

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

KAMILA APARECIDA MEDEIROS

**INFLUÊNCIA DA VAGOTOMIA E/OU ESPLENECTOMIA SOBRE A
ESTRUTURA MORFOLÓGICA RENAL EM RATOS OBESOS-MSG**

FRANCISCO BELTRÃO – PR
(AGOSTO/2020)

KAMILA APARECIDA MEDEIROS

**INFLUÊNCIA DA VAGOTOMIA E/OU ESPLENECTOMIA SOBRE A
ESTRUTURA MORFOLÓGICA RENAL EM RATOS OBESOS-MSG**

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

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. João Paulo de Arruda Amorim

Coorientadora: Dra. Elaine Manoela Porto-Amorim

FRANCISCO BELTRÃO – PR
(AGOSTO/2020)

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

Medeiros, Kamila Aparecida

Influência da vagotomia e/ou esplenectomia sobre a estrutura morfológica renal em ratos obesos- msg / Kamila Aparecida Medeiros; orientador(a), João Paulo de Arruda Amorim; coorientador(a), Elaine Manoela Porto Amorim , 2020.

74 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Francisco Beltrão, Centro de Ciências Sociais Aplicadas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, 2020.

1. Obesidade hipotalâmica. 2. Vagotomia. 3. Esplenectomia. 4. Rim. I. de Arruda Amorim, João Paulo . II. Porto Amorim , Elaine Manoela . III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

KAMILA APARECIDA MEDEIROS

**INFLUÊNCIA DA VAGOTOMIA E/OU ESPLENECTOMIA SOBRE A
ESTRUTURA MORFOLÓGICA RENAL EM RATOS OBESOS-MSG**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. João Paulo de Arruda Amorim
UNIOESTE – Campus Cascavel

Membro da banca: Profa. Dra. Luciana Bill Mikito Kottwitz
UNIOESTE – Campus Cascavel

Membro da banca: Profa. Dra. Jociléia Thums Konerat
UNIOESTE – Campus Cascavel

FRANCISCO BELTRÃO, PR
AGOSTO/2020

DEDICATÓRIA

Aos meu pais, Artur e Terezinha;
Aos meus irmãos Diego e Andreia;
À Alaba, Aline e Anna;
À memória de Arlindo e Matilde.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Figura 1 – Fotomicrografia representativa das medidas de diâmetro do tufo glomerular (a), área do tufo glomerular (b) e área da Cápsula de Bowman (c) e (*) do espaço de Bowman.....28

Figura 2 – Fotomicrografia da estrutura histológica renal de animais dos diferentes grupos experimentais..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros biométricos dos diferentes grupos ao final do período experimental.....45

Tabela 2 – Histomorfometria glomerular dos diferentes grupos experimentais ao final do período experimental.....47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARQ – Núcleo Arqueado
CON - Controles
DLP – Dislipidemia
DM2 – Diabetes Mellitus Tipo 2
DRC – Doença Renal Crônica
FO – Falso Operado
GRO – Glomerulopatia Relacionada à Obesidade
HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica
HE – Hematoxilina e Eosina
IL- Interleucina
IL-1 – Interleucina 1
IL-2 – Interleucina 2
IL-4 – Interleucina 4
IL-5 – Interleucina 5
IL-6 – Interleucina 6
IL-10 – Interleucina 10
IMC – Índice de Massa Corporal
LT – Linfócitos T
LT CD4 – Linfócitos T CD4
MSG – Glutamato Monossódico
MSG ESP – MSG Esplenectomizado
MSG FO – MSG Falso Operado
MSG VAG – MSG Vagotomizado
MSG VAG - ESP – MSG Vagotomizado e Esplenectomizado
NK – Natural Killer
NMDA – N-Metil-D-Aspartato
NO – Óxido Nítrico
PA – Pressão Arterial
RI – Resistência à insulina
SM – Síndrome Metabólica
SNAR – Sistema Nervoso Autônomo Renal
SNA – Sistema Nervoso Autônomo

SNC – Sistema Nervoso Central

SNE – Sistema Nervoso Entérico

SNS – Sistema Nervoso Simpático

SNP – Sistema Nervoso Parassimpático

TGF- β 1 – Fator de Crescimentos Transformante – β

Th – T *helper*

Th 1– T *helper* 1

Th 2 – T *helper* 2

Th 17 – T *helper* 17

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- α

UI – Unidade Internacional

INFLUÊNCIA DA VAGOTOMIA E/OU ESPLENECTOMIA SOBRE A ESTRUTURA MORFOLÓGICA RENAL EM RATOS OBESOS-MSG

Resumo

A doença renal crônica (DRC) é um dos mais importantes problemas de saúde pública em todo o mundo, e suas principais implicações envolvem danos às estruturas do néfron e perda da função renal. Estudos evidenciam que a obesidade é um fator de risco independente para DRC. A obesidade provoca diversas alterações estruturais, hemodinâmicas e metabólicas no rim. A maioria dessas alterações podem ser de respostas compensatórias ao aumento sistêmico da demanda metabólica observada na obesidade. No entanto, em alguns casos a lesão renal torna-se clinicamente afetada em consequência da falha compensatória. A glomerulopatia relacionada à obesidade (GRO) é o mais conhecido. O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação das atividades