

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

THAINAN AMADEU DE SOUZA

**Efeitos da ausência do baço sobre a homeostase glicêmica de ratos machos
Wistar obesos e não obesos.**

CASCADEL-PR

Junho/2020

THAINAN AMADEU DE SOUZA

**Efeitos da ausência do baço sobre a homeostase glicêmica de ratos machos
Wistar obesos e não obesos.**

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

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

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Sabrina Grassioli

COORIENTADOR: Prof. Dr. Tarcísio V. Lordani

CASCADEL-PR

Junho/2020

FICHA CATALOGRÁFICA

de Souza, Thainan Amadeu

Efeitos da ausência do baço sobre a homeostase glicêmica de ratos machos Wistar obesos e não obesos. / Thainan Amadeu de Souza; orientador(a), Sabrina Grassioli; coorientador(a), Tarcísio Vitor Lordani, 2020.

73 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, 2020.

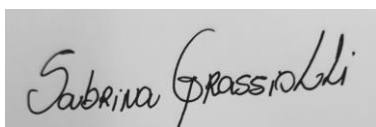
1. Glicemia. 2. Resistência à Insulina. 3. Obesidade. 4. Baço. I. Grassioli, Sabrina . II. Lordani, Tarcísio Vitor. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

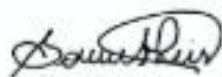
THAINAN AMADEU DE SOUZA

**Efeitos da ausência do baço sobre a homeostase glicêmica de ratos machos
Wistar obesos e não obesos.**

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



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



Prof. Dr. (a) Solange de Fátima Reis Conterno
UNIOESTE



Prof. Dr. (a) Carla Cristine Kanunfre
UEPG

CASCADEL-PR

Junho/2020

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus filhos Benjamin e Lizye. Que a busca por conhecimento se mova em vocês incessantemente, pois como diz Paulo Beleki: “As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos.”

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu criador, essência da minha existência. Seu folego de vida em mim foi meu sustendo e me dá coragem para construir uma nova realidade.

À minha família, por sua capacidade de acreditar, persistir e investir em mim. Pelo apoio e compreensão. Mãe, seu cuidado e dedicação sempre me trouxe esperança para prosseguir. Pai, sua presença me traz segurança e apoio para continuar nesta caminhada.

Ao meu esposo, cuja dedicação e preocupação com à nossa família me trouxeram paz e alegria para seguir no caminho que desejava. Também a minha sogra, que com seu apoio, cuidado e carinho esteve sempre disposta a me estender a mão.

À comunidade da Igreja Batista Betel, pois foi nesse meio que aprendi o valor da minha fé. Foi aqui onde aprendi a refletir e duvidar e nunca encarar a realidade como pronta, aqui aprendi a ver a vida de um jeito diferente.

À minha professora e orientadora que me acompanhou desde a graduação, pela paciência e persistência em dividir comigo seu conhecimento e paixão pelo que faz, tornando-se assim um dos meus maiores exemplos. Seu incentivo tornou possível a finalização deste projeto.

Aos meus amigos, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhas. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção melhora tudo o que tenho produzido na vida.

Aos colegas que me acompanharam durante esses dois anos e que foram tão importantes nesta etapa e marcarão minha vida para todo o sempre e a todos aqueles que, de alguma forma, estiveram e estão próximos de mim fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

Finalmente, aos meus colegas do LAFEM que me ensinaram e me inspiraram com sua dedicação e amor pela ciência. Obrigada pelo carinho. A experiência de uma produção compartilhada, na comunhão com amigos nesse espaço, foram a melhor experiência da minha formação.

RESUMO

DE SOUZA, T. A. **Efeitos da ausência do baço sobre a homeostase glicêmica de ratos machos Wistar obesos e não obesos.** 73 páginas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2020.

A obesidade é caracterizada pelo excesso de tecido adiposo branco (TAB) o qual promove inflamação crônica de nível baixo que está intimamente relacionada a intolerância à glicose e resistência à insulina (RI). O baço, por ações imunológicas parece influenciar a homeostase glicêmica, modificando o pâncreas endócrino e sensibilidade à insulina. O presente estudo avaliou o efeito da retirada do baço sobre a homeostase glicêmica em ratos Wistar machos não obesos e obesos. A obesidade hipotalâmica foi induzida pela administração subcutânea de glutamato monossódico (MSG; 4g/Kg) nos cinco primeiros dias de vida. No mesmo período animais Controles (CON) receberam solução salina equimolar. Ratos MSG e CON foram randomicamente distribuídos em subgrupos, separados conforme fase da esplenectomia (ESP), que ocorreu aos 21 ou 60 dias de vida formando os grupos CON-ESP₂₁; CON-ESP₆₀; MSG-ESP₂₁ e MSG-ESP₆₀ (n=14 ratos/grupo). Animais Falso-Operados (FO) serviram como controles cirúrgicos (CON_FO e MSG-FO). A ingesta alimentar e o peso corporal foram acompanhados dos 70-90 dias de vida, sendo calculado a eficiência alimentar. Aos 90 dias, os ratos foram submetidos ao teste intravenoso de tolerância a glicose (ivGTT; 1g/Kg) e o Insulinogênico (IIns), uma medida de RI. Na eutanásia (90 dias) foram avaliados peso corporal, os depósitos de TAB, Inguinal (TAB-I) e Retroperitoneal (TAB-R) e as ilhotas pancreáticas isoladas para estudo da secreção de insulina induzida por glicose (SIIG) e expressão dos transportadores de Glicose do subtipo 2 (GLUT-2) e Glucoquinase (GCK). Ratos MSG apresentaram menor peso corporal e crescimento além de maior adiposidade, acompanhado de dislipidemia, intolerância à glicose e RI em relação aos ratos CON. Apesar do maior consumo alimentar no grupo CON-ESP₂₁, o ganho de peso corporal dos animais CON-ESP₂₁ e CON-ESP₆₀ foi significativamente menor comparados aos animais CON-FO, resultando em menor eficiência alimentar. A tolerância a glicose foi menor nos ratos CON-ESP₂₁ em relação aos animais CON-FO e CON-ESP₆₀, sem mudar a RI; insulinemia ou SIIG. Porém, o colesterol total foi reduzido no grupo CON-ESP₂₁ comparado aos animais CON-FO. O MSG-ESP₂₁ apresentou maior ganho de peso enquanto animais MSG-ESP₆₀ apresentaram queda no ganho de peso em relação aos ratos FO. Independente da fase da vida a esplenectomia reduziu a insulina durante o ivGTT nos animais MSG, mas apenas aos 21 dias houve queda da glicemia, enquanto MSG-ESP₆₀ apresentaram maior sensibilidade a insulina em relação ao grupo MSG-FO. Adicionalmente, a SIIG foi significativamente menor em ilhotas de ratos MSG-ESP₂₁ comparados às ilhotas dos ratos MSG-FO e houve aumento da expressão de GCK em ilhotas do grupo MSG-ESP₆₀ quando comparado ao grupo MSG-FO e MSG-ESP₂₁, porém não

modificou a expressão de GLUT-2. Concluindo, a esplenectomia reduz o peso corporal de ratos não obesos, apesar da hiperfagia, sugerindo gasto energético elevado. Porém, nesses animais, a ausência do baço exerceu apenas leve impacto na homeostase glicêmica. Por outro lado, em condições de obesidade induzida por MSG, a retirada do baço corrigiu a tolerância à glicose e reduziu a secreção de insulina, melhorando a sensibilidade à insulina, indicando que o baço influencia a homeostase da glicose em condições de obesidade.

Palavras – chaves: Obesidade. Insulina. Glicose. Baço. Ilhotas pancreáticas.

ABSTRACT

DE SOUZA, T. A. **Splenic participation in glycemc homeostasis in obese and non-obese male rats.** 73 páginas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2020.

Obesity is characterized by an excess of white adipose tissue (WAT) which promotes low-level chronic inflammation, closely related to glucose intolerance and insulin resistance (IR). The spleen, due to immunological actions, seems to influence glycemc homeostasis, modifying the endocrine pancreas and insulin sensitivity. The present study evaluated the effect of spleen removal on glycemc homeostasis in non-obese and obese male Wistar rats. Hypothalamic obesity was induced by subcutaneous administration of monosodium glutamate (MSG; 4g / kg) in the first five days of life. In the same period, Control animals (CON) received equimolar saline. MSG and CON rats were randomly divided into subgroups, separated according to the splenectomy phase (SPL), which occurred at 21 or 60 days of life, forming the CON-SPL₂₁ groups; CON-SPL₆₀; MSG-SPL₂₁ and MSG-SPL₆₀ (n = 14 rats / group). False-operated animals (FO) served as surgical controls (CON-FO and MSG-FO). Food intake and body weight were monitored at 70-90 days of life, and food efficiency was calculated. At 90 days the rats were subjected to an intravenous glucose tolerance test (ivGTT; 1g / kg) and an insulin test (II), a calculated IR measurement. In euthanasia (90 days), body weight, the depots of WAT, Inguinal (WAT-I) and Retroperitoneal (WAT-R) and isolated pancreatic islets were evaluated for the study of insulin secretion induced by glucose (GIIS) and expression of Glucose transporters of subtype 2 (GLUT-2) and Glucokinase (GCK). MSG rats showed lower body weight and growth besides greater adiposity, accompanied by dyslipidemia, glucose intolerance and IR compared to CON rats. Despite the higher food intake in the CON-SPL₂₁ group, the body weight gain of the CON-SPL₂₁ and CON-SPL₆₀ animals was significantly lower compared to the CON-FO animals, resulting in lower feed efficiency. Glucose tolerance was lower in CON-SPL₂₁ rats than in animals CON-FO and CON-SPL₆₀, without changing the IR; insulinemia or

GIIS. However, total cholesterol was reduced in the CON-SPL₂₁ group compared to the CON-FO animals ($p < 0.05$). MSG-SPL₂₁ showed greater weight gain while MSG-SPL₆₀ animals showed a decrease in weight gain compared to FO rats. Regardless of the stage of life, splenectomy reduced insulin during ivGTT in MSG animals, but only after 21 days did blood glucose fall, while MSG-SPL₆₀ showed greater sensitivity to insulin compared to the MSG-FO group ($p < 0.05$). Additionally, GIIS was significantly lower in islets of MSG-SPL₂₁ rats compared to islets of MSG-FO rats ($p < 0.05$) and there was an increase in GCK expression in islets of the MSG-SPL₆₀ group when compared to the MSG-FO group. and MSG-SPL₂₁ but did not modify the expression of GLUT-2. In conclusion, splenectomy reduces body weight in non-obese rats, despite hyperphagia, suggesting high energy expenditure. On the other hand, in conditions of MSG-induced obesity, removal of the spleen corrected glucose tolerance and reduced insulin secretion, improving insulin sensitivity, indicating that the spleen influences glucose homeostasis in conditions of obesity.

Key words: Obesity. Insulin. Glucose. Spleen. Pancreatic islets.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Secreção de insulina induzida por glicose nas células β pancreáticas	28
Figura 02. Translocação de GLUT-4	30

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina Difosfato
Akt/PKB	Proteína quinase B
ASC	Área sob a curva
ATP	Adenosina Trifosfato
Ca ²⁺	Íon Cálcio
CEUA	Comitê de Ética nos Usos com Animais
DCV	Doença Cardiovascular
DM2	Diabetes Mellitus do tipo 2
EPM	Erro Padrão da média
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ESP	Esplenectomia
GCK	Glucoquinase
GLUT	<i>Glucose Transporter</i>
IL	Índice de Lee
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IMC	Índice de Massa Corporal
IIns	Índice Insulinogênico
I κ B/NF-kB	Fator Nuclear Kappa B
IRS	<i>Insulin Receptor Subtrate</i>
ivGTT	Teste de Tolerância à Glicose intravenoso
K ⁺	Íon Potássio
LAFEM	Laboratório de Fisiologia Endocrinologia e Metabologia
LB	Linfócitos B
LT	Linfócitos T

MAP	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MSG	Glutamato Monossódico
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Hidrogeno Niacina Adenina Nucleotídeo
NK	<i>Natural Killer</i>
NAQ	Núcleo Arqueado
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PI-3-K	Fosfatidol-3-fosfato quinase
PIP-2	Fosfoinositol-2-fosfato
PIP-3	Fosfoinositol-3-fosfato
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
RER	Reticulo Endoplasmático Rugoso
RIE	Radioimunoensaio
SBEM	Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia
SC	Santa Cruz
SIIG	Secreção de Insulina Induzida por Glicose
SM	Síndrome Metabólica
SNC	Sistema Nervoso Central
TAB	Tecido Adiposo Branco
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UNIOESTE	Universidade Estadual do Oeste do Paraná
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3. REVISÃO LITERATURA	19
3.1. OBESIDADE E ALTERAÇÕES METABÓLICAS.....	19
3.2. BAÇO E OBESIDADE	23
3.3. PÂNCREAS ENDÓCRINO E O PAPEL DA INSULINA NA HOMOESTASE.....	27
GLICÊMICA.....	27
3.4. MODELO DE OBESIDADE HIPOTALÂMICA.....	32
Artigo: Splenic participation in glycemic homeostasis in obese and non-obese male rats.....	34
CONCLUSÕES FINAIS.....	61
REFERÊNCIAS GERAIS.....	62
ANEXOS	70
PARECER DE PROTOCOLO	70
ANEXO II: Protocolo de preparação da solução de Hanks	71
ANEXO III: Protocolo para preparação de solução de Krebs	72
ANEXO IV: Protocolo para preparação de tampão de ilhotas para Western Blotting	73

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença, de caráter multifatorial de elevada incidência, considerada um problema de saúde pública mundial. No Brasil, os números de pessoas com obesidade e sobrepeso crescem a cada ano, segundo dados da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL). Dados de 2013, demonstraram que mais da metade da população adulta apresentava excesso de peso, índices que chegaram, em 2016, a 57,7% nos homens e 50,5% nas mulheres (BRASIL, 2019).

Fisiologicamente, a obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de Tecido Adiposo Branco (TAB) corporal, o qual promove inflamação crônica de nível baixo, evento diretamente relacionado às complicações metabólicas presentes na obesidade (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006). Assim, durante a progressão da obesidade, o indivíduo obeso desenvolve diferentes anormalidades endócrino-metabólicas, reunidas na Síndrome Metabólica (SM), caracterizadas pela presença de Resistência à Insulina (RI), hiperglicemia, dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica. Obesidade e SM elevam a incidência de comorbidades crônicas, em especial, as Doenças Cardiovasculares (DCV) e o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2).

Conforme mencionado anteriormente, a obesidade e suas comorbidades são a ocorrência de um processo inflamatório crônico, cuja origem está no desequilíbrio na liberação de sinalizadores derivados dos adipócitos denominados de adipocinas (DO PRADO *et al.*, 2009; LEITE *et al.*, 2015; SPERETTA; LEITE; DUARTE, 2014).

Segundo Guimarães *et al.* (2007), o excesso de TAB, particularmente os depósitos viscerais, resulta em um aumento de adipocinas pró-inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral – α (TNF- α), as Interleucinas (IL) 1 e 6 e a resistina. Uma vez liberados na corrente sanguínea, estes fatores reduzem as cascatas de fosforilações desencadeadas pelo hormônio insulina resultando em RI (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010), elemento chave na SM e no DM2. Sendo assim,

evitar ou atenuar o processo inflamatório é uma estratégia fundamental no combate e controle da fisiopatologia da obesidade.

Dentro desse contexto, estudos recentes têm demonstrado que a atividade esplênica também poderia alterar a homeostase glicêmica e contribuir para o perfil inflamatório da obesidade (O'KEEFFE, 2014).

O baço apresenta reconhecida função como um órgão imune e hematológico, tendo sua morfologia e fisiologia rompidas pela obesidade, devido principalmente a esplenomegalia (PESSIN, 2001; FONSECA-ALANIZ *et al* 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2007; LENT, 2009). De acordo com Morrison e Weissman (1994), existe uma associação entre obesidade e disfunção imunológica. A primeira fase é o resultado da resposta imunológica à obesidade, já na segunda fase ocorre o hiperesplenismo decorrente de lesões hemorrágicas e congestão levando à desorganização e depleção do sistema linfóide.

Um estudo realizado por Altunkaynak, Ozbek e Altunkaynak (2007), comprovou que o baço de animais obesos alimentados por dieta hiperlipídica possui aumento, em volume, indicando esplenomegalia. Além disso, esses autores observaram depósitos de hemossiderina e dilatação dos sinusoides devido ao acúmulo de gordura nessas estruturas contribuindo para as alterações funcionais e estruturais deste órgão (ALTUNKAYNAK; OZBEK; ALTUNKAYNAK, 2007).

Autores demonstram que o baço possui células localizadas na cápsula esplênica capazes de se diferenciarem em ilhotas pancreáticas. Esses esplenócitos contribuem diretamente para a regeneração de ilhotas pancreáticas e restauração do controle glicêmico em camundongos diabéticos (RYU *et al.*, 2001; KODAMA; FAUSTMAN, 2004). Deste modo, a estreita relação anatômica e embriológica entre o baço e o pâncreas suporta uma sinergia funcional que seria interrompida pela esplenectomia traumática (RYU *et al.*, 2001; KODAMA; FAUSTMAN, 2004).

Pesquisas recentes demonstram que o tecido esplênico pode alterar a homeostase energética, em particular, o controle glicêmico. Um evento que poderia ser decorrente de sua relação direta ou indireta com o pâncreas endócrino (LEY *et al.*, 2012). Estudo de Ley *et al.* (2012), sugerem que a retirada do baço altera a homeostase glicêmica em humanos, resposta também observada em roedores esplenectomizados (GOTOH *et al.*, 2012a). Roedores obesos, oriundos de lesão hipotalâmica provocada pela administração neonatal de glutamato monossódico (MSG), apresentaram alterações na homeostase

glicêmica, RI, dislipidemia e complicações cardiovasculares, eventos que são associados a processo inflamatório (GOTOH *et al.*, 2012b; INOUE *et al.*, 2012; HERNÁNDEZ BAUTISTA *et al.*, 2019).

Ademais, usando este modelo animal, Leite *et al.* (2015), demonstraram a participação do baço no controle glicêmico e sobre a RI, uma vez que ratos MSG esplenectomizados aos 60 dias de vida apresentaram redução da hiperinsulinemia, melhora na tolerância à glicose e redução da secreção de insulina induzida por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas.

Deste modo, novos estudos são necessários para estabelecer, de forma clara, a relação entre obesidade e atividade esplênica, em especial, seu potencial efeito sobre a homeostase glicêmica. Assim, a questão problema chave de nosso estudo é: a retirada do baço é capaz de modificar a homeostase glicêmica em ratos controles e obesos?

Nossa hipótese é que a retirada do baço promova redução do tecido adiposo, melhorando a RI e assim influenciando a homeostase glicêmica, sendo os efeitos da ausência do baço mais acentuados em obesos em comparação aos ratos não obesos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da retirada do baço sobre a homeostase glicêmica em ratos Wistar machos obesos e não obesos.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar o impacto da retirada do baço sobre o controle alimentar e ganho de peso corporal e conteúdo de tecido adiposo branco de rato machos obesos e não obesos.
- Avaliar o impacto da retirada do baço sobre os parâmetros plasmáticos em jejum, tais como, as concentrações de glicose, triglicerídeos e colesterol total em ratos machos obesos e não obesos
- Investigar os efeitos da esplenectomia sobre a tolerância à glicose e resistência à insulina em ratos machos obesos e não obesos.
- Explorar os efeitos da esplenectomia sobre a secreção de insulina induzida por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos obesos e não obesos, quantificando a expressão proteica de transportadores de glicose subtipo 2 (GLUT-2) e da glucoquinase (GCK).

3. REVISÃO LITERATURA

3.1. OBESIDADE E ALTERAÇÕES METABÓLICAS

A obesidade é caracterizada como o acúmulo excessivo de TAB corporal sendo considerada uma doença crônica de caráter multifatorial (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). Dados epidemiológicos demonstram que a elevada incidência de obesidade não atinge apenas países ricos e desenvolvidos, mas tem aumentado no mundo todo tornando-se um grave problema de saúde pública (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA ESTUDO DA OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA, 2015).

No Brasil a incidência de obesidade vem crescendo nos últimos anos. Um estudo do Ministério da Saúde mostrou que 42,7% da população brasileira estava acima do peso no ano de 2006, um percentual que cresceu para 48,5% em 2011 (BRASIL, 2019). Confirmando o avanço da obesidade no Brasil, dados da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), demonstraram que mais da metade da população adulta estava com excesso de peso. Índices que chegaram a 57,7% nos homens e 50,5% nas mulheres em 2016, e aumentando para 57,8% e 53,9% em homens e mulheres respectivamente, em 2018 (BRASIL, 2019).

Concomitantemente, apesar de os brasileiros terem melhorado seus hábitos alimentares, a obesidade continuou crescendo. Segundo os últimos dados publicados da VIGITEL, a taxa de obesidade da população geral aumentou 67% de 2006 até 2018. Esses índices demonstraram que houve um aumento no consumo de hortaliças e na prática de exercícios físicos, porém a porcentagem de obesos cresceu de 11,8% para 19,8% durante esse período, sendo predominante nos jovens adultos entre 25 e 44 anos de idade (BRASIL, 2019).

O excesso de TAB, presente na obesidade, é frequentemente decorrente de um desequilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético. Deste modo, a sobra de calorias ingeridas é direcionada ao fígado e músculo esquelético, onde

serão convertidas em glicogênio ou ao TAB, no qual, via lipogênese, serão convertidos em triglicerídeos (TG). Os adipócitos que constituem o TAB apresentam grande capacidade de expansão, sendo o local preferencial de armazenamento das calorias ingeridas em excesso (PESSIN, 2001; CHANG; WEI, 2011; MAARBJERG; SYLOW; RICHTER, 2011). O grau e a velocidade de crescimento do TAB são regulados por complexos fatores de interação genéticos, metabólicos, hormonais e ambientais, ainda não totalmente esclarecidos, mas que determinam a magnitude individual do ganho de peso, bem como, o impacto das diferentes comorbidades à saúde (FRIEDMAN; HALAAS, 1998; LUDWIG *et al.*, 2001; FLIER, 2004; DE BONA SCHRAIBER *et al.*, 2019).

Durante a progressão da obesidade, e conseqüente expansão do TAB, o indivíduo obeso desenvolve diferentes anormalidades endócrino-metabólicas reunidas na Síndrome Metabólica (SM), caracterizada por obesidade abdominal, hiperglicemia, hipertensão, dislipidemia e RI. A obesidade e SM estão associadas à instalação de inúmeras Doenças Crônicas – Degenerativas Não Transmissíveis (DCNT), em especial, as DCV e o DM2, além de alguns tipos de cânceres (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006; GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010). A ligação entre obesidade, SM e doenças parece envolver um desequilíbrio entre o sistema imune e metabólico, no qual diferentes citocinas estão envolvidas. Deste modo, conforme afirma a Organização Pan-Americanas de Saúde (OPAS, 2003), além dos aspectos psicológicos, a obesidade e suas comorbidades têm impacto mais pronunciado na morbidade do que na mortalidade, comprometendo assim, a qualidade de vida de indivíduos com esse distúrbio (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2015; PSICOSSOCIAL, 2010).

Segundo a OMS, o DM2 é a patologia cuja incidência está mais intimamente ligada à obesidade ou excesso de peso, em especial quando associado a falta de atividade física e má nutrição. Neste sentido, mais de 7 milhões de brasileiros apresentam DM2 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). O rompimento da homeostase glicêmica, definida pelo aumento das concentrações plasmáticas de glicose em jejum (hiperglicemia), é um evento decorrente da RI e uma característica que define o DM2. Assim, compreender a relação entre TAB e RI é um aspecto central no tratamento do DM2 e no melhor prognóstico de saúde para o indivíduo obeso. Nos últimos anos, foi possível readequar o papel funcional do TAB em nosso organismo, ou seja, o clássico

papel do TAB como depósito energético foi ampliado para uma função imuno-metabólica, com impacto em vários sistemas fisiológicos, incluindo a homeostase glicêmica (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010).

Dentro deste novo contexto, foi descoberto que os adipócitos produzem e liberam diferentes proteínas, revelando um papel funcional do TAB como órgão endócrino, com efeitos sobre os demais sistemas, incluindo a sensibilidade à insulina. Assim, conforme destacam Galic, Oakhill e Steinberg (2010), o TAB produz e libera diferentes tipos de sinalizadores denominados de adipocinas ou adiponectinas, as quais são categorizadas em pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (BENOIT et al., 2004; GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011; GUIMARÃES et al., 2007). Durante a expansão do TAB, em especial os depósitos viscerais, ocorre um desajuste na produção de adipocinas com aumento da produção de substâncias pró- inflamatórias e queda na produção de substâncias anti-inflamatórias, estabelecendo um estado de inflamação crônica de baixo grau (DO PRADO *et al.*, 2009; GUSTAFSSON et al., 2010; SPERETTA; LEITE; DUARTE, 2014).

Dentre as adipocinas com atividade pró-inflamatórias destacam-se segundo Guimarães *et al.* (2007), o TNF- α , as IL-1 β e IL-6 e a resistina, as quais podem diminuir as cascatas de fosforilações do receptor de insulina nos tecidos, resultando em RI (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010). Molecularmente, a baixa fosforilação das vias desencadeadas pelo receptor de insulina impede a migração dos transportadores de glicose subtipo 4 (GLUT-4) para a membrana, resultando em menor captação periférica de glicose pelos tecidos periféricos, e conseqüente, hiperglicemia. Adicionalmente, estas adipocinas pró-inflamatórias também favorecem a RI hepática induzindo o maior efeito glicogenolítico no fígado, o que por sua vez, agrava a hiperglicemia (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010; LUDWIG et al., 2001).

Além disso, em estágios mais avançados da obesidade, em que a expansão do TAB é preferencialmente por hipertrofia, ocorre uma hipoperfusão dos adipócitos induzindo a hipóxia parcial do tecido, o que eleva a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). Tal produção agrava a RI, uma vez que, diferentes quinases são acionadas por ERO e impedem a cascata de sinalização da insulina nos tecidos periféricos (HOUSTIS; ROSEN; LANDER, 2006).

Neste sentido, a RI é o resultado da diminuição das vias de sinalização da insulina nos tecidos periféricos, em especial o músculo esquelético e o TAB, provocadas pelo desequilíbrio na produção e liberação das citocinas pró e anti-inflamatórias (DO PRADO et al., 2009; FONSECA-ALANIZ et al., 2006; SPERETTA; LEITE; DUARTE, 2014).

A patogênese da RI envolve uma complexa rede de metabolismo de glicose e gordura com a cascata inflamatória desempenhando um papel importante. Inicialmente, a insulina tem ações de anti-lipólise no TAB por ativação da lipase proteica, porém a expansão do TAB associada à obesidade mobiliza os ácidos graxos livres (AGL) na circulação através da ação da lipoproteína lipase (DUIVENVOORDEN et al., 2005; RAMADAN et al., 2011). Por consequente, no tecido sensível à insulina há modificação da sinalização deste hormônio através da ação dos AGL e quando a resistência à insulina se instala, o aumento da lipólise do TG armazenado no tecido adiposo produz mais ácidos graxos. A concentração aumentada de AGL inibe a ação antilipolítica da insulina (DE QUEIROZ et al., 2009; DUIVENVOORDEN et al., 2005; GUSTAFSSON et al., 2010). A continuidade desse processo culminará em uma RI generalizada associada a um agravamento do quadro inflamatório e um rompimento definitivo da homeostase glicêmica e lipídica (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010).

O ciclo vicioso, obesidade – RI - hiperinsulinemia, impõe uma sobrecarga funcional as células β pancreáticas exigindo adaptações morfológicas, tais como: aumento do número e tamanho das ilhotas. Além disso, a RI associada à inflamação crônica tem impacto direto sobre o pâncreas endócrino alterando a síntese e a liberação do hormônio insulina (LUDWIG et al., 2001; TIMPER; BRÜNING, 2017). Deste modo, inicialmente, a homeostase glicêmica é preservada à custa de uma hipersecreção de insulina pelo pâncreas endócrino induzindo a hiperinsulinemia, que supera a RI (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010). A hiperinsulinemia inicial supera a RI, mantém a homeostase glicêmica e paralelamente favorece a expansão do TAB.

Contudo, em longo prazo, a hiperfunção pancreática resulta em falência e morte das células beta pancreáticas estabelecendo o rompimento definitivo da homeostase glicêmica (LUDWIG et al., 2001; TIMPER; BRÜNING, 2017). Portanto, caracterizar e atenuar a origem do processo inflamatório, ou até mesmo

cessar, é um método eficaz no combate as comorbidades associadas à obesidade, em especial o DM2.

Interessantemente, dados mais recentes mostram que o balanço de citocinas pró e anti-inflamatórias no organismo humano pode ser alterado por outros sistemas fisiológicos incluindo a atividade esplênica (ESPOSITO *et al.*, 2003; GOTOH *et al.*, 2012a; O'KEEFFE, 2014; PESTKA *et al.*, 2004; WATERS *et al.*, 2007).

3.2. BAÇO E OBESIDADE

O baço é um órgão linfoide, móvel e não palpável, localizado no quadrante superior esquerdo do abdome, contra o diafragma sendo mecanicamente protegido pelas 9^a a 12^a costelas torácicas (DANGELO; FATTINI, 1998; TARANTINO *et al.*, 2009). Externamente, o baço é envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo denso e articulável, estando o hilo¹ esplênico localizado na face visceral do baço em íntimo contato com a cauda do pâncreas. Curiosamente, alguns leitos vasculares interligam os dois órgãos, parte distal do pâncreas que, juntamente com o baço, dividem alguns desses vasos e nervos (DANGELO; FATTINI, 1998; TARANTINO *et al.*, 2009; TSUCHITANI; SATO; KOKOSHIMA, 2016).

Em termos embriológicos, o tecido esplênico deriva de uma condensação de mesênquima no mesogastro dorsal durante a quinta semana gestacional, juntamente com a formação do intestino primitivo, sendo um de seus derivados. As células mesenquimais do primórdio esplênico se diferenciam para formar a cápsula, trama conjuntiva e parênquima deste órgão (PERSAUD, 2000; TARANTINO *et al.*, 2009). No feto humano, o baço é um órgão linfoide vascular e lobulado que tem como função principal a fabricação de hemácias e glóbulos brancos, e após o nascimento, essa função é interrompida por esse órgão, sendo assumida, principalmente, pela medula óssea (KIERSZENBAUM; TRES, 2012; PERSAUD, 2000; TARANTINO *et al.*, 2009).

O baço faz parte do sistema linfático, e em seu interior, é histologicamente dividido entre polpa branca e vermelha. A polpa vermelha possui sinusoides cheios de sangue, cordões esplênicos de fibras reticulares e a zona marginal, na fronteira

¹ Pequena saliência, abertura ou depressão que se forma no local onde penetram, num órgão, seus vasos e nervos.

com polpa branca que são compostas pelos nódulos contendo folículos linfoides, ricos em linfócitos B e bainhas linfoides periarteriolares com inúmeros linfócitos T (MOSMANN *et al.*, 1986; TARANTINO *et al.*, 2009).

Dentro desse contexto, a esplenectomia é uma palavra de origem grega definida pela extirpação cirúrgica total ou parcial do baço (NOLTE-SCHLEGEL *et al.*, 2001). O baço é o maior órgão linfoide do corpo humano podendo ter essa função assumida por outros órgãos, como o fígado, quando há necessidade de sua remoção total, ou ser regenerado quando há remoção parcial (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

A esplenectomia foi descrita primeiramente como indicação terapêutica para Esferocitose Hereditária em 1910 por Sutherland e Burghard. Alguns anos depois, em 1916, esse procedimento foi indicado para tratamento de Púrpura Trombocitopênica Idiopática por Kaznelson, e desde então, tem sido reconhecida como tratamento efetivo para essas doenças hematológicas. Atualmente, a retirada do baço tem indicação por causas traumáticas como acidentes automobilísticos e atropelamentos, e não traumáticas, nas quais se destacam a Púrpura Trombocitopênica imunológica crônica sem resposta à terapia clínica, anemias hemolíticas, cistos e abscessos esplênicos, linfomas, leucemias, tumores sólidos e outras neoplasias (KRUMBHAAR; MUSSER; PEET, 1916).

Segundo Marques *et al.* (2002), pacientes esplenectomizados apresentam uma resposta normal à reimunização contra um antígeno identificado primeiramente antes da esplenectomia, mas não apresentam uma resposta ótima a uma nova exposição ao antígeno. O baço possui um sistema circulatório especializado com grande suprimento de macrófagos capazes de ingerir microrganismos não-opsonizados com anticorpos de forma ideal, intensificando bastante a depuração.

Os indivíduos submetidos à esplenectomia apresentam níveis subnormais de imunoglobulinas do tipo M (IgM) e suas células mononucleares do sangue periférico exibem uma resposta diminuída de imunoglobulinas, evento que aumentam a chance de ocorrência de sepse em pacientes esplenectomizados (BADER-MEUNIER *et al.*, 2001; INOUE *et al.*, 2012) Adicionalmente, Habermalz *et al.*, (2008), diz que a esplenectomia leva a alterações na estrutura morfológica das hemácias e na concentração de plaquetas e leucócitos.

Durante muitos anos, apenas as ações imunológicas do baço foram exploradas. Todavia, nas últimas décadas, têm sido observados efeitos metabólicos

da atividade esplênica (GOTOH *et al.*, 2012b, 2012c; INOUE *et al.*, 2012; LEY *et al.*, 2012). Novas pesquisas demonstram que o tecido esplênico desenvolve também outras ações fisiológicas, as quais podem alterar a homeostase energética, em particular, afetando o controle glicêmico (LEY *et al.*, 2012; O'KEEFFE, 2014), um evento que pode ser decorrente de sua relação direta ou indireta com o pâncreas endócrino.

Neste sentido, estudos realizados por O'Keeffe (2013), mostram que o baço pode alterar a homeostase glicêmica, uma resposta observada em humanos esplenectomizados. Ley *et al.* (2013), apresentaram relatos de casos que sugerem que a esplenectomia está associada a distúrbios de glicose também em crianças. Pacientes que sofreram esplenectomia infantil desenvolveram deficiências endócrinas, pois o desenvolvimento do pâncreas está propenso a comorbidades após a esplenectomia comprovando a sinergia funcional entre o baço e pâncreas que seria interrompida pela esplenectomia traumática (BENOIT *et al.*, 2004). Além disso, o baço possui células localizadas na cápsula esplênica capazes de se diferenciarem em ilhotas pancreáticas. Esses esplenócitos contribuem diretamente para a regeneração de ilhotas pancreáticas e a restauração do controle glicêmico em camundongos diabéticos (KODAMA; FAUSTMAN, 2004; RYU *et al.*, 2001).

O baço é um regulador crucial da homeostase imune participando tanto das respostas imunes inatas quanto adaptativas (DAMESHEK, 1951, 1967; GARRAUD; COGNASSE, 2015). Para tal, o baço possui macrófagos, linfócitos T (LT) e células *Natural Killers* (células NK), produzindo uma variedade de citocinas (DAMESHEK, 1951, 1967; GARRAUD; COGNASSE, 2015; MOSMANN *et al.*, 1986, 1990).

A ação das citocinas esplênicas podem explicar os efeitos do baço sobre a homeostase glicêmica. Neste contexto, como mencionado anteriormente, na obesidade ocorre um aumento da produção de citocinas pro-inflamatórias e concomitante queda nas citocinas anti-inflamatórias (DO PRADO *et al.*, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2007; SPERETTA; LEITE; DUARTE, 2014).

Entre as citocinas anti-inflamatórias destaca-se a Interleucina 10 (IL-10). A IL-10 é sintetizada por vários tipos de células dentro de vários órgãos, sendo uma potente citocina anti-inflamatória que inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias (ESPOSITO *et al.*, 2003; GOTOH *et al.*, 2012a, 2012b; PESTKA *et al.*, 2004; WATERS *et al.*, 2007) Segundo alguns estudos, o baço é fonte importante desta citocina e alterações na sua produção ou ação poderiam favorecer o quadro pró-

inflamatório e as comorbidades decorrentes da obesidade (ESPOSITO *et al.*, 2003; PESTKA *et al.*, 2004; WATERS *et al.*, 2007; GOTOH *et al.*, 2012).

