UCP1 induzida por β 3-adrenérgicos em adipócitos castanhos maduros ou bege/brite, achados revelam uma via não canônica para a regulação da expressão de UCP1 em progenitores adiposos¹¹.

A UCP1 foi logo identificada e isolada do tecido adiposo humano e anticorpos produzidos contra ele para fornecer uma ferramenta para a exploração subsequente da extensão em que a TAM está presente em humanos adultos¹⁸.

Shamsi e colaboradores¹¹ descobriram duas adipocinas que regulam a expressão de UCP1 nos adipócitos de camundongos e humano, chamadas de FGF6 e FGF9. No entanto, a regulação coordenada de ligantes FGF, receptores e

transcrição downstream por exposição ao frio no tecido adiposo de camundongo e a forte associação entre a expressão de FGF9/FGFR3 e UCP1 na gordura do pescoço humano destacam um papel significativo dessas adipocinas nas vias da termorregulação e potencialmente, na homeostase energética em roedores e humanos.

Em estudo realizado por Porter¹⁹, as mitocôndrias do TAM não são convencionais, pois não produzem ATP em grande quantidade. Portanto, os ensaios desenvolvidos para determinar a função bioenergética em mitocôndrias acopladas podem não ser particularmente úteis ao avaliar a função das mitocôndrias no TAM.

Boon e Lichtenbelt²⁰ pesquisaram roedores e esclareceram que o tecido responsável pela NST (termogênese sem tremor) é o TAB, que a queima dos ácidos graxos em direção ao calor em um processo chamado desacoplamento mitocondrial, onde a UCP1 desacopla o transporte de elétrons em cadeia, causa um aumento do vazamento de prótons sobre a membrana interna mitocondrial. Isso resulta na produção de energia térmica extra ao invés de ATP.

Conclusão

O aumento do sobrepeso e da obesidade ocorre de maneira independente do sexo e da faixa etária sendo associado a várias patologias como Diabetes Mellitus, doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias entre outras complicações metabólicas.

Atualmente, estudos recentes têm buscado direcionar receptores de adipócitos

brancos capazes de induzir o processo de escurecimento dessas células, dando origem ao tecido marrom com potencial de realizar a queima de gordura através da produção de calor e gasto de ATP, reduzindo assim o acúmulo excessivo de gordura a fim de promover a homeostase metabólica e diminuir o índice de doenças e comorbidades relacionadas a obesidade.

Depreende-se também que os hormônios na remodelação do TAM são de extrema importância tanto nas vias parácrinas quanto nas autócrinas. Além da exposição ao frio, estímulo dos receptores β 3-adrenérgico, atividade física e alimentação. Esses hormônios são produzidos em resposta para ativar o receptor β 3adrenérgico, promover o escurecimento do tecido adiposo e ativar o mecanismo de termogênese através da UCP1.

Existem pesquisas de cunho terapêutico que permitem a expressão de UCP-1 em células do tecido bege, aumentando o gasto de energia, o que parece ser uma excelente escolha de tratamento. Essas características do tecido adiposo vêm sendo alvo de pesquisa, pois suas células têm capacidade de remodelação podendo ser uma alternativa para o tratamento da obesidade.

Referências

1. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa nacional de saúde : 2019 : atenção primária à saúde e informações antropométricas. IBGE. Rio de Janeiro; 2020. 66 p.
2. Dias PC, Henriques P, Dos Anjos LA, Burlandy L. Obesity and public policies: The Brazilian government's definitions and strategies. *Cad Saude Publica* [Internet]. 2 de agosto de 2017 [citado 17 de abril de 2021];33(7). Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2017000705001&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
3. Broetto FN, Brito M do N. TECIDO ADIPOSEO MARROM E OBESIDADE EM HUMANOS. *Rev Saúde e Pesqui* [Internet]. 2012 [citado 3 de abril de 2021];5(1):121–35. Available at: <https://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/saudpesq/article/view/2083/1571>

4. Brasil. Ministério da Saúde Secretaria de Atenção à Saúde Departamento de Atenção Básica B. Atenção Básica Cadernos de Estratégias Para o Cuidado da Pessoa Com Doença Crônica Obesidade [Internet]. 2014 [citado 3 de abril de 2021]. Available at: <http://editora.saude.gov.br>
5. Pereira LO, Francischi RP de, Lancha Jr. AH. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metabol* [Internet]. abril de 2003 [citado 3 de abril de 2021];47(2):111–27. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S00042730200300020003&lng=pt&tlng=pt
6. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice O tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83(5):192–203.
7. Halpern B, Mancini MC, Halpern A. Brown adipose tissue: What have we learned since its recent identification in human adults [Internet]. Vol. 58, *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia; 2014 [citado 17 de abril de 2021]. p. 889–99. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302014000900889&lng=en&nrm=iso&tlng=en
8. Corrêa LH, Heyn GS, Magalhaes KG. The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. *Cells* [Internet]. 30 de junho de 2019 [citado 17 de abril de 2021];8(7):662. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31262098/>
9. Langin D. Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: Strategies to fight the metabolic complications of obesity? Vol. 1801, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. Elsevier; 2010. p. 372–6.
9. Marlatt KL, Ravussin E. Brown Adipose Tissue: An Update on Recent Findings. *Curr Obes Rep*. 2017;6:389–396.
10. Shamsi F, Xue R, Huang TL, Lundh M, Liu Y, Leiria LO, et al. ARTICLE FGF6 and FGF9 regulate UCP1 expression independent of brown adipogenesis. *Nat Communications* [Internet]. 2020 [citado 11 de maio de 2021];11:1421. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15055-9>
11. Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: Many choices on the menu [Internet]. Vol. 21, *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2007 [citado 20 de maio de 2021]. p. 1443–55. Available at: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1550907>.
12. Cairó M, Villarroya J. The role of autophagy in brown and beige adipose tissue plasticity [Internet]. Vol. 76, *Journal of Physiology and Biochemistry*. Springer; 2020 [citado 23 de maio de 2021]. p. 213–26. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31811543/>