Grandes quantidades de IL-10 são produzidas por linfócitos B (LB) ativados, que amadurecem na zona marginal do baço. Novas evidências mostram que as células B produtoras de IL-10 desempenham um papel regulador na supressão de respostas imunes prejudiciais. Segundo diferentes estudos, na obesidade ocorre uma baixa produção de IL-10, evento que poderia favorecer a ação de citocinas pró-inflamatórias contribuindo para o quadro de inflamação crônica subclínica característico da obesidade, da RI, e consequente, desajuste da glicemia (ESPOSITO *et al.*, 2003; PESTKA *et al.*, 2004; WATERS *et al.*, 2007; GOTOH *et al.*, 2012).

Adicionalmente, a IL-10 parece modular a ingestão alimentar e o peso corporal. Neste sentido, trabalho de Ropelle *et al.* (2010) demonstrou que a IL-10 pode exercer importante ação anti-inflamatória no sistema nervoso central. Os achados destes autores sugerem que a infusão de IL-10 diretamente no hipotálamo inibe a ação inflamatória do fator nuclear Kappa B (IkKB/NF-kB) nessa região do cérebro de ratos obesos, aumentando a sensibilidade à ação da leptina e da insulina nos neurônios dessa região, culminando em diminuição da ingestão calórica e melhora no controle do balanço energético (ROPELLE *et al.*, 2010).

Um estudo realizado por Gotoh *et al.* (2012), demonstrou que a obesidade resultou na incapacidade do baço de sintetizar citocinas, incluindo IL-10, e citocinas pró-inflamatórias na obesidade provavelmente emergem de outros tecidos que não o baço, porque os níveis séricos de IL-10, mas não de citocinas pró-inflamatórias, diminuíram apesar da expressão dessas citocinas no baço estarem reduzidas em camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. Segundo esses autores, apesar da inflamação estar intimamente relacionada à adiposidade no TAB, os resultados mostram que o tratamento com a esplenectomia reduziu a adiposidade, mas aumentou as respostas inflamatórias no TAB. Além disso, o tratamento com IL-10 restaurou a redução da adiposidade TAB induzida pela esplenectomia, apesar de suprimir a inflamação (GOTOH *et al.*, 2012a).

3.3. PÂNCREAS ENDÓCRINO E O PAPEL DA INSULINA NA HOMOESTASE GLICÊMICA

O pâncreas é um órgão glandular, localizado no abdome profundo, e que possui duas subdivisões morfológicas e funcionais. O componente endócrino, apresenta as ilhotas de Langherans que secretam insulina e glucagon diretamente na corrente sanguínea. O componente exócrino é responsável pela produção e liberação do suco pancreático lançado no duodeno (GUILHERMET; COCHARD, 1998; TSUCHITANI; SATO; KOKOSHIMA, 2016). Tem sua origem entre a 6ª e a 8ª semana de vida embrionária, a partir da endoderme, como os outros órgãos gastrointestinais. Deste modo, desenvolve-se de duas evaginações ou esboços dorsal e ventral do duodeno primitivo (GUILHERMET; COCHARD, 1998; TSUCHITANI; SATO; KOKOSHIMA, 2016).

Anatomicamente, o pâncreas é dividido em cabeça, corpo e cauda, estendendo-se do duodeno ao baço na parede abdominal posterior (DANGELO; FATTINI, 1998; PERSAUD, 2000). Segundo Tsuchitani *et al.* (2016), o pâncreas de roedores é dividido em quatro segmentos: gástrico, esplênico, parabiliar e duodenal. Baseada na anatomia humana, a cabeça do pâncreas está localizada na porção duodenal e o corpo se estende até o estômago e o baço. Sua cauda desemboca no hilo do baço.

O pâncreas é caracterizado pelos ácinos pancreáticos, produtores de enzimas digestivas que desembocam no duodeno. Entre os ácinos, e em menor número, estão as ilhotas pancreáticas, as quais apresentam tamanhos diversos e estão distribuídas por todo o órgão. As ilhotas pancreáticas são constituídas de diferentes tipos celulares, dentre os quais destacam-se as células β , produtoras de insulina, as células α , produtoras de glucagon e em menor número as células δ , secretoras de somatostatina (TSUCHITANI; SATO; KOKOSHIMA, 2016).

Segundo Koh; Cho; Chen (2012), a inter-relação entre essas células dentro das ilhotas permite o controle direto da secreção de alguns dos hormônios por outros hormônios. Por exemplo, a insulina inibe a secreção de glucagon, e a somatostatina inibe a secreção tanto da insulina como do glucagon.

Considerando a insulina o único hormônio hipoglicemiante do organismo, seu papel na homeostase glicêmica é insubstituível. Sendo assim, descrever seu funcionamento é importante para entender a relação do pâncreas endócrino com a manutenção da glicemia e o estado de saúde do indivíduo (WHITEHEAD *et al.*, 2000; ZECCHIN; CARVALHEIRA; SAAD, 2004).

Dentro deste contexto, a função básica da célula β é ser um sensor da glicemia plasmática, e secretar insulina proporcional às flutuações da glicemia que ocorrem nos estados alimentados e de jejum. Assim, no período pós-prandial, ocorre aumento da glicemia plasmática. O fator mais importante para ativar as células β pancreáticas. Para tal, a glicose sanguínea é internalizada pelas células β pancreáticas por um transportador de glicose subtipo 2 (GLUT-2) presente na membrana destas células. Uma vez no interior da célula β , a glicose é metabolizada, elevando a razão ATP/ADP intracelular, levando ao fechamento de canais de potássio (K^+) sensíveis ao ATP (K-ATP), resultando em oscilações do potencial de membrana e influxo de cálcio, via canais de cálcio voltagem dependentes. O aumento do cálcio intracelular resulta na ativação do processo de exocitose de grânulos secretores contendo insulina (Figura 01) (KIERSZENBAUM; TRES, 2012; LENT, 2009; LUDWIG *et al.*, 2001).

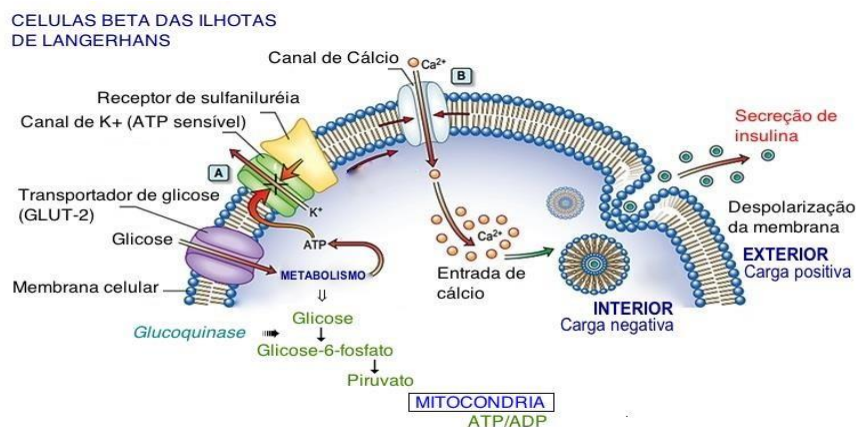


Figura 01. Secreção de insulina induzida por glicose nas células β pancreáticas: A glicose é internalizada pelas células β pancreáticas via transportadores de glicose (GLUT-2) representado pela letra B no esquema, sendo metabolizada pelas vias fosforilativas - oxidativas culminando com aumento da razão ATP/ADP. O aumento da taxa de ATP intracelular promove o fechamento de canais de K^+ ATP (representado pela letra A no esquema), despolarizando a membrana plasmática e abrindo canais de Ca^{2+} voltagem dependentes promovendo o influxo de Ca^{2+} e exocitose dos grânulos de insulina das vesículas.

Fonte: Dr. Armando Miguel Jr²

² Disponível em: <http://www.medicinageriatrica.com.br/tag/glut-4/> Acesso em: 04 jun. 2016.

Considerando que o mecanismo acima tenha sido efetivo, e que a insulina liberada possa exercer seus efeitos fisiológicos, os níveis de glicose plasmática serão normalmente mantidos numa faixa de aproximadamente 70 e 100 mg/dL, mesmo após variações da taxa de entrada e saída de glicose, como as que ocorrem após as refeições, por exemplo.

Segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2015), para que se mantenha a faixa de normalidade da glicose, a ação de um hormônio hipoglicemiante é essencial. Deste modo, falhas na liberação e ou ação da insulina no organismo resultam em um desajuste da homeostase glicêmica caracterizada por hiperglicemia, principal característica do diabetes.

A insulina ativa é um hormônio que possui cadeias polipeptídicas A, B e C ligadas por pontes dissulfetos. Nas células β pancreáticas, a insulina é inicialmente sintetizada no retículo endoplasmático rugoso (RER) como um pré-pró-hormônio, o qual sofre modificações, tais como: proteólise de sequência sinal e a adição de pontes dissulfeto, transformando-a em pró – insulina (CURRY; BENNETT; GRODSKY, 1968; ANTINOZZI et al., 2002; RAMADAN *et al.*, 2011; KOH; CHO; CHEN, 2012).

O receptor de insulina é formado por duas subunidades, estando a subunidade α na face extracelular, enquanto a subunidade β comporta-se como uma proteína transmembrana, que tem porção citosólica. A parte citoplasmática da subunidade β possui atividade tirosina quinase passíveis de fosforilação (PÁEZ-ESPINOSA et al., 1999). Sendo assim, após ligação da insulina, a porção externa do receptor, ocorre uma mudança conformacional que resulta na auto fosforilação da subunidade β interna, a qual passa a ter atividade quinase e fosforila diferentes substratos intracelulares. A fosforilação dos substratos dos receptores de insulina dá início a uma série de reações de fosforilação e defosforilação que resultam em efeitos metabólicos e de proliferação celular (WHITEHEAD *et al.*, 2000).

Dentre os efeitos ativados pela cascata de fosforilação da insulina, está a translocação de transportadores de glicose nos tecidos insulino-dependentes. Os GLUT-4 são transportadores insulina-dependente mais abundante nas membranas celulares do músculo esquelético, cardíaco e TAB. De acordo com Watson e Pessin (2005), sem estimulação da via da insulina, a densidade do

GLUT-4 na membrana celular destes tecidos é extremamente baixa. Nesta condição, os GLUT4 permanecem em vesículas citoplasmáticas, cuja quantidade é variável e dependente da atividade do tecido. Após a estimulação pela insulina, esses transportadores são translocados para a membrana e o transporte de glicose é aumentado (WHITEHEAD *et al.*, 2000; ZECCHIN; CARVALHEIRA; SAAD, 2004).

A principal via de sinalização que medeia a migração dos GLUT-4 inicia com a fosforilação do substrato para o receptor de insulina (IRS), o qual subseqüentemente, se liga a fosfatidil-3-fosfato-quinase (PI-3-K) e finalmente, a ativação das proteínas quinase Akt/PKB e PKC (SALTIEL; KAHN, 2001). Essas por sua vez, irão fosforilar elementos do citoesqueleto resultando em rearranjos internos que favorecem o desprendimento e a migração das vesículas contendo GLUT-4 até a membrana plasmática. Uma vez na membrana, os GLUT-4 permitem a difusão facilitada da glicose sanguínea para o interior das células, promovendo redução da glicemia plasmática (Figura 02) (SALTIEL; KAHN, 2001).

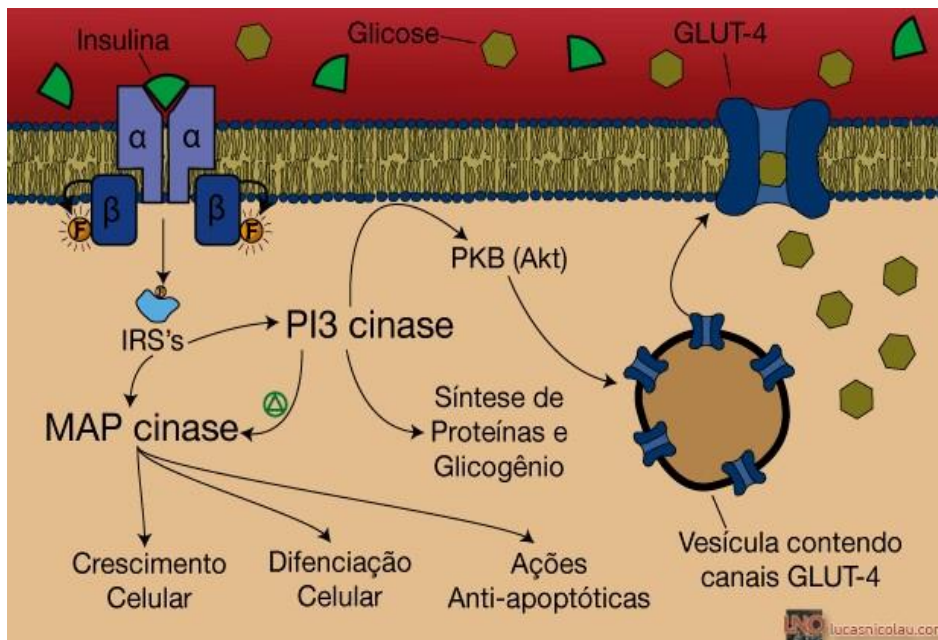


Figura 02. Translocação de GLUT-4: A interação da insulina com receptores de membrana ativa cascatas de fosforilações intracelulares, que resultam em mudanças do citoesqueleto e translocação dos transportadores de glicose GLUT-4 do citosol para a membrana, permitindo difusão facilitada da glicose. Adicionalmente, as vias de quinases ativadas também promovem crescimento, diferenciação e ações anti-apoptóticas. IRS: Insulin Receptor Substrate; MAP: Mitogen Activated Protein; PI3: Fosfatidil-3-fosfato quinase PKB: Proteína Quinase B; Akt: Activity Kinase kit.

Fonte: Lucas Nicolau de Oliveira³

³ Disponível em: <https://lucasnicolau.com/?v=p.ublicacoes&id=10> Acesso em: 04 jun. 2016.

Embora o fígado não precise da insulina para a captação da glicose, a ligação da insulina em seu receptor hepático inibe a glicogenólise e gliconeogênese contribuindo para a manutenção da homeostase glicêmica. Adicionalmente, a insulina também estimula a síntese de glicogênio, no tecido esquelético, bem como, inibe a lipólise e estimula a síntese de TG no tecido adiposo. Em muitos tecidos, a insulina também é responsável por estimular a entrada de aminoácidos nas células e ativar a síntese proteica (WATSON; PESSIN, 2001; MAARBJERG; SYLOW; RICHTER, 2011).

Adicionalmente, o excesso de TAB e a RI rompem o fluxo de substratos energéticos nos diferentes tecidos, tendo impacto no pâncreas. Por exemplo, A RI aumenta o fluxo de AGLs no fígado e no pâncreas resultando em esteatose hepática e doença pancreática gordurosa não alcoólica devido ao infiltrado de gordura. Deste modo, o pâncreas tem aumento de peso gerado pelo acúmulo de altos níveis de TG e AGL, que podem comprometer a função pancreática. O acúmulo de gordura pancreática também é caracterizado pelo aumento da produção de citocinas que são liberadas localmente e podem resultar em inflamação associada à disfunção orgânica. Além disto, a pancreatite demonstrou estar envolvida nos processos fibrogênicos pancreáticos através da sequência necrose-fibrose via inflamatória direta (GOTOH *et al.*, 2012a; MATHUR; PEDERSEN, 2008).

Neste sentido, um estudo realizado por Mathur *et al.*, (2008) demonstrou que ratos obesos têm maior peso do pâncreas associado ao aumento de TG e AGL, além de aumento de citocinas, sugerindo que a obesidade leva à infiltração de gordura do pâncreas e que o acúmulo de gorduras tóxicas e citocinas pró-inflamatórias no pâncreas pode ser a chave para a patogênese da pancreatite e do câncer de pâncreas.

Ademais, um estudo realizado por Gotoh *et al.*, (2012), comprovou que a esplenectomia altera a expressão de citocinas anti e pró – inflamatórias no pâncreas, além de modificar a infiltração de macrófagos neste órgão. Esses autores demonstraram que animais que tiveram o baço retirado e foram induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica obtiveram maior recrutamento de macrófagos do tipo 1 (M1). Esses macrófagos liberam citocinas pró – inflamatórias e causam distúrbios metabólicos sugerindo que condições que favorecem a polarização pró-inflamatória M1 de macrófagos, como a redução da liberação esplênica de IL-10 na

obesidade, desempenham um papel no desenvolvimento do acúmulo de gordura ectópica e fibrose devido à inflamação (GOTOH *et al.*, 2012a).

3.4. MODELO DE OBESIDADE HIPOTALÂMICA

O Glutamato Monossódico ou MSG (do inglês; monosodium glutamate) é um aminoácido com potentes efeitos excitatórios neurais, o qual em elevadas concentrações pode ser lesivo ao Sistema Nervoso Central (SNC), em especial durante o período neonatal, quando a barreira hematoencefálica não está totalmente desenvolvida. O excesso de MSG provoca degeneração aguda do Núcleo Arqueado (ARQ) do hipotálamo resultando em disfunções endócrino-metabólicas que provocam obesidade (OLNEY, 1969; SCALLET; OLNEY, 1986)

No final da década de 1960, Olney demonstrou que roedores tratados com MSG no período neonatal apresentavam lesões do nervo óptico, lesão hipotalâmica e desenvolviam obesidade (OLNEY, 1969). Segundo o autor, o aminoácido provoca edema intracelular com desenvolvimento de necrose neuronal levando a uma destruição seletiva dos neurônios do ARQ (OLNEY, 1969). Após a lesão hipotalâmica, ratos MSG-tratados apresentam anormalidades neuroendócrinas citadas na Tabela 01 (OLNEY, 1969; SCALLET; OLNEY, 1986; DAWSON; WALLACE; GABRIEL, 1989; BALBO *et al.*, 2007; HERNÁNDEZ BAUTISTA *et al.*, 2019).

Segundo Hirata *et al.* (1997), as anormalidades endócrino-metabólicas encontradas em ratos tratados com MSG ocorrem sem alteração da ingestão alimentar. Assim, diferentemente de outros modelos experimentais de obesidade, esses ratos não apresentam hiperfagia. Deste modo, o modelo apresenta características metabólicas similares à SM encontradas em humanos obesos (SCALLET; OLNEY, 1986; BALBO *et al.*, 2007; ANDREAZZI *et al.*, 2009), servindo de modelo experimental para estudos de obesidade e suas comorbidades.

O tratamento com MSG também pode contribuir para um desajuste na morfologia estrutural e funcional de alguns órgãos. A administração de MSG, segundo um estudo realizado por Leite *et al.* (2015), revelou que houve aumento das células vermelhas sanguíneas e dos granulócitos, juntamente com uma diminuição dos linfócitos circulantes e leucocitose.

Além disso, um estudo realizado por Guareschi, *et al.* (2019), demonstrou que animais tratados com MSG no período neonatal, apresentaram, na vida adulta, alterações na morfologia e função esplênica. Na análise histológica desse órgão observou-se aumento da polpa branca e do nódulo linfático além de uma diminuição do centro germinativo quando comparado aos animais considerados controle (GUARESCHI *et al.*, 2019).

O baço é responsável pela produção e liberação de cerca de 30% da IL-10 total do corpo humano (GOTOH *et al.*, 2012b, 2012c). Considerada uma importante citocina anti-inflamatória está reduzida em consequência do aumento das citocinas pró-inflamatórias na obesidade (BALBO *et al.*, 2007; GOTOH *et al.*, 2012a).

A administração de MSG induz uma redução da IL-10 plasmática, além de provocar alterações hormonais sugerindo que esse aminoácido seja capaz de provocar hipofunção e atrofia esplênica (HASSAN, 2014).

Usando protocolo similar ao de Gotoh *et al.* (2012), Leite *et al.* (2015) mostraram que no modelo MSG a retirada do baço reduz área da ilhota e a secreção de insulina induzida por glicose, tendo, portanto, efeito contrário ao modelo induzido por dieta hiperlipídica.

As alterações no pâncreas endócrino provocadas pela retirada do baço em roedores MSG foram acompanhadas de melhora na tolerância a glicose e RI, sem modificar o perfil plasmático inflamatório. Porém, animais esplenectomizados no estudo de Leite *et al.* (2015) apresentaram aumento nos TGs plasmáticos.

Considerando que existem poucos estudos explorando a participação esplênica sobre a homeostase glicêmica, o presente estudo avaliou o impacto da retirada do baço em diferentes etapas da vida sobre a glicemia de ratos controle e obesos MSG.

Artigo: Splenic participation in glycemic homeostasis in obese and non-obese male rats

Splenic participation in glycemic homeostasis in obese and non-obese male rats.

Thainan A. de Souza^a, Domwesley Wendreo de Souza^a, Bruna Schumaker Siqueira^a; Thiago Rentz^b; Henriette Rosa de Oliveria Emílio^c; Sabrina Grassioli^a

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

^bObesity and Comorbidities Research Center (OCRC), Unicamp, Rua Carl Von Linnaeus s/n, Instituto Biologia, Bloco Z, Campinas/SP.

^cUniversidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, Departamento de Biologia Geral, Ponta Grossa/PR.

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

Abstract:

We evaluated the effects of splenectomy on glucose homeostasis in obese and non-obese rats. Obesity was induced by subcutaneous injections of monosodium glutamate (MSG; 4g/Kg) in neonatal rats. Control animals (non-obese) received equimolar saline. Splenectomy (SPL) was performed at 21 or 60 days of life (SPL₂₁ and SPL₆₀), and glucose tolerance, insulin resistance (IR), weight of white adipose tissue (WAT) depots and glucose-induced insulin secretion (GIIS) were evaluated at 90 days of life. Despite their higher food intake, the Control-SPL₂₁ and ₆₀ groups presented reduced body weight gain and energy efficiency. Control-SPL₂₁ rats presented reduced glucose tolerance, without changes in insulin secretion or IR. MSG-SPL₆₀ rats had lower body weights, but MSG-SPL₂₁ rats demonstrated increased body weight and energy efficiency. Plasma insulin was reduced in the MSG-SPL₂₁ and ₆₀ groups, while improvements were seen in glucose tolerance in MSG-SPL₂₁ and in IR in MSG-SPL₆₀ animals. Furthermore, GIIS was decreased in islets of MSG-SPL₂₁ rats, but protein expression was unchanged. In conclusion, spleen ablation reduces body weight in non-obese rats and slightly modifies glucose homeostasis. In contrast, in MSG-induced obesity, absence of the spleen can ameliorate glucose tolerance and reduce insulin secretion, improving insulin sensitivity.

Key words: Glycemia; Insulin; Islets; Obesity; Spleen.

1. Introduction

Obesity is a global epidemic (WORLD HEALTH ORGANIZATION/REGIONAL OFFICE FOR THE EASTERN MEDITERRANEAN, 2018) and it is well established that excessive white adipose tissue (WAT) content, particularly in visceral WAT depots causes a pro-inflammatory state, which promotes metabolic abnormalities such as, insulin resistance (IR), glucose intolerance and dyslipidemia, favoring cardiovascular disease and diabetes onset (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010; SPERETTA; LEITE; DUARTE, 2014). However, other tissues or organs may be involved in the origin of inflammatory processes, including classical immune organs (DO PRADO et al., 2009; SPERETTA; LEITE; DUARTE, 2014). In this regard, studies have demonstrated that the spleen could be involved in metabolic abnormalities that are common in obesity, such as hepatic steatosis, pancreatic fibrosis and glucose tolerance (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010; INOUE et al., 2012; LEY et al., 2012). Moreover, obesity affects spleen histology and function, where the spleen of obese subjects frequently presents high fat accumulation and perturbed immunological actions (ESPOSITO et al., 2003; GOTOH et al., 2012a; INOUE et al., 2012; O'KEEFFE, 2014; PESTKA et al., 2004; WATERS et al., 2007).

The spleen is the largest organ in the mammalian lymphatic system, playing principal roles in both immune defense and blood filtration (TARANTINO et al., 2009). Spleen removal (splenectomy) doubles the risk that an individual will develop fatal thromboembolic and contract life-threatening infections (BISHARAT et al., 2001; LUU et al., 2018). Interestingly, some studies in rodents (GOTOH et al., 2012a, 2012c, 2012b; INOUE et al., 2012; LEITE et al., 2015) and humans (LEY et al., 2012; O'KEEFFE, 2014) have indicated that splenectomy also induces glucose homeostasis dysfunctions, suggesting that the spleen influences metabolism. Moreover, Faustman et al. (2014) (L FAUSTMAN, 2014) showed that splenocytes can migrate from the spleen capsule and participate in the regeneration of beta cells in the endocrine pancreas. Glucose intolerance and beta cell dysfunction are hallmarks of type 2 diabetes mellitus (T2DM), the principal pathology associated with obesity (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010). Thus, it is possible that the spleen influences glucose-induced insulin secretion (GIIS) from pancreatic islets and simultaneously modulates glucose tolerance.

In addition, the spleen appears to be able to transfer immune cells to WAT, an effect that could influence insulin sensitivity and metabolism. For example, a study by Wu et al. (2014)(WU et al., 2014) showed that innate-like B cells can migrate from the spleen to the visceral WAT depot where they exert local anti-inflammatory actions. As emphasized by Bronte et al. (2013)(BRONTE; PITTET, 2013), specific populations of B and T cells, which are produced in part by a secondary lymphoid organ such as the spleen, are central to the preservation of an anti-inflammatory immune environment, contributing to systemic immune homeostasis. Moreover, anti-inflammatory interleukin 10 (IL10), derived from the spleen, has a critical role in adipocyte function and IR(ESPOSITO et al., 2003; GOTOH et al., 2012b, 2012c; PESTKA et al., 2004).

Treatment of neonatals with monosodium L glutamate (MSG) induces hypothalamic lesions that culminate in excessive expansion of WAT, IR, glucose intolerance, dyslipidemia and cardiovascular dysfunctions(DAWSON; WALLACE; GABRIEL, 1989; KIZER; NEMEROFF; YOUNGBLOOD, 1977; OLNEY, 1969; SCALLET; OLNEY, 1986; TARANTINO et al., 2009; VOLTERA et al., 2008). Thus, MSG-obese rats are appropriate for the study of metabolic syndrome (MS), and its consequences. In addition, MSG-obese rats present alterations in the immunological system, including reduced plasma levels of IL10, a pro-inflammatory state in the WAT and histological abnormalities in the spleen(GUARESCHI et al., 2019). Adult splenectomy in MSG-induced obesity reduces adiposity and improves IR(LEITE et al., 2015), suggesting splenic participation in obesity. However, the impact of splenectomy on metabolism appears to be influenced by the animal model, age and diet. Thus, in the present study, we evaluated the effect of splenectomy (performed at 21 or at 60 days of life) on insulin secretion and adiposity in non-obese and MSG-obese male rats.

2.Methods

Pregnant Wistar rats (n=20) were maintained in individual cages at the Laboratory of Physiology, Endocrinology and Metabolism (LAFEM), Western Parana State University (UNIOESTE), under controlled conditions of luminosity (07:00-19:00 light/dark cycle) and temperature ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) until the birth of offspring. During pregnancy and lactation, the dams received free access to standard rodent chow (Biobase, BR) and water, according to the guidelines of the National Council for

Control of Animal Experiments (CONCEA). The Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the UNIOESTE approved all experimental procedures (June 13, 2014).

2.1. Induction of Hypothalamic Obesity

At birth (day 0), the litter size was adjusted to 6-8 male pups per dam during the entire lactation phase. Hypothalamic lesions were induced by administering high doses of monosodium glutamate (MSG) to neonates, according to Olney (1969)(OLNEY, 1969), with modifications(BALBO et al., 2007; SCOMPARIN et al., 2006). For this protocol, male pup rats received daily subcutaneous injections of MSG at a dose of 4 g/Kg body weight (BW) from the 2nd to 6th days of life. During the same period, the Control (non-obese) rats received subcutaneous injections of an equimolar sodium chloride (NaCl) solution at a dose of 1.25 g/Kg BW. Animals were weaned on the 21st day of life and subdivided into groups, according surgical procedure.

2.2. Splenectomy

The Control (n=42) and MSG (n=42) groups were randomly assigned to the splenectomy (SPL) procedure or sham surgery. SPL was performed during two phases of life, on the 21st day (SPL₂₁) or on the 60th day (SPL₆₀) of life. The spleen was removed according to methodology adapted from Gotoh et al., (2012)(GOTOH et al., 2012a). Briefly, after 12 hours of fasting, the rats were anesthetized with an intraperitoneally (i.p.) administered mixture of xylazine (0.04mL/100g) and ketamine (0.08mL/100g), and an incision (\pm 2cm) was then made in the abdominal region (skin and muscle). The spleen was then located and excised, before being cleaned and weighed. Sham rats were anesthetized, their abdominal cavities were then opened and the spleen manipulated, but not excised. Skin sutures were made with Nylon 2.0 and muscle sutures were made with Categute simple 2.0. After the surgical procedure, the rats were allocated to individual cages and received chow and water ad libitum for approximately seven days until complete cicatrization. After recuperation, the rats were regrouped into three per cage until 90 days of life. Six experimental groups were formed (n = 14 rats/group): Control – Sham: non-obese sham-operated rats; Control – SPL₂₁: non-obese rats that were splenectomized on day 21; Control – SPL₆₀: non-obese rats that were splenectomized on day 60; MSG – Sham: sham-operated MSG rats; MSG – SPL₂₁: MSG rats that were splenectomized on day 21; MSG – SPL₆₀: MSG rats that were splenectomized on day 60.

Independently of the time of SPL, all rats were evaluated at 90 days of life (Figure S1, supplementary material).

2.3. Body Weight, Food Intake, Water Intake and Feed Efficiency

Rats were marked (tail mark) and individually weighed (3 times/week). The food intake and hydric consumption were calculated from 70 to 90 days of life. For this, total of food offered minus the food remaining after 24h was divided by the number of rats per cage and by individual body weight (g/g of BW). A similar procedure was adopted by registering water intake (mL/g of BW). The values of BW, food and water intake obtained at 70 to 90 days of life were used to calculate the area under the curve (AUC). The Feeding Efficiency (FE) was determined by calculating the body weight gain (BW Δ ; g) from 70 to 90 days of life, divided by total food intake (g) consumed in the same period, using the following formula: $BW \Delta / \Sigma \text{ food intake} * 100$, as described^[30]

2.4. Intravenous Glucose Tolerance Test

At 90 days of life (8-10 rats per group), animals were submitted to the intravenous glucose tolerance test (ivGTT), according to a protocol used by Colman et al. (1992)(COLMAN et al., 1992). Briefly, after 12 hours of fasting, the animals were anesthetized (as described previously) and submitted to silicone catheter implantation in the right jugular vein. The catheter was exteriorized in the dorsal region of neck and was filled with saline solution containing heparin (5U/mL). The rats were then transferred to individual cages, and received food and water ad libitum. At twenty-four hours after catheterization and 8 hours of fasting, the animals received a glucose infusion (1g/Kg) and a blood sample ($\pm 300\mu\text{l}$) was collected at time zero (0' min), before glucose infusion and, at times 5', 15' and 30' min after glucose load. The blood samples were immediately centrifuged (12 rpm/3' min) and the plasma separated for the measurement of glucose, using the glucose-oxidase method (Lab Test, BR). The plasma insulin level was evaluated by radioimmunoassay (RIA). The incremental values of glucose (ΔG ; mg/dL) and insulin (ΔI ; $\mu\text{U/mL}$) obtained during ivGTT were used to calculate AUC, from which the insulinogenic index (II; $\Delta G/\Delta I$) was calculated as an indicator of insulin resistance (IR)(SINGH, 2010).

2.5. Pancreatic Islet Isolation and Insulin Secretion

Five-to-six rats per group were used for pancreatic islet isolation using the collagenase technique, according to a protocol established by Moura et al.

(1996)(MOURA et al., 1996) with modifications Grassioli et al. (2006)(GRASSIOLLI et al., 2006). Briefly, the rats were anesthetized as mentioned above, the abdominal cavity was opened and a solution of Hanks Buffer Solution (HBS), pH 7.4, with bovine serum albumin (BSA; 0.1%) containing collagenase type V (1 mg/mL) was infused via the hepatic duct that is shared by the pancreas. After perfusion, the pancreas was excised, transferred to the falcon tube containing HBS and maintained at 37° C for 15' min to guarantee enzymatic digestion. The islets were manually collected, washed in HBS and transferred to wells in culture plates containing 1 mL of Krebs buffer solutions (KBS), pH 7.4; BSA (0.1%) in the presence of glucose (5.6mM) for a 1-h pre-incubation period at 37°C and 5% CO₂. To evaluate glucose-induced insulin secretion (GIIS) the islets were incubated for a further 60 min in 1mL of KBS, pH 7.4; BSA (0.1%), containing 16.7mM glucose. The insulin obtained from the incubation medium was measured by the RIA technique.

2.6. Western blotting

Islets from 4-6 rats per each group were solubilized in buffer containing 100mM Tris, pH 7.5, 10mM/L sodium pyrophosphate, 100mM sodium fluoride, 10mM/L EDTA, 10mM sodium vanadate, 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 2% Triton X-100, final pH, 8.08. The protein concentration in the supernatants was measured using the Bradford methods (BRADFORD, 1976). For sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot analysis, samples were treated with Laemmli buffer. After heating to 95°C for 5 min, the proteins were separated by electrophoresis (30µg/lane, 10% gel), and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked overnight at 4°C in Tris-buffered saline containing 5% skimmed milk. Subsequently, the membranes were incubated with a polyclonal antibody against GCK (SC 7908 rabbit) and GLUT-2 antibody (SC 9117 rabbit). After washing, the membranes were incubated for 2h with a secondary antibody (1:10.000 – Sigma), followed by exposure to an Image Quant LAS 4000 Mini (GE Healthcare Bio-Sciences - Uppsala–Sweden) to detect chemiluminescence on the nitrocellulose membranes. After assaying the target protein, Western blotting was repeated using β-actin (1:1.000 SC 130656 rabbit) antibody, as an internal control. Band intensities were quantified by optical densitometry using Image J® software (National Institute of Mental Health, USA). Data are expressed as the normalization of the GLUT-2/ β-actin and GCK/ β-actin ratio.

2.7. Euthanasia

At 92 days and after 12h of fasting, the rats were desensitized with CO₂ and immediately decapitated. The total volume of blood was collected in heparinized tubes and plasma was used to dose glucose, triglycerides and total cholesterol by enzymatic kits (Labtest, BR). Subsequently, the abdominal cavity was opened and the white adipose tissues (WAT) of the inguinal (WAT-I) subcutaneous and visceral retroperitoneal (WAT-R) depots were removed and weighed.

2.8. Statistical Analysis

Data are depicted as means \pm standard error of mean (SEM). Control (non-obese) and MSG-treated were compared using Student's t test ($p < 0.05$). The effects of splenectomy were analyzed in Control (non-obese) and MSG (obese) rats using Two-Way ANOVA. When F values were significantly different, the Tukey post-test was applied with $p < 0.05$. The statistical analyses were conducted using Prism for Macintosh, version 6.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

At 90 days of life, the MSG-treated rats presented reductions of 36% and 15.13%, respectively, in BW and naso-anal length in relation to the same parameters in the Control rat group. Thus, MSG-treated rats presented a 10% increase in the Lee Index and high adiposity, in comparison with the Control animals ($p < 0.05$). Under fasting conditions, the MSG-treated rats presented normoglycemia, hyperinsulinemia (704.60%) and elevated values of triglycerides (126.43%) in relation to Control animals ($p < 0.05$). The MSG-treated rats also presented glucose intolerance and hyperinsulinemia during ivGTT, when compared to Control animals (data not shown). Thus, the insulinogenic index, a measure of IR, was significantly higher in MSG rats (135.63%) than in Control animals (Table S1, supplementary material; $p < 0.05$).

Neither splenectomy at 21 nor at 60 days of life modified NAL, fasting glucose or plasma insulin levels in Control adult rats. In contrast, the total cholesterol content in plasma was 24.84% lower in CON – SPL₂₁ rats than in Control – Sham animals (Table 01; $p < 0.05$). At 90 days of life, the BW as well, as the AUC of BW were significantly lower in Control-SPL₂₁ and Control-SPL₆₀ rats, in relation to the Control-Sham rats (Fig. S2A, supplementary material; $p < 0.05$), despite the fact that the AUC of the food intake was elevated in the Control-SPL₆₀ rats (Fig. S2C, supplementary material; $p < 0.05$). Control-SPL₂₁ animals also had a high food consumption in relation to Control-Sham rats. Thus, the AUC of the food intake was 17.09% higher in Control-SPL₂₁ rats, compared to the AUC of Control-Sham rats (Fig. S2C,

supplementary material; $p < 0.05$). Moreover, BW gain was reduced by 30% and 40%, respectively, in the Control-SPL₂₁ and Control-SPL₆₀ groups. Thus, FE was reduced by 41% and 50%, respectively, in the Control-SPL₂₁ and Control-SPL₆₀ rats, in relation to the Control – Sham animals (Table 01; $p < 0.05$)

The BW, at 90 days of life, in MSG-SPL₆₀ animals was reduced by 20.77% and 31.31%, when compared to the BW of the MSG-Sham and MSG-SPL₂₁ groups, respectively. Moreover, MSG-SPL₂₁ rats presented an increase of 15.35% in BW, in relation to the MSG-Sham rats (Table 02; $p < 0.05$). The AUC of BW, evaluated at 70 to 90 days of life in MSG-SPL₂₁ animals, was approximately 12% higher in comparison to the MSG-SPL₆₀ and MSG-Sham rats (Fig. S2B, supplementary material; $p < 0.05$). In addition, the MSG-SPL₂₁ and MSG-SPL₆₀ groups presented higher AUCs for food intake, when compared to MSG-Sham rats (Fig. S2D, supplementary material; $p < 0.05$). Thus, MSG-SPL₂₁ rats demonstrated greater BW gain (increases of 32% and 25%, respectively), in relation to the MSG-Sham and MSG-SPL₆₀ groups. In contrast, the MSG-SPL₆₀ animals presented a reduction of 25% in BW gain, in comparison with the MSG-Sham rats. Thus, the MSG-SPL₆₀ animals presented reductions of 39% and 51% in FE, respectively, in relation to the MSG-Sham and MSG-SPL₂₁ groups (Table 02; $p < 0.05$). The fasting glycemia in MSG-SPL₆₀ animals increased by 68.56%, when compared to the MSG-Sham group. In contrast, fasting plasma insulin was reduced by 129.97% in MSG-SPL₂₁, in comparison to MSG-Sham rats (Table 02; $p < 0.05$). Lipid parameters were not affected by splenectomy in obese rats. The AUC of water intake was reduced by 16.26% and 25.75%, respectively, in Control-SPL₂₁ and Control-SPL₆₀ groups, in relation to the AUC of Control-Sham rats (Fig. S2E; $p < 0.05$). Similarly, in MSG-SPL₂₁ rats, reductions of 22.67% and 36.02% in the water intake AUC were observed in relation to MSG-Sham and MSG-SPL₆₀ animals, respectively (Fig. S2F; $p < 0.05$). Moreover, MSG-SPL₆₀ animals presented an increase in 13.75% in food intake AUC, when compared to the MSG-Sham group (Fig. S2D; $p < 0.05$). In Control rats, independent of stage of life, the spleen absence did not modify the weight of WAT-I and WAT-R depots (Table 1). However, despite of no significant, in MSG-SPL₆₀ we observed smaller weight of WAT-I in relation to MSG-Sham rats, without changes in the weight of WAT-R (Table 2).

During ivGTT, glucose values were significantly lower in the Control-SPL₂₁ rats, compared to the other groups. Thus, the AUC for glucose was approximately 52%

lower in the Control-SPL₂₁ group, than in the Control-Sham rats (Fig. 1A; $p < 0.05$). Glucose tolerance was not altered in the Control-SPL₆₀ group; in contrast, the MSG-SPL₂₁ animals presented a reduced glucose concentration during ivGTT, in relation to the other MSG groups. Thus, the AUC for glucose was 46% and 179% lower in the MSG-SPL₂₁ group, in relation to the MSG-Sham and MSG-SPL₆₀ animals, respectively (Fig. 1B; $p < 0.05$). Independently of the stage of life, in Control animals, the splenectomy did not modify plasma insulin levels during the ivGTT or the insulinogenic index in the Control groups (Fig. 1C and 1E; $p < 0.05$). However, the AUC for insulin, during the ivGTT, was 68% and 57% lower in MSG-SPL₂₁ and MSG-SPL₆₀ rats, when compared with the AUC of MSG-Sham rats (Fig. 1D; $p < 0.05$). Thus, the insulinogenic index in the MSG-SPL₆₀ group was 67.62% lower, in relation to that of MSG-Sham animals (Fig. 1F; $p < 0.05$).

In Control animals, splenectomy did not significantly modify either GIIS (Fig. 2a; $p < 0.05$), GCK (Fig. 2c; $p < 0.05$) or GLUT₂ (Fig. 2e; $p < 0.05$) expression in isolated pancreatic islets. On the other hand, the GIIS was reduced by 58% in islets of the MSG-SPL₂₁ rats, compared to islets of the MSG-Sham group (Fig. 2b; $p < 0.05$). Moreover, islets from the MSG-SPL₆₀ group presented augmented expressions of GCK (278% and 217%, respectively), in comparison with islets from the MSG-Sham and MSG-SPL₂₁ groups (Fig. 2d; $p < 0.05$). GLUT₂ expression (Fig. 2e; $p < 0.05$) was not significantly modified in islets of splenectomized MSG rats.

Discussion

In the present study, we evaluated the impact of the absence of the spleen, during different phases of life, on metabolism, adiposity and insulin secretion in rats with hypothalamic obesity, a model that simulates human obesity and its comorbidities. Additionally, we evaluated the impact of splenectomy on non-obese (Control) rats, to determine whether the lack of a spleen can influence metabolism, even in the healthy condition. In accordance with several studies (ANDREAZZI et al., 2009; BALBO et al., 2007; GUARESCHI et al., 2019; LEITE et al., 2015; SCOMPARIN et al., 2006), the MSG-treated rats in the present work also showed high WAT content, hyperinsulinemia, glucose intolerance, dyslipidemia and IR, compared to Control rats, therefore, reproducing characteristics of MS.

Spleen ablation in Control (non-obese) rats, independently of age, modified food and water intake and, consequently, body weight gain. Despite presenting hyperphagia, Control-SPL rats had a reduced body weight gain, resulting in a lower FE, with a

greater impact observed in those rats that were splenectomized aged 60 days. In the present study, similar effects were also seen in MSG-SPL₆₀ rats. Moreover, lean mice splenectomized at 60 days of life presented reduced body weight gain and a lower energy expenditure(GOTOH et al., 2012b).

However, MSG-SPL₂₁ animals presented hyperphagia, and greater body weight gain and FE. At 60 days of life, but not at 21 days, obesity, IR and dyslipidemia are already present in MSG-treated rats^[49], which could explain the opposing effects of splenectomy at 21 versus 60 days in MSG-obese animals. Additionally, it is possible that precocious spleen ablation modifies the development of obesity in MSG-treated rats.

MSG-treated rats are known to present extensive damage in the hypothalamic arcuate nucleus (HAN), without associated hyperphagia(OLNEY, 1969; SCALLET; OLNEY, 1986). The impact of spleen absence on FE and body weight homeostasis of MSG-obese rats suggests that neural activity or another factor originating from the spleen modulates hypothalamic neural pathways involved in energy metabolism. Importantly, the HAN is the primary site of response to insulin(GOTOH et al., 2012c, 2012b, 2012a) and cytokines(HOLLIS et al., 2010). In this regard, is important to remember that cytokines and hormones, such as IL-10 and insulin, modulate the activity of hypothalamic orexigenic and anorexigenic neurons, influencing body weight and food intake processes(TIMPER; BRÜNING, 2017). In the present study, MSG-SPL₂₁ rats presented reductions in plasma insulin levels, event that could to change hypothalamic insulin actions. Notably, the spleen produces IL10, an important anti-inflammatory cytokine that regulates energy metabolism and IR in neural hypothalamic circuits(DE BONA SCHRAIBER et al., 2019; GOTOH et al., 2012c). Plasma levels of IL-10 have been reported to be reduced in MSG-obese rats(GUARESCHI et al., 2019) and the overexpression of IL-10 in hypothalamic neurons was shown to reverse the hypothalamic inflammation induced by a HFD(GOTOH et al., 2012c). It is possible that the actions of IL-10 on the hypothalamus the MSG-obese had been altered by spleen ablation. Despite of changes in body weight, we did not observe alteration in WAT content in Control splenectomized rats. However, we noted a tendency of reduction in WAT subcutaneous content in MSG-SPL₆₀ rats. Suggesting elevated lipolysis in this fat depot. Reduction in adipocyte size were observed in other studies of splenectomized rodents^[12].

In the present study, splenectomized rats presented changes in water intake. In Control rats, independently of the phase of life, splenectomy reduced water intake, and this effect was also observed in MSG-SPL₂₁ rats. The mechanism underlying this effect is not clear, although the participation of the spleen in the control of blood volume, as well as the presence of oxytocin and vasopressin(ANDREW; DENG; KAUFMAN, 2000) in the spleen cells could explain these observations.

Some studies have suggested a possible consequence of spleen ablation on lipid homeostasis(GOTOH et al., 2012a, 2012c, 2012b; PETROIANU et al., 2008). We demonstrated that Control-SPL₂₁ rats presented a reduction in total cholesterol under fasting conditions. In patients with splenic trauma and hypersplenism due to myeloproliferative disorders or heredity spherocytosis, splenectomy can increase plasma total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and/or triglycerides(AVIRAM et al., 1986). On other hand, a more recent study by Zhang et al. (2018)(ZHANG et al., 2017) demonstrated that splenectomy did not alter plasma lipid levels or lipoprotein profiles, nor did it alter hepatic or adipose lipid deposition in Apoe deficient (Apoe^{-/-}) mice fed on a severe atherogenic diet. Consistent with these findings, in the present study, MSG-treated splenectomized rats did not present changes in triglycerides and total cholesterol under fasting conditions. In contrast, Gotho et al. (2012)(GOTOH et al., 2012b) showed that spleen ablation provoked an increase in plasma triglycerides in mice fed on a HFD. Taken together, these findings a role of the spleen in lipid metabolism.

Effects of splenectomy on glucose homeostasis have also been observed in rodents and humans(LEY et al., 2012; O'KEEFFE, 2014). Splenectomy at 21 days of life promoted reductions in plasma glucose levels during ivGTT, in both Control and MSG-obese rats, confirming the influence of the spleen on glucose homeostasis. However, this alteration was accompanied by a reduction in insulin levels and an improvement in IR only in splenectomized MSG rats. Moro et al., (1994)(MORO et al., 1994) reported that splenectomy in patients with liver cirrhosis normalized IR. However, HFD consumption in previously splenectomized mice provoked glucose intolerance and hyperinsulinemia during the glucose tolerance test, via a response related to liver inflammation(GOTOH et al., 2012a). Additionally, Bazi et al., (2017)(BAZI et al., 2017) found a higher risk of impaired fasting glucose and diabetes in patients with thalassemia major (TM) who had either splenomegaly or were splenectomized. In these patients, higher levels of the hepatic enzyme, AST, were

also observed, suggesting a role of liver abnormalities in the predisposition to abnormal glucose metabolism in TM.

Clinical data show that the incidence of diabetes is significantly higher in patients that underwent partial pancreatectomy and splenectomy than in those undergoing pancreatectomy alone. These authors suggested a role of the spleen in beta cell regeneration(O'KEEFFE, 2014). Thus, in the present study we also evaluate insulin secretion from isolated pancreatic islets. Pancreatic islets from splenectomized Control rats did not present significant changes in GIIS or islet protein expression. GIIS is altered in MSG-obese rats(GRASSIOLLI et al., 2006; LEITE et al., 2015), and we confirmed that the spleen influences endocrine pancreas functions, as previously demonstrated by our group(LEITE et al., 2015). Isolated pancreatic islets from MSG-SPL₂₁ rats presented reductions in GIIS, which may explain the lower plasma insulin levels and improvement in IR that were observed in MSG-SPL₂₁ rats. However, no change in GCK and GLUT₂ expressions were observed in these islets. We previously demonstrated that splenectomy, when performed at 60 days of life in MSG rats, provokes a reduction in islet size(LEITE et al., 2015). It is possible that the spleen has a role in beta cell survival or proliferation. In this regard, the spleen is embryologically similar to the pancreas, liver, and intestine, and many studies carried out on animals have shown that precursor cells develop into insulin-secreting beta cells in the pancreatic duct or elsewhere in the pancreas(CHEN; JIANG; YANG, 2004; KODAMA; FAUSTMAN, 2004; RYU et al., 2001) Moreover, it has been demonstrated that splenocytes can regenerate pancreatic beta cell in the diabetes state(KODAMA; FAUSTMAN, 2004; RYU et al., 2001). Interestingly, IL-10 gene transfer reportedly reduces the expression of inflammatory cytokines, attenuates pancreatic insulinitis and inhibits β cell apoptosis(XU et al., 2015). Corroborating this hypothesis, Gotho et al. (2012)(GOTOH et al., 2012a) demonstrated that splenectomy provokes fibrosis in the endocrine pancreas. Taken together, these findings suggest that splenectomy may reduce the pancreatic beta cell mass and, consequently, induce the reduction in GIIS. More recently, splenic activity has been related to liver and cardiovascular functions, in the so-called cardio-splenic axis(TARANTINO et al., 2009). Corroborating this view, we suggest that splenic function may also be necessary for pancreas insulin secretion and glucose homeostasis.

In conclusion, ablation of the spleen reduces body weight and adipocyte size in subcutaneous WAT in non-obese rats, despite hyperphagia, suggesting elevated energy expenditure. However, in these animals, the absence of the spleen exerted only a slight impact on glucose homeostasis. On other hand, under conditions of MSG-induced obesity, spleen ablation corrected glucose tolerance and reduced insulin secretion, improving insulin sensitivity, indicating that the spleen influences glucose homeostasis under conditions of obesity.

Acknowledgments

We thanks, at UNICAMP by laboratorial and technique support as well as at CNPq by Productivity Scholarship, process number 309633/2016-8.

References

A. HASSAN, Z. The Effects of Monosodium Glutamate on Thymic and Splenic Immune Functions and Role of Recovery (Biochemical and Histological study). **Journal of Cytology & Histology**, 2014.

ALTUNKAYNAK, B. Z.; OZBEK, E.; ALTUNKAYNAK, M. E. A stereological and histological analysis of spleen on obese female rats, fed with high fat diet. **Saudi Medical Journal**, 2007.

ANDREAZZI, A. E. et al. Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium L-glutamate-obesity in mice. **Journal of Endocrinology**, 2009.

ANDREW, P.; DENG, Y.; KAUFMAN, S. Fluid extravasation from spleen reduces blood volume in endotoxemia. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, 2000.

ANTINOZZI, P. A. et al. Mitochondrial metabolism sets the maximal limit of fuel-stimulated insulin secretion in a model pancreatic beta cell: A survey of four fuel secretagogues. **Journal of Biological Chemistry**, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA ESTUDO DA OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA. **Mapa da obesidade**.

AVIRAM, M. et al. Increased low-density lipoprotein levels after splenectomy: A role for the spleen in cholesterol metabolism in myeloproliferative disorders. **American Journal of the Medical Sciences**, 1986.

BADER-MEUNIER, B. et al. Long-term evaluation of the beneficial effect of subtotal splenectomy for management of hereditary spherocytosis. **Blood**, 2001.

BALBO, S. et al. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin

- secretion of hypothalamic obese rat. **Endocrine**, 2007.
- BAZI, A. et al. Diabetes mellitus in thalassaemia major patients: A report from the Southeast of Iran. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, 2017.
- BENOIT, S. C. et al. **Insulin and leptin as adiposity signals** **Recent Progress in Hormone Research**, 2004.
- BISHARAT, N. et al. Risk of infection and death among post-splenectomy patients. **Journal of Infection**, 2001.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 1976.
- BRONTE, V.; PITTET, M. J. **The spleen in local and systemic regulation of immunity** **Immunity**, 2013.
- CHANG, X.; WEI, C. **Glycolysis and rheumatoid arthritis** **International Journal of Rheumatic Diseases**, 2011.
- CHEN, L. B.; JIANG, X. B.; YANG, L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. **World Journal of Gastroenterology**, 2004.
- COLMAN, P. G. et al. Comparison of two commonly used standard IVGTTs. **Diabetes Care**, 1992.
- CURRY, D. L.; BENNETT, L. L.; GRODSKY, G. M. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. **Endocrinology**, 1968.
- DAMESHEK, W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. **Blood**, 1951.
- DAMESHEK, W. Chronic lymphocytic leukemia--an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. **Blood**, 1967.
- DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia Humana Básica**. [s.l.: s.n.].
- DAWSON, R.; WALLACE, D. R.; GABRIEL, S. M. A pharmacological analysis of food intake regulation in rats treated neonatally with monosodium L-glutamate (MSG). **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 1989.
- DE BONA SCHRAIBER, R. et al. Diet-induced obesity causes hypothalamic neurochemistry alterations in Swiss mice. **Metabolic Brain Disease**, 2019.
- DE QUEIROZ, J. C. F. et al. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, 2009.
- DO PRADO, W. L. et al. Obesidade e adipocinas inflamatórias: Implicações práticas

- para a prescrição de exercício. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 2009.
- DUIVENVOORDEN, I. et al. Apolipoprotein C3 deficiency results in diet-induced obesity and aggravated insulin resistance in mice. **Diabetes**, 2005.
- ESPOSITO, K. et al. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 2003.
- FLIER, J. S. **Obesity Wars: Molecular Progress Confronts an Expanding Epidemic**Cell, 2004.
- FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. [The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism]. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, 2006.
- FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. **Leptin and the regulation of body weight in mammals**Nature, 1998.
- GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. **Adipose tissue as an endocrine organ**Molecular and Cellular Endocrinology, 2010.
- GARRAUD, O.; COGNASSE, F. **Are platelets cells? And if yes, are they immune cells?**Frontiers in Immunology, 2015.
- GOTOH, K. et al. Spleen-Derived Interleukin-10 Downregulates the Severity of High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease. **PLoS ONE**, 2012a.
- GOTOH, K. et al. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced inflammation in white adipose tissue and liver. **Diabetes**, 2012b.
- GOTOH, K. et al. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced hypothalamic inflammation. **Journal of Neurochemistry**, 2012c.
- GRASSIOLLI, S. et al. Pancreatic islets from hypothalamic obese rats maintain K⁺-ATP channel-dependent but not -independent pathways on glucose-induced insulin release process. **Endocrine**, 2006.
- GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. **Annual Review of Immunology**, 2011.
- GUARESCHI, Z. M. et al. Exercise and Vitamin D Supplementation Modify Spleen Morphology in Lean, but not, in Monosodium-Glutamate-Obese Rats. **Journal of Spleen and Liver Research**, 2019.
- GUILHERMET, R.-G.; COCHARD, A. Arginine: Wound healing, immune and endocrine functions [L'arginine. Fonctions cicatrisantes, immunitaires et endocrines]. **Cahiers de Nutrition et de Dietetique**, 1998.
- GUIMARÃES, D. E. D. et al. Adipocitocinas: Uma nova visão do tecido adiposo.

Revista de Nutricao, 2007.

GUSTAFSSON, P. A. et al. EPA supplementation improves teacher-rated behaviour and oppositional symptoms in children with ADHD. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, 2010.

HABERMALZ, B. et al. **Laparoscopic splenectomy: The clinical practice guidelines of the European Association for Endoscopic Surgery (EAES)**. Surgical Endoscopy and Other Interventional Techniques. **Anais...**2008

HERNÁNDEZ BAUTISTA, R. J. et al. **Obesity: Pathophysiology, monosodium glutamate-induced model and anti-obesity medicinal plants** **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2019.

HOLLIS, J. H. et al. Central interleukin-10 attenuates lipopolysaccharide-induced changes in food intake, energy expenditure and hypothalamic Fos expression. **Neuropharmacology**, 2010.

HOUSTIS, N.; ROSEN, E. D.; LANDER, E. S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. **Nature**, 2006.

INOUE, M. et al. Role of the spleen in the development of steatohepatitis in high-fat-diet-induced obese rats. **Experimental Biology and Medicine**, 2012.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. Basic Histology: Text & Atlas. **Statrefcom**, 2005.

KIERSZENBAUM, A.; TRES, L. **Histología y biología celular**. [s.l: s.n.].

KIZER, J. S.; NEMEROFF, C. B.; YOUNGBLOOD, W. W. **Neurotoxic amino acids and structurally related analogs** **Pharmacological Reviews**, 1977.

KODAMA, S.; FAUSTMAN, D. L. **Routes to regenerating islet cells: Stem cells and other biological therapies for type 1 diabetes** **Pediatric Diabetes, Supplement**, 2004.

KOH, D. S.; CHO, J. H.; CHEN, L. **Paracrine interactions within islets of Langerhans**. Journal of Molecular Neuroscience. **Anais...**2012

KRUMBHAAR, E. B.; MUSSER, J. H.; PEET, M. M. The relation of the spleen to blood destruction and regeneration and to hemolytic jaundice: XIV. Changes in the blood following diversion of the splenic blood from the liver. A control study of the effects of splenectomy. **Journal of Experimental Medicine**, 1916.

L FAUSTMAN, D. Disposable No Longer: The Spleen Holds a Reservoir of Stem Cells. **Journal of Stem Cell Research & Therapy**, 2014.

LEITE, N. D. C. et al. Splenectomy attenuates obesity and decreases insulin hypersecretion in hypothalamic obese rats. **Metabolism: Clinical and**

Experimental, 2015.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios? Conceitos Fundamentais de Neurociências**. [s.l.: s.n.].

LEY, E. J. et al. Long-term effect of trauma splenectomy on blood glucose. **Journal of Surgical Research**, 2012.

LUDWIG, D. S. et al. Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, 2001.

LUU, S. et al. Impact of a spleen registry on optimal post-splenectomy vaccination and care. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, 2018.

MAARBJERG, S. J.; SYLOW, L.; RICHTER, E. A. **Current understanding of increased insulin sensitivity after exercise - emerging candidates**. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 2011.

MATHUR, N.; PEDERSEN, B. K. **Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation** *Mediators of Inflammation*, 2008.

MORO, E. et al. [Decrease of insulin resistance after splenectomy in a diabetic patient with liver cirrhosis and portal hypertension. Physiopathologic evaluation]. **Minerva gastroenterologica e dietologica**, 1994.

MORRISON, S. J.; WEISSMAN, I. L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. **Immunity**, 1994.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 1986.

MOSMANN, T. R. et al. Isolation of monoclonal antibodies specific for IL-4, IL-5, IL-6, and a new Th2-specific cytokine (IL-10), cytokine synthesis inhibitory factor, by using a solid phase radioimmunoabsorbent assay. **Journal of Immunology**, 1990.

MOURA, A. S. et al. Undernutrition during early lactation as an alternative model to study the onset of diabetes mellitus type II. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, 1996.

NOLTE-SCHLEGEL, I. et al. Dicionário de termos médicos. In: **Medizinisches Wörterbuch / Diccionario de Medicina / Dicionário de termos médicos**. [s.l.: s.n.].

O'KEEFFE, T. **The spleen as a diabetic organ; Rethinking trauma splenectomy** *Journal of Surgical Research*, 2014.

- OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, 1969.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Cuidados inovadores para condições crônicas: organização e prestação de atenção de alta qualidade às doenças crônicas não transmissíveis nas Américas**. [s.l: s.n.].
- PERSAUD, M. Embriologia Basica. **Guanabara Koogan**, 2000.
- PESTKA, S. et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annual Review of Immunology**, 2004.
- PETROIANU, A. et al. Plasma lipid alterations after total splenectomy, subtotal splenectomy and splenic auto-implants in rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, 2008.
- PSICOSSOCIAL, I. Obesidade infantil – impactos psicossociais. **Pediatria**, 2010.
- RAMADAN, J. W. et al. **The central role of calcium in the effects of cytokines on beta-cell function: Implications for type 1 and type 2 diabetes** *Cell Calcium*, 2011.
- ROPELLE, E. R. et al. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKK β and ER stress inhibition. **PLoS Biology**, 2010.
- RYU, S. et al. Reversal of established autoimmune diabetes by restoration of endogenous β cell function. **Journal of Clinical Investigation**, 2001.
- SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. **Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism** *Nature*, 2001.
- SAÚDE, M. DA. **Vigitel Brasil 2018: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquerito telefônico**. [s.l: s.n.].
- SCALLET, A. C.; OLNEY, J. W. Components of hypothalamic obesity: bipiperidyl-mustard lesions add hyperphagia to monosodium glutamate-induced hyperinsulinemia. **Brain Research**, 1986.
- SCOMPARIN, D. X. et al. Swim training applied at early age is critical to adrenal medulla catecholamine content and to attenuate monosodium l-glutamate-obesity onset in mice. **Life Sciences**, 2006.
- SINGH, B. Surrogate markers of insulin resistance: A review. **World Journal of Diabetes**, 2010.
- SPERETTA, G. F.; LEITE, R. D.; DUARTE, A. C. D. O. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. **Revista Hospital Universitário Pedro**

Ernesto, 2014.

T., F. et al. Multiprobiotic therapy prevents the development of experimental obesity.

United European Gastroenterology Journal, 2013.

TARANTINO, G. et al. Young adult obese subjects with and without insulin resistance: What is the role of chronic inflammation and how to weigh it non-invasively? **Journal of Inflammation**, 2009.

TIMPER, K.; BRÜNING, J. C. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: Pathways to obesity. **DMM Disease Models and Mechanisms**, 2017.

TSUCHITANI, M.; SATO, J.; KOKOSHIMA, H. **A comparison of the anatomical structure of the pancreas in experimental animals** **Journal of Toxicologic Pathology**, 2016.

VOLTERA, A. F. et al. Efeito da indução de obesidade neuroendócrina sobre a hemodinâmica sistêmica e a função ventricular esquerda de ratos normotensos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, 2008.

WATERS, K. A. et al. Structural equation modeling of sleep apnea, inflammation, and metabolic dysfunction in children. **Journal of Sleep Research**, 2007.

WATSON, R. T.; PESSIN, J. E. **Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation** **Recent Progress in Hormone Research**, 2001.

WHITEHEAD, J. P. et al. **Signalling through the insulin receptor** **Current Opinion in Cell Biology**, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/REGIONAL OFFICE FOR THE EASTERN MEDITERRANEAN. **WHO EMRO | Obesity | Health topics**.

WU, L. et al. Spleen supports a pool of innate-like B cells in white adipose tissue that protects against obesity-associated insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2014.

XU, A. et al. Interleukin-10 gene transfer into insulin-producing β cells protects against diabetes in non-obese diabetic mice. **Molecular Medicine Reports**, 2015.

ZECCHIN, H. .; CARVALHEIRA, J. B. .; SAAD, M. J. . **Mecanismos Moleculares de resistência à insulina na Síndrome Metabólica** **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**, 2004.

ZHANG, J. et al. Spleen-Derived Anti-Inflammatory Cytokine IL-10 Stimulated by Adipose Tissue-Derived Stem Cells Protects Against Type 2 Diabetes. **Stem Cells and Development**, 2017.

[49] S. Grassioli, F. A. Francisco, R. Torrezan, P. C. F. Mathias, S. L. Balbo. Regulação da insulinemia em ratos obesos, *Endocrinol. Diabetes Clin. Exp.* (2002). <http://www.revistaendocrino.com/page9.html>.

Table S1. Effect of MSG treatment on biometric and metabolic parameters.

	Control (n= 14)	MSG (n= 14)	p-value
Body Weight (g)			
At 21 days of life	48.50 ± 0.62	43.0 ± 0.84	
At 60 days of life	205.50 ± 1.53	146.50 ± 0.62	< 0.0001
At 90 days of life	346.0 ± 2.59	221.50 ± 1.83	
WAT-R (g/100 g BW)	0.81± 0.06	1.45± 0.06	< 0.0001
Lee Index	0.30 ± 0.01	0.33 ± 0.05	< 0.0001
NAL (cm)	23.25 ± 0.23	19.73 ± 0.39	< 0.0001
Glucose (mg/dL)	87.03 ± 15.29	71.07 ± 5.98	0.2987
Insulin (ng/mL)	0.87 ± 0.13	7.00 ± 1.01	< 0.0001
Insulinogenic Index	2.61 ± 0.45	6.15 ± 1.07	0.0088
Triglycerides (mg/dL)	135.8 ± 16.83	307.5 ± 32.42	< 0.0001
Total Cholesterol (mg/dL)	189.2 ± 8.17	161.2 ± 6.81	0.0171

Data are the mean ± SEM. Student's t-test (p <0.05). Legend: NAL: Naso-anal Length; WAT – R: White Adipose Tissue – Retroperitoneal; WAT – I: White Adipose Tissue – Inguinal.

Table 1. Biometric and metabolic plasmatic parameters in splenectomized non-obese rats.

	Control - Sham (n= 14)	Control-SPL₂₁ (n= 14)	Control-SPL₆₀ (n= 13)
Body Weight (g)	346.0 ± 2.59 ^{b,c}	281.50 ± 2.01 ^{a,c}	274.50 ± 0.97 ^{a,b}
NAL (cm)	23.25 ± 0.23	23.64 ± 0.28	23.50 ± 0.32
Lee Index	0.30 ± 0.001	0.30 ± 0.003	0.30 ± 0.005
Δ Body Weight (g)	141.0 ± 1.21 ^{b,c}	99.0 ± 1.07 ^{a,c}	82.50 ± 0.89 ^{a,b}
WAT – I (g/100g BW)	0.78 ± 0.12	1.08 ± 0.15	0.89 ± 0.13
WAT – R (g/100g BW)	2.15 ± 0.21	2.70 ± 0.11	2.50 ± 0.27
Feed Efficiency	336.37 ± 15.20 ^{b,c}	200.34 ± 16.55 ^a	169.23 ± 72.33 ^a
Glucose (mg/dL)	79.97 ± 8.61	56.07 ± 7.32	61.94 ± 6.58
Insulin (ng/mL)	0.87 ± 0.14	0.42 ± 0.19	1.09 ± 0.34
Triglycerides (mg/dL)	135.8 ± 16.83	176.4 ± 18.11	134.6 ± 14.77
Total Cholesterol (mg/dL)	189.2 ± 8.17 ^b	142.2 ± 11.36 ^a	160.2 ± 18.81

Data are the mean ± SEM. One - way ANOVA followed by Tukey post – test.

Letters above the numbers shows statistical differences (p <0.05) inside of Control or MSG-obese groups. ^a p <0.05 in relation to Sham; ^b p <0.05 in relation to SPL₂₁; ^c p <0.05 in relation to SPL₆₀. Legend: NAL: Naso-Anal Length; WAT – R: White Adipose Tissue – Retroperitoneal; WAT – I: White Adipose Tissue – Inguinal; BW: body weight.

Table 2. Biometric and metabolic plasmatic parameters in splenectomized Control (non-obese) rats.

	MSG-Sham (n= 14)	MSG- SPL₂₁ (n= 14)	MSG- SPL₆₀ (n= 11)
Body Weight (g)	221.50 ± 1.83 ^{b,c}	255.50 ± 1.70 ^{a,c}	175.50 ± 0.56 ^{a,b}
NAL (cm)	19.73 ± 0.39	20.83 ± 0.41	20.10 ± 0.48
Lee Index	0.33 ± 0.05	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01
Δ Body Weight (g)	75.50 ± 1.23 ^{b,c}	95.00 ± 0.93 ^{a,c}	52.00 ± 0.13 ^{a,b}
WAT – I (g/100g BW)	2.16 ± 0.20	2.37 ± 0.32	1.75 ± 0.20
WAT – R (g/100g BW)	2.80 ± 0.22	3.14 ± 0.28	3.85 ± 0.33
Feed Efficiency	158.36 ± 10.68 ^c	198.23 ± 6.98 ^c	96.86 ± 5.54 ^{a,b}
Glucose (mg/dL)	71.07 ± 5.98 ^c	69.86 ± 8.34	119.8 ± 19.40 ^a
Insulin (ng/mL)	7.75 ± 0.87 ^b	3.37 ± 0.31 ^a	4.85 ± 0.86
Triglycerides (mg/dL)	307.5 ± 32.42	230.7 ± 16.18	272.6 ± 34.28
Total Cholesterol (mg/dL)	161.2 ± 6.81	181.4 ± 13.05	167.5 ± 7.68

Data are the mean ± SEM. One - way ANOVA followed by Tukey post – test. Letters above the numbers shows statistical differences (p <0.05) inside of Control or MSG-obese groups. ^a p <0.05 in relation to Sham; ^b p <0.05 in relation to- SPL₂₁; ^c p <0.05 in relation to SPL₆₀. Legend: NAL: Naso-Anal Length; WAT – R: White Adipose Tissue – Retroperitoneal; WAT – I: White Adipose Tissue – Inguinal; BW: body weight

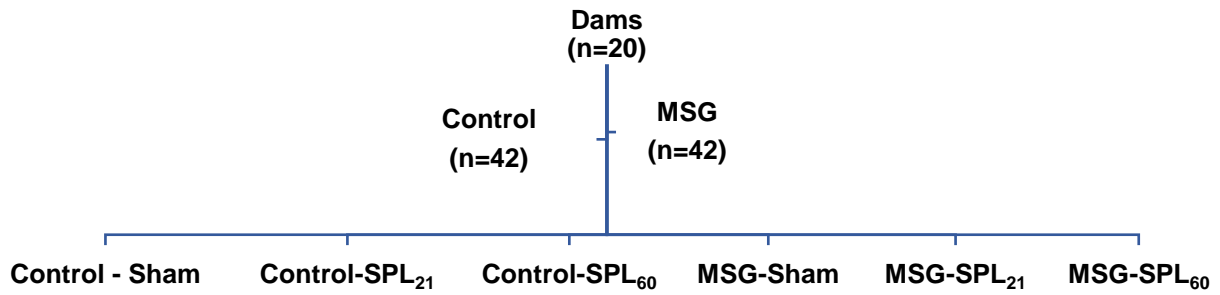


Figure S1. Flowchart.

Six experimental groups were formed (n = 11-14 rats/group): Control – Sham: non-obese sham-operated rats; Control – SPL₂₁: non-obese rats that were splenectomized on day 21; Control – SPL₆₀: non-obese rats that were splenectomized on day 60; MSG – Sham: sham-operated MSG rats; MSG – SPL₂₁: MSG rats that were splenectomized on day 21; MSG – SPL₆₀: MSG rats that were splenectomized on day 60. Independently of the time of SPL, all rats were evaluated at 90 days of life.