13. Palou A, Bonet ML. Challenges in obesity research. *Nutr Hosp* [Internet]. 2013 [citado 23 de maio de 2021];28(5):144–53. Available at: <http://www.>
14. Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, et al. Brown Adipose Tissue, Whole-Body Energy Expenditure, and Thermogenesis in Healthy Adult Men. 2011 [citado 20 de maio de 2021]; Available at: www.obesityjournal.org
15. Chouchani ET, Kazak L, Spiegelman BM. New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond [Internet]. Vol. 29, *Cell Metabolism*. Cell Press; 2019 [citado 20 de maio de 2021]. p. 27–37. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30503034/>
16. Brondani L de A, Assmann TS, Duarte GCK, Gross JL, Canani LH, Crispim D. The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus Papel da proteína desacopladora 1 (UCP1) no desenvolvimento da obesidade e do diabetes melito tipo 2. Vol. 56, *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2012.
17. Trayhurn P. Origins and early development of the concept that brown adipose tissue thermogenesis is linked to energy balance and obesity. Vol. 134, *Biochimie*. Elsevier B.V.; 2017. p. 62–70.
18. Porter C. Quantification of UCP1 function in human brown adipose tissue [Internet]. Vol. 6, *Adipocyte*. Taylor and Francis Inc.; 2017 [citado 23 de maio de 2021]. p. 167–74. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28453364/>
19. Boon MR, Lichtenbelt WD van M. Brown adipose tissue: A human perspective. In:
20. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer New York LLC; 2016. p. 301–19.

Reservado aos Editores

Data de submissão: _02/07/2021

Data de aprovação: 13/12/2021

ANEXOS

ANEXO A: Coloração HE

Coloração HE:

- Xilol I-----5
minutos
- Xilol II (hidratação) -----5
minutos
- Xilol III (hidratação) -----5
minutos
- Álcool 100% (hidratação) -----2
minutos
- Álcool 90% (hidratação) -----2
minutos
- Álcool 80% (hidratação)-----2
minutos
- Álcool 70% (hidratação) ----- 2
minutos
- Água corrente(hidratação)----- -5
minutos
- Água deionizada 2X (lavagem) ----- 3
minutos
- Hematoxilina (coloração) ----- -- 7
minutos
- Eosina ----- 5
minutos
- Água corrente -----3
minutos
- Álcool 70% ----- 3
minutos

- Álcool 80%----- 5 minutos
- Álcool 90%----- 2 minutos
- Álcool 100% I ----- 2 minutos
- Álcool 100% II ----- 2 minutos
- Álcool 100% III -----2 minutos
- Xilol I ----- 5 minutos
- Xilol II ----- 10 minutos
- Xilol III ----- 10 minutos

ANEXO B: Submissão a revista com resposta via e-mail

Manuscript Status (1)

In Progress ▼

[Guide to submission status indicators](#)

Manuscript:	Vagus nerve and spleen: impact in brown adipose tissue histology and lipids deposition in obese and non-obese rats
Journal:	Clinical and Experimental Gastroenterology
Sub ID:	363969
Submit Date:	25/Feb/2022
Status:	1DA - WAITING FOR THIRD PARTY BILLING INFORMATION
Status Last Updated:	25/Feb/2022

[Conflict of interest disclosure form](#)

Article Title: Vagus nerve and spleen: impact in brown adipose tissue histology and lipids deposition in obese and non-obese rats
Submission ID: 363969
Journal: Clinical and Experimental Gastroenterology
Final price: USD 2320

You provided the contact details of Sabrina Grassioli who would pay the Open Access Article Publishing Charge (APC) for your manuscript if it is accepted. We have contacted Sabrina Grassioli to request their funding approval. Please note that your manuscript will not begin the peer review process until they approve this request. We will let you know when they approve the funding request or will contact you to request alternative payment details if they decline.

If you have any questions, please do not hesitate to contact us.

Kind regards,

Mrs Vivienne Gee

Dove Medical Press

<https://nam12.safelinks.protection.outlook.com/?url=http%3A%2F%2Fwww.dovepress.com%2F&data=04%7C01%7C%7C19050a3893a4cb364d408d9f7b0e1d1%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C637813161335181554%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWljoIMC4wLjAwMDAiLCJQIjoiV2luMzliLCJBTiI6IjEhaWwiLCJXVC16Mn0%3D%7C3000&data=sb6W4azM1U4jJwbL5jfXszwLPasK3rNyM7z0BpKsJEo%3D&reserved=0> - open access to scientific and medical research

Dove Medical Press is part of Taylor & Francis Group, the Academic Publishing Division of Informa PLC
(ID 363969)

ANEXO C: Autorização do 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