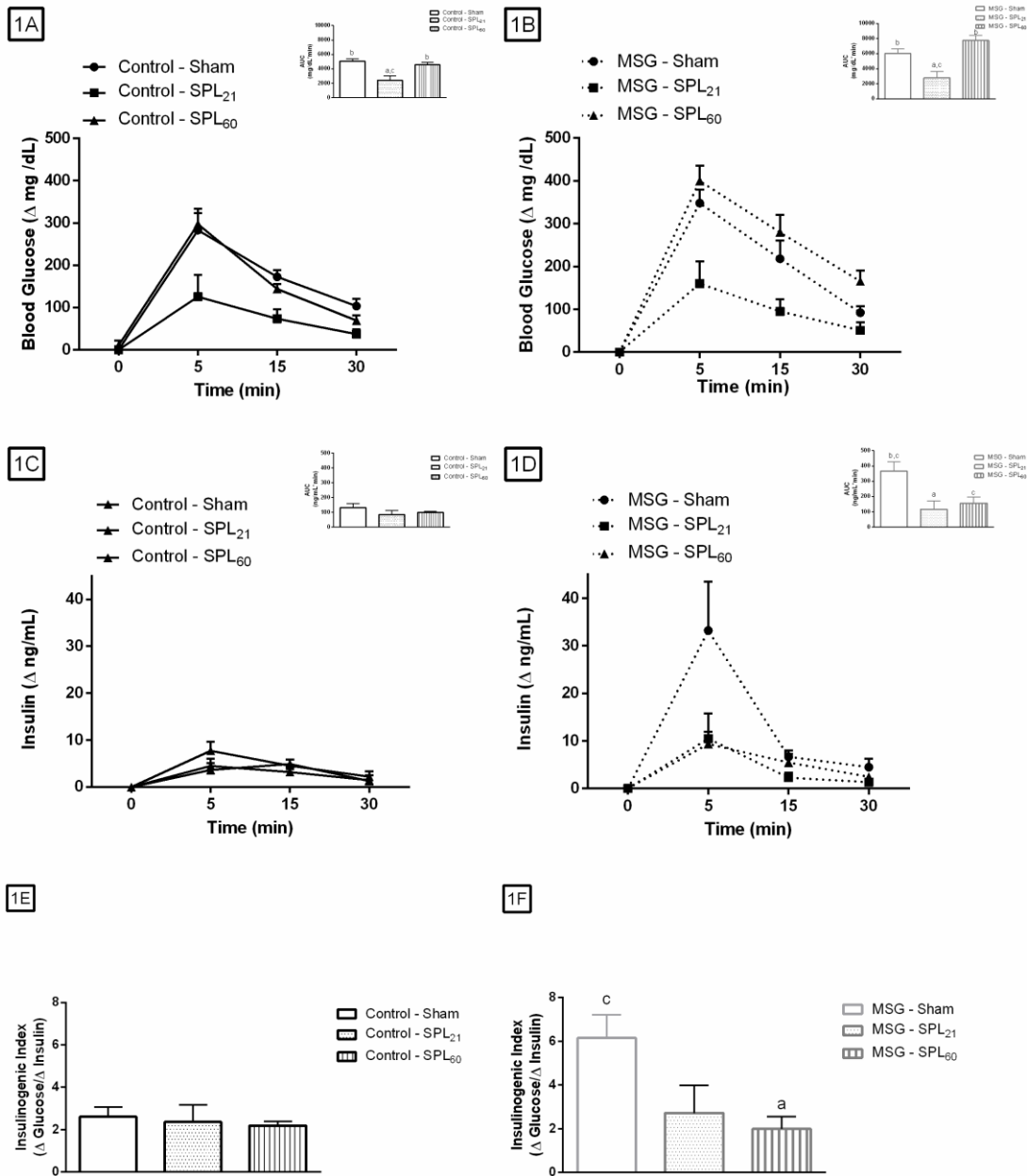


Figure 01. Effect of splenectomy at 21 or at 60 days of life on glucose tolerance in Control (non-obese) and MSG-obese rat.

Data are mean ± SEM n = 5-8 rats/group. Line graphs represent plasmatic value of glucose (1A; Control and 1B; MSG) and insulin (1C; Control and 1D; MSG) at long of time after glucose (1g/kg*BW). The respective AUC are in inset. The bar graphs (1E; Control and 1F; MSG) show the Insulinogenic Index, obtained by (ΔG ; mg/dL/ ΔI ; $\mu U/mL$). The letters above of bars represent statistical differences ($p < 0.05$) inside of group Control or MSG. ^a different in relation to Sham; ^b different in relation to SPL₂₁; ^c different in relation to SPL₆₀.

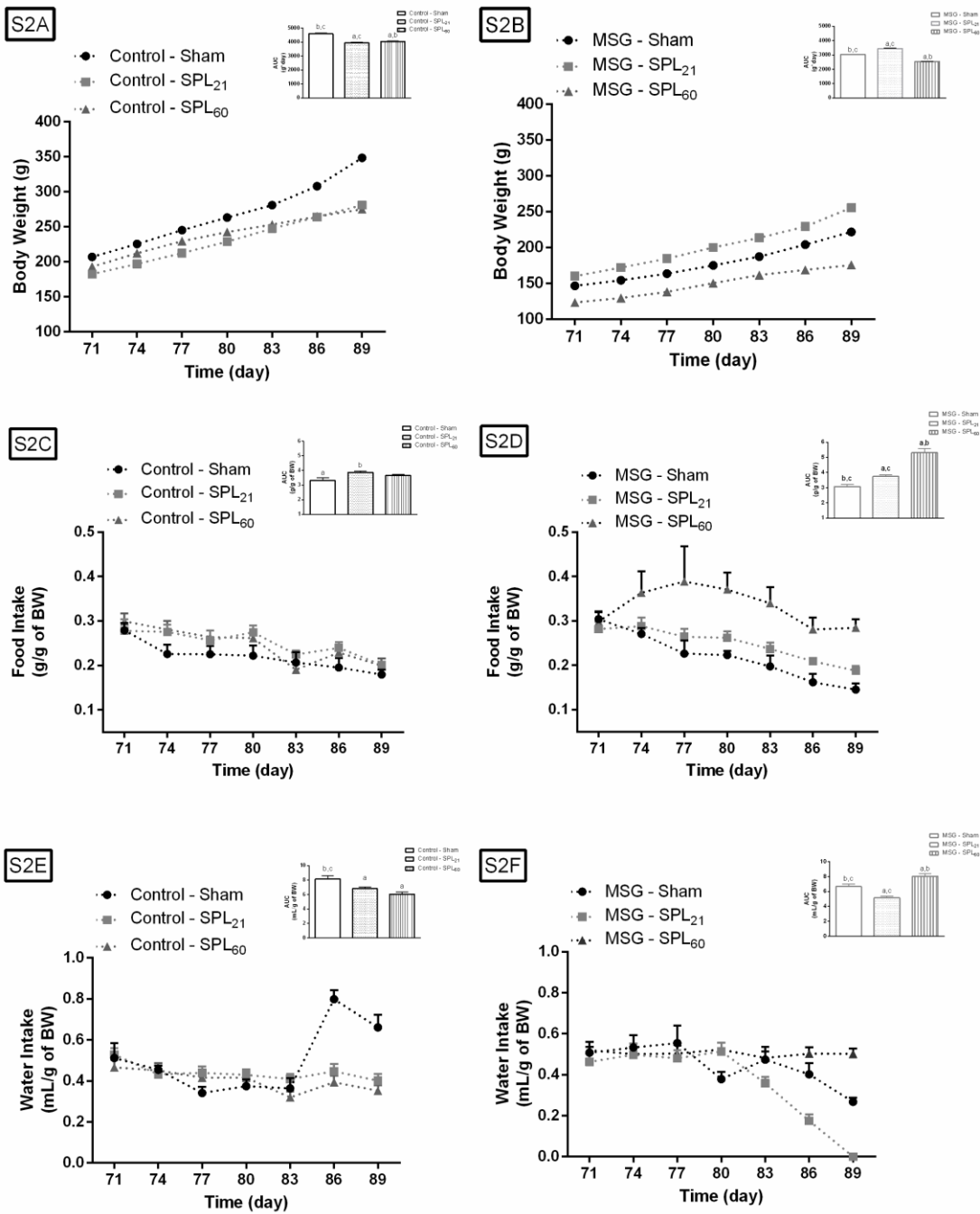


Figure S2. Body Weight Evolution and Food and Water intake ingestion in Control (non-obese) and MSG-obese splenectomised rats.

Data are mean \pm SEM n = 14rats/group. Line graphs (Controls 2A) and (MSG 2B) represent the BW (g), (Controls 2C) and (MSG 2D) represent the Food Intake (g/g of BW) and Water Intake (mL/g of BW) (Controls 2E) and (MSG 2G) with respective AUC in inset. The letters in the graphs represent statistical differences ($p < 0.05$) inside of group Control or MSG. ^a different in relation to Sham; ^b different in relation to SPL₂₁; ^c different in relation to SPL₆₀.

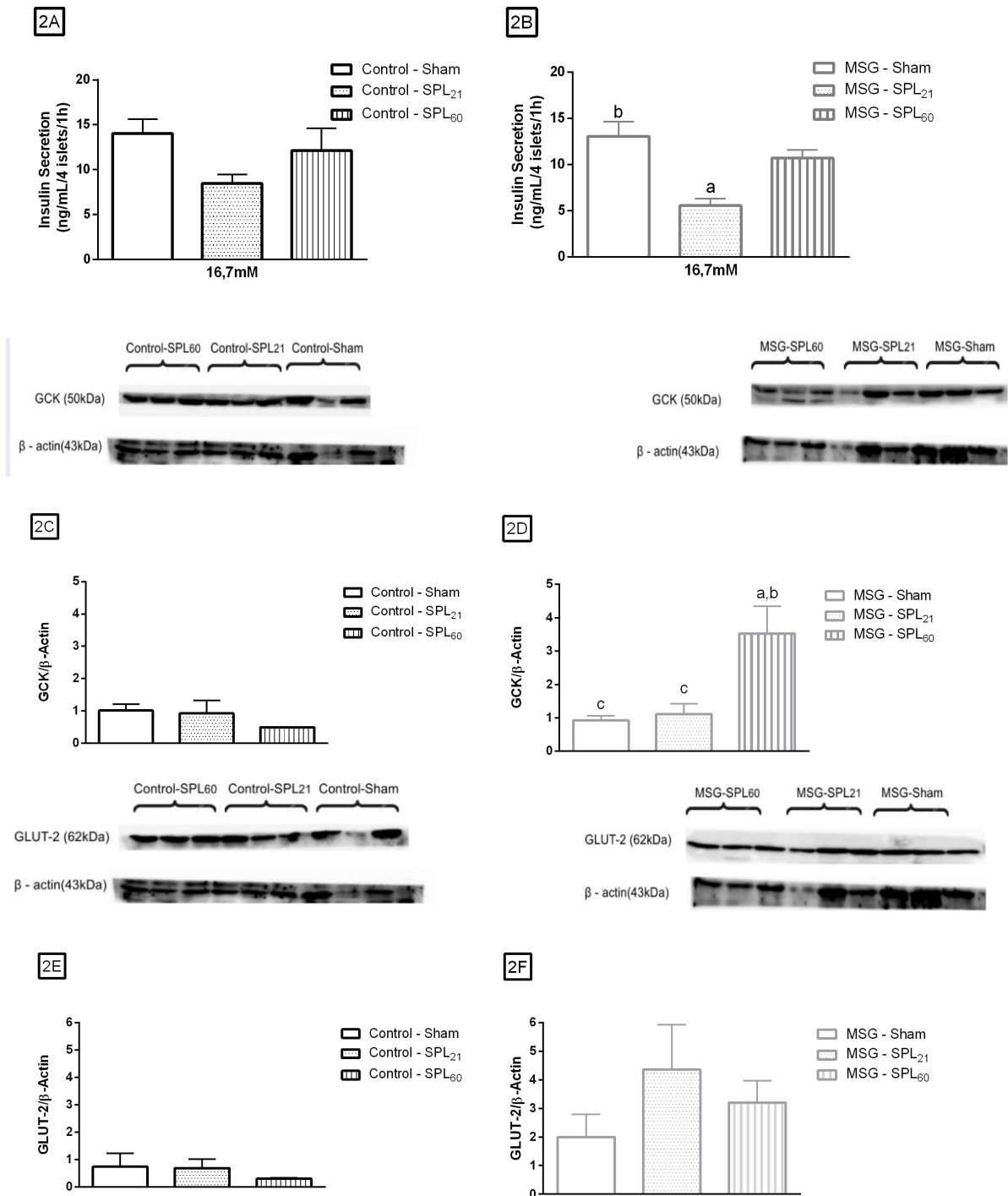


Figure 02. Effect of splenectomy on GIIS and GCK and GLUT-2 protein expression in isolated pancreatic islets from Control (non-obese) and MSG rats.

Data are mean \pm SEM. Islets were obtained from 3 - 4 rats/ group and GIIS (16.7mM) evaluated (2A; Control and 2B; MSG). Approximately, 100-150 isolated pancreatic islets were used to protein expression of GLUT-2 (2C; Control and 2D; MSG) and GCK (2E; Control and 2F; MSG). The letters in the graphs represent statistical differences ($p < 0.05$) inside of group Control or MSG. ^a different in relation to Sham; ^b different in relation to SPL₂₁; ^c different in relation to SPL₆₀.

CONCLUSÕES FINAIS

Em conclusão, a obesidade é uma patologia de caráter multifatorial e vem aumentando o número de pessoas acometidas por ela a cada dia no mundo todo, tornando um problema de saúde pública mundial. A retirada do baço reduz o peso corporal em ratos não obesos, apesar da hiperfagia, sugerindo gasto energético elevado. No entanto, nesses animais, a ausência do baço exerceu apenas um leve impacto na homeostase da glicose. Por outro lado, em condições de obesidade induzida por MSG, a retirada do baço corrigia a tolerância à glicose e reduzia a secreção de insulina, melhorando a sensibilidade à insulina, indicando que o baço influencia a homeostase da glicose em condições de obesidade. Entretanto, ainda são necessários mais estudos sobre como e por qual mecanismos a homeostase energética é influenciada por esse órgão.

REFERÊNCIAS GERAIS

A. HASSAN, Z. The Effects of Monosodium Glutamate on Thymic and Splenic Immune Functions and Role of Recovery (Biochemical and Histological study). **Journal of Cytology & Histology**, v.5, n.6, p1-9, 2014. Disponível em: <https://www.hilarispublisher.com/open-access/the-effects-of-monosodium-glutamate-on-thymic-and-splenic-immune-functions-and-role-of-recovery-biochemical-and-histological-study-2157-7099.1000283.pdf> Acesso em: 5 fev. 2020.

ALTUNKAYNAK, B. Z.; OZBEK, E.; ALTUNKAYNAK, M. E. A stereological and histological analysis of spleen on obese female rats, fed with high fat diet. **Saudi Medical Journal**, v.28, n.3, p.353-357, 2007. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/17334458> Acesso em: 5 fev.2020.

ANDREAZZI, A. E. et al. Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium L-glutamate-obesity in mice. **Journal of Endocrinology**, v. 201, n.3, p.351-359, 2009. Disponível em: <https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/201/3/351.xml> Acesso em: 5 fev. 2020.

ANDREW, P.; DENG, Y.; KAUFMAN, S. Fluid extravasation from spleen reduces blood volume in endotoxemia. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v.278, n.1, p.60-65, 2000. Disponível em: https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpregu.2000.278.1.R60?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed& Acesso em: 10 fev. 2020.

ANTINOZZI, P. A. et al. Mitochondrial metabolism sets the maximal limit of fuel-stimulated insulin secretion in a model pancreatic beta cell: A survey of four fuel secretagogues. **Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.14, p.11746-11755, 2002. Disponível em: <https://www.jbc.org/content/277/14/11746.full.pdf> Acesso em: 10 fev. 2020.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA ESTUDO DA OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA. **Mapa da obesidade.**

AVIRAM, M. et al. Increased low-density lipoprotein levels after splenectomy: A role for the spleen in cholesterol metabolism in myeloproliferative disorders. **American Journal of the Medical Sciences**, v.291, n.1, p.25-28, 1986. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0002962915370385> Acesso em: 10 fev. 2020.

BADER-MEUNIER, B. et al. Long-term evaluation of the beneficial effect of subtotal splenectomy for management of hereditary spherocytosis. **Blood**, v.297, n.1, p.399-402, 2001. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/97/2/399/52849/Long-term-evaluation-of-the-beneficial-effect-of> Acesso em: 10 fev. 2020.

BALBO, S. et al. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. **Endocrine**, v.31, s.n. p. 142-148, 2007. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12020-007-0021-z>

Acesso em: 10 fev. 2020.

BAZI, A. et al. Diabetes mellitus in thalassaemia major patients: A report from the Southeast of Iran. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.11, n.5, p.01-05, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5483650/> Acesso em: 08 fev. 2020.

BENOIT, S. C. et al. Insulin and leptin as adiposity signals Recent Progress in Hormone **Research**, p. 277-286, 2004.

BISHARAT, N. et al. Risk of infection and death among post-splenectomy patients. **Journal of Infection**, v.43, s.n. p.182-186, 2001. Disponível em: [https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(01\)90904-1/pdf](https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(01)90904-1/pdf) Acesso em: 18 fev. 2020.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1, p.248-254, 1976. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269776905273> Acesso em: 15 fev. 2020.

BRONTE, V.; PITTET, M. J. The spleen in local and systemic regulation of immunity **Immunity**, v.39, n.5, p.806-818, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3912742/pdf/nihms-538748.pdf> Acesso em: 18 fev. 2020.

CHANG, X.; WEI, C. Glycolysis and rheumatoid arthritis **International Journal of Rheumatic Diseases**, v.14, n.3, p.217-22, 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1756-185X.2011.01598.x> Acesso em: 15 fev. 2020.

CHEN, L. B.; JIANG, X. B.; YANG, L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. **World Journal of Gastroenterology**, v.10, n.20, p.3016-3020, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4576264/pdf/WJG-10-3016.pdf> Acesso em: 14 fev. 2020.

COLMAN, P. G. et al. Comparison of two commonly used standard IVGTTs. **Diabetes Care**, v.15, n.8, p.1053-1055, 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1505309/> Acesso em: 18 fev. 2020.

CURRY, D. L.; BENNETT, L. L.; GRODSKY, G. M. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. **Endocrinology**, v.83, n.3, p.572-584, 1968. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4877098/> Acesso em: 18 fev. 2020.

DAMESHEK, W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. **Blood**, v.6, n.4, p.372-375, 1951. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14820991/> Acesso em: 22 fev. 2020.

DAMESHEK, W. Chronic lymphocytic leukemia--an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. **Blood**, v.29, n.4, p.566-584, 1967. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6022294/> Acesso em: 22 fev. 2020.

DANGELO, J.G.; FATTINI, C.A. **Anatomia Humana: Sistêmica e segmentar**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2011

DAWSON, R.; WALLACE, D.R.; GABRIEL, S.M. A pharmacological analysis of food intake regulation in rats treated neonatally with monosodium L-glutamate (MSG).

Pharmacology Biochemistry And Behavior, [s.l.], v. 32, n. 2, p.391-398, fev. 1989. Elsevier BV. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.COM/science/article/pii/0091305789901688?via%3Dihub>>
 Acesso em: 10 abr. 2017.

DE BONA SCHRAIBER, R. et al. Diet-induced obesity causes hypothalamic neurochemistry alterations in Swiss mice. **Metabolic Brain Disease**, v.34, n.2, p.265-273, 2019. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/mdl-30635861> Acesso em: 25 mar. 2020.

DE QUEIROZ, J. C. F. et al. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.53, n.5, p.283-295, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/abem/v53n5/11.pdf> Acesso em: 25 mar. 2020.

DO PRADO, W. L. et al. Obesidade e adipocinas inflamatórias: Implicações práticas para a prescrição de exercício. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, , [s.l.], v.15, n.5, p.378-383, out. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbme/v15n5/12.pdf> Acesso em: 20 abr. 2017.

DUIVENVOORDEN, I. et al. Apolipoprotein C3 deficiency results in diet-induced obesity and aggravated insulin resistance in mice. **Diabetes**, v.54, n.3, p.664-671, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15734841/> Acesso em: 30 mar. 2020.

ESPOSITO, K. et al. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s.l.], v. 88, n. 3, p.1055-1058, mar. 2003. The Endocrine Society. Disponível em: <
<https://academic.oup.COM/jcem/article/88/3/1055/2845166/Association-of-Low-Interleukin-10-Levels-with-the>> Acesso em: 15 fev. 2017.

FLIER, J.S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. **Cell**, [s.l.], v.116, n.2, p.337-350, jan. 2004.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia** v.50. 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-27302006000200008&script=sci_arttext&tlng=pt Acesso em: 20 mar. 2015

FRIEDMAN, J.M., HALAAS, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, [s.l.], v.395, n.6704, p.763-770, out. 1998.

GALIC, S.; OAKHILL, J.S.; STEINBERG, G.R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Molecular And Cellular Endocrinology**, [s.l.], v. 316, n. 2, p.129-139, mar. 2010. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2009.08.018> Acesso em: 20 fev. 2017.

GARRAUD, O. et al. Revisiting the B-cell COMpartment in mouse and humans: more than one B-cell subset exists in the marginal zone and beyond. **Bmc Immunology**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.13-63, 2012. Springer Nature. Disponível em: <
<https://bmcimmunol.biomedcentral.COM/articles/10.1186/1471-2172-13-63>> Acesso em: 18 fev. 2017.

GOTOH, K. et al. Spleen-Derived Interleukin-10 Downregulates the Severity of High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 7, n. 12, p.1-10, 28 dez. 2012a. Public Library of Science (PLoS). Disponível em:

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0053154#references>
Acesso em: 25 maio 2017.

GOTOH, K. et al. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced inflammation in white adipose tissue and liver. **Diabetes**, [s.l.], v.61, p.1992-2003, 2012b.

GOTOH, K. et al. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced hypothalamic inflammation. **Journal of Neurochemistry**, [s.l.], v. 120, n. 5, p.752-764, 23 jan. 2012c. Wiley-Blackwell. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.COM/doi/10.1111/j.1471-4159.2011.07617.x/full> Acesso em: 25 maio 2017.2012c.

GRASSIOLLI, S. et al. Pancreatic islets from hypothalamic obese rats maintain K + ATP channel-dependent but not -independent pathways on glucose induced insulin release process. **Endocrine**, [s.l.], v.30, n.2, p.191-196, out. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17322578>> Acesso em: 05 abr. 2017.

GREGOR, M.F.; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. **Annual Review Of Immunology**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.415-445, 23 abr. 2011. Annual Reviews. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101322>> Acesso em: 20 fev. 2017.

GUARESCHI, Z. M. et al. Exercise and Vitamin D Supplementation Modify Spleen Morphology in Lean, but not, in Monosodium-Glutamate-Obese Rats. **Journal of Spleen and Liver Research**, v.1, n.3, p.1-14, 2019. Disponível em: <https://openaccesspub.org/jslr/article/1142> Acesso em: 29 abr. 2020.

GUILHERMET, R.-G.; COCHARD, A. Arginine: Wound healing, immune and endocrine functions [L'arginine. Fonctions cicatrisantes, immunitaires et endocrines]. **Cahiers de Nutrition et de Dietetique**, v.11, n.6, p.419-423, 1998. Disponível em: <https://www.essentialnutrition.com.br/media/artigos/procollagen/9.pdf> Acesso em: 15 fev. 2020.

GUIMARÃES, D.E.D. et al. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. **Revista de Nutrição**, [s.l.], v. 20, n. 5, p.549-559, out. 2007. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-52732007000500010&script=sci_arttext Acesso em: 12 fev. 2017.

GUSTAFSSON, P.A. et al. EPA supplementation improves teacher-rated behaviour and oppositional symptoms in children with ADHD. **Acta Paediatrica**, Oslo, v. 99, n. 10, p.1540-1549, out. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20491709> Acesso em: 22 ago. 2017.

HABERMALZ, B. et al. Laparoscopic splenectomy: The clinical practice guidelines of the European Association for Endoscopic Surgery (EAES). **Surgical Endoscopy and Other Interventional Techniques. Anais...**2008

HERNÁNDEZ BAUTISTA, R. J. et al. Obesity: Pathophysiology, monosodium glutamate-induced model and anti-obesity medicinal plants. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.111, s.n., p.503-516, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332218372718> Acesso em: 23 mar. 2020

HOLLIS, J. H. et al. Central interleukin-10 attenuates lipopolysaccharide-induced

changes in food intake, energy expenditure and hypothalamic Fos expression. **Neuropharmacology**, v.58, n.4, p.730-738, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20045008/> Acesso em: 15 mar. 2020.

HOUSTIS, N.; ROSEN, E.D.; LANDER, E.S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. **Nature**. v. 440, p.944-948, abr. 2006. Disponível em: <http://www.nature.COM/nature/journal/v440/n7086/full/nature04634.html?foxtrotcallback=true>> Acesso em: 20 fev. 2017.

INOUE, M. et al. Role of the spleen in the development of steatohepatitis in high-fat-diet-induced. **Experimental Biology and Medicine**, [s.l.], v.237, p.461-470, 2012.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J.. **Histologia Básica**. 10. ed. São Paulo: Guanabara Koogan S.A, 2004.

KIERSZENBAUM, A.L; TRES, L.L. **HISTOLOGIA E BIOLOGIA CELULAR: Uma Introdução à Patologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

KIZER, J.S.; NEMEROFF, C.B.; YOUNGBLOOD, W.W. Neurotoxic amino acids and structurally related analogs. **Pharmacological Reviews**. v.29, n.4, p.301-318, dez. 1978. Disponível em: < <http://pharmrev.aspetjournals.org/coment/29/4/301.long>> Acesso em: 05 abr. 2017.

KODAMA, T. et al. Role of interleukin-12 in the regulation of CD4+ T cell apoptosis in a mouse model of asthma. **Clinical And Experimental Immunology**, [s.l.], v. 131, n. 2, p.199-205, fev. 2003. Wiley-Blackwell.

KOH, D.S.; CHO, J.H.; CHEN, L. Paracrine interactions within islets of Langerhans. **Journal of Molecular Neuroscience**, Jan.

KRUMBHAAR, E. B.; MUSSER, J. H.; PEET, M. M. The relation of the spleen to blood destruction and regeneration and to hemolytic jaundice: XIV. Changes in the blood following diversion of the splenic blood from the liver. A control study of the effects of splenectomy. **Journal of Experimental Medicine**, v.1, n.16, p.87-95, 1916. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19867973/> Acesso em: 12 abr. 2020.

L FAUSTMAN, D. Disposable No Longer: The Spleen Holds a Reservoir of Stem Cells. **Journal of Stem Cell Research & Therapy**, v.4, n.7, p. 2-8, 2014. Disponível em: <https://www.longdom.org/open-access/disposable-no-longer-the-spleen-holds-a-reservoir-of-stem-cells-2157-7633.1000219.pdf> Acesso em: 25 mai. 2020.

LENT, R. **CEM BILHÕES DE NEURÔNIOS?: Conceitos fundamentais de neurociência**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2010. 742 p.

LEY, E.J. et al. Surgery Long-term effect of trauma splenectomy on blood glucose. **Journal of Surgical Research**, [s.l.], v.177, p.150-156, 2012.

LUDWIG, D.S. et al. Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical Investigation*,

[s.l.], v.107, n.3, p.379-386, fev. 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC199192/> Acesso em: 12 mar. 2017.

LUU, S. et al. Impact of a spleen registry on optimal post-splenectomy vaccination and care. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v.14, n.2, p.2894-2899, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30020861/> Acesso em: 22 abr. 2020.

MAARBJERG, S.J.; SYLOW, L.; RICHTER, E.A. Current understanding of increased insulin sensitivity after exercise-emerging candidates. **Acta physiologica**, Oxford, v.202, n.3, p.323-335, jul. 2011

MATHUR, N.; PEDERSEN, B. K. Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation **Mediators of Inflammation**, v.2008, s.n., p. 1-6, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2615833/pdf/MI2008-109502.pdf> Acesso em: 12 fev. 2020.

MORO, E. et al. [Decrease of insulin resistance after splenectomy in a diabetic patient with liver cirrhosis and portal hypertension. Physiopathologic evaluation]. **Minerva gastroenterologica e dietologica**, v.40, n.4, p.213-218, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7849151/> Acesso em: 22 fev. 2020.

MORRISON, S. J.; WEISSMAN, I. L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. **Immunity**, 1994.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology**. [s.l.], v.136, n.7, p.2348-2357, abr. 1986. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2419430> Acesso em: 13 abr. 2017

MOSMANN, T. R. et al. Isolation of MAbs specific for 114, IL5, and 116, and a new ThP-specific cytokine, cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF, ILIO), using a solid phase radioimmunoabsorbent assay. **Journal of Immunology**, [s.l.], v.145, n.1, p. 2938-2945, jul. 1990.

MOURA, A. S. et al. Undernutrition during early lactation as an alternative model to study the onset of diabetes mellitus type II. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, 1996.

NOLTE-SCHLEGEL, I. et al. Dicionário de termos médicos. In: **Medizinisches Wörterbuch / Diccionario de Medicina / Dicionário de termos médicos**. [s.l.: s.n.].

O'KEEFFE, T. The spleen as a diabetic organ; rethinking trauma splenectomy. **Journal of Surgical Research. COM**. 2013, p.103 – 104.

ORGANIZAÇÃO PAN – AMERICANA DE SAÚDE – OPAS. **Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégias mundiais sobre alimentação saudável, atividade física e saúde**, Organização Pan-Americana de Saúde, Brasília, 2003

OLNEY, J. W. Brain Lesions, Obesity, and Other Disturbances in Mice Treated with Monosodium Glutamate. **Science**, [s.l.], v.164, p.719-721, 1969.

PERSAUD, M. Embriologia Basica. **Guanabara Koogan**, 2000.

PESTKA, S. et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annual Review of Immunology**, v.22, s.n., p.929-279, 2004. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104622>

[?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18086114/)
Acesso em: 22 abr. 2020.

PETROIANU, A. et al. Plasma lipid alterations after total splenectomy, subtotal splenectomy and splenic auto-implants in rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v.23, n.7, p.221-224, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18086114/> Acesso em: 24 abr. 2020.

PSICOSSOCIAL, I. Obesidade infantil – impactos psicossociais. **Pediatria**, 2010.

RAMADAN, J.W. et al. The central role of calcium in the effects of cytokines on beta cell function: implication for type 1 and type 2 diabetes. **Cell calcium**, [s.l.], v.50, n.6, p. 481-490, dez. 2011.

ROPELLE, E. R. et al. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKK β and ER stress inhibition. **PLoS Biology**, v.8, n.8, p.1-20, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2927536/pdf/pbio.1000465.pdf>
Acesso em: 24 abr. 2020.

RYU, S. et al. Caffeine as a lipolytic food component increases endurance performance in rats and athletes. **Journal Of Nutritional Science And Vitaminology**, Tokyo, v. 47, n. 2, p.139-146, abr. 2001.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism **Nature**, v.444, s.n., p.799-806, 2001. Disponível em: <https://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/handle/2027.42/62568/414799a.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 2 abr. 2020.

SAÚDE, M. DA. **Vigitel Brasil 2018: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquerito telefônico**. [s.l.: s.n.].

SCALLET, A.C.E., OLNEY, J.W. Components of hypothalamic obesity: bipiperidylmustard lesions add hyperphagia to monosodium glutamate-induced hyperinsulinemia. **Brain Research**, [s.l.], v.334, n.2, p.380-384, 1986.

SCOMPARIN, D. X. et al. Swim training applied at early age is critical to adrenal medulla catecholamine content and to attenuate monosodium l-glutamate-obesity onset in mice. **Life Sciences**, v.79, n.22, p.2151-2156, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16934841/> Acesso em: 15 mai. 2020.

SINGH, B. Surrogate markers of insulin resistance: A review. **World Journal of Diabetes**, v.1, n.2, p.36-47, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3083884/> Acesso em: 4 mai. 2020.

SPERETTA, G.F.; LEITE, R.D.; DUARTE, A.C.O. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF- α e IL-10. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, [s.l.], v. 13, n. 1, mar. 2014. Universidade de Estado do Rio de Janeiro. Disponível em: http://revista.hupe.uerj.br/detalhe_artigo.asp?id=464 Acesso em: 22 maio 2017.

TARANTINO, G. et al. Young adult obese subjects with and without insulin resistance: what is the role of chronic inflammation and how to weigh it non-invasively? **Journal of Inflammation**, [s.l.], v.6, n.6, mar. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2663560/> Acesso em: 27 fev. 2017.

TIMPER, K.; BRÜNING, J. C. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: Pathways to obesity. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v.10,

n.6, p.679-689, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5483000/> Acesso em: 4 jun. 2020.

TSUCHITANI, M.; SATO, J.; KOKOSHIMA, H. A Comparison of the anatomical structure of the pancreas in experimental animals. **Journal of Toxicologic and Pathology**, [s.l.], v.29, p174-154, 2016.

VOLTERA, A.F. et al. Efeito da indução de obesidade neuroendócrina sobre a hemodinâmica sistêmica e a função ventricular esquerda de ratos normotensos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [s.l.], v. 52, n. 1, p.47-54, fev. 2008. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-27302008000100008&script=sci_arttext Acesso em: 01 fev. 2017.

WATERS, K.A. et al. Structural equation modeling of sleep apnea, inflammation, and metabolic dysfunction in children. **Journal Of Sleep Research**, [s.l.], v. 16, n. 4, p.388-395, dez. 2007. Wiley-Blackwell. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.COM/doi/10.1111/j.1365-2869.2007.00614.x/abstract;jsessionid=B2FAE425F68B1484B2C474E85B422B59.f02t04> Acesso em: 23 fev. 2017.

WATSON, R.T., PESSIN, J.E. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. **Recent Program Hormone Research**. v.2001. 2005, p.175 – 193

WHITEHEAD, J.P. et al. Signaling through the insulin receptor. **Current opinion in cell biology**, [s.l.], v.12, n.2., p.222-228, abr. 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/REGIONAL OFFICE FOR THE EASTERN MEDITERRANEAN. **WHO EMRO | Obesity | Health topics**.

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**, [s.l.], v. 111, n. 43, p.4638-4647, 13 out. 2014. Proceedings of the National Academy of Sciences. Disponível em : <http://www.pnas.org/comtent/111/43/E4638.full.pdf> Acesso em: 07 maio 2017.

XU, A. et al. Interleukin-10 gene transfer into insulin-producing β cells protects against diabetes in non-obese diabetic mice. **Molecular Medicine Reports**, v.12, n.3, p.3881-3889, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25998958/> Acesso em: 2 jun. 2020.

ZECCHIN, H.G.; CARVALHEIRA, J.B.; SAADM.J.A. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na Síndrome Metabólica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, São Paulo, v.14, n.4, p.574-589, 2004.

ZHANG, J. et al. Spleen-Derived Anti-Inflammatory Cytokine IL-10 Stimulated by Adipose Tissue-Derived Stem Cells Protects Against Type 2 Diabetes. **Stem Cells and Development**, v.26, n.24, p.1749-1758, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29032727/> Acesso em: 2 jun. 2020.

ANEXOS**ANEXO I: Aprovação do CEUA****unioeste**

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

PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "A participação esplênica nas anormalidades neuroendócrinas encontradas na obesidade hipotalâmica induzida pelo glutamato monossódico", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como APROVADO para execução

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer NÃO tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 13/06/2014

Dirceu Baumgartner
Coordenador do CEUA

Portaria no 1130/2014-GRE

ANEXO II: Protocolo de preparação da solução de Hanks

Reagentes	g/L
NaCl	8
KCl	0,4
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0,121
KH ₂ PO ₄	0,06
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,185
NaHCO ₃	0,35

Obs. O pH deverá ser conferido e acertado para 7,4.No momento de uso adicionar: 1g de glicose e 1g de albumina, por litro.

ANEXO III: Protocolo para preparação de solução de Krebs

Preparar as soluções de estoque 1, 2 e 3.

Solução	Sal	g/L
Solução 1	NaCl	26,8
Solução 2	NaHCO ₃	8
	KCl	1,6
	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,8
Solução 3	CaCl ₂ .2H ₂ O	1,6

Obs. No momento de uso, adicionar 25% de solução 1, 25% de solução 2, 25% de solução 3 e 25% de água, acertar o pH para 7,4.

ANEXO IV: Protocolo para preparação de tampão de ilhotas para Western Blotting

Para 20 mL de tampão:

- 500 μ L ou 0,074 g de EDTA;
- 8,41 g de ureia;
- 3,05 g de tioureia;
- 84 mg de NaF (100 mM);
- 90 mg de pirofosfato;

Completar com água miliQ.

Aliquotar frações de 1 mL em eppendorf e manter congelado.

Para a preparação da fração de 1 mL, primeiro preparar as seguintes soluções estoque:

1. Ortovanato 10 mM: 37.8 mg de ortovanato para uma solução de 200 μ L (adicionar cerca de 170 μ L de água miliQ);
2. PMSF: diluir 9 mg de PMSF em 1000 μ L de etanol;
3. Triton 10%: diluir 100 μ L de triton puro em 900 μ L de água miliQ.

Após a preparação das soluções estoque adicionar as seguintes quantidades na alíquota de 1 mL de tampão previamente preparado:

- 10 μ L de ortovanato;
- 50 μ L de PMSF; • 100 μ L de triton;
- 1 μ L de aprotinina pura.

Observações:

1. As soluções estoque de ortovanato, PMSF e triton, deverão ser preparadas no momento de uso e deverão ser descartadas, elas não deverão ser reutilizadas;
2. Todos os eppendorfs e ponteiros utilizados deverão ser estéreis;
3. A solução de tampão aliquoteada poderá ser armazenada por um grande tempo, desde que esteja devidamente congelada;
4. Depois da solução pronta para uso, esta deverá ser mantida em geladeira, até sua adição às ilhotas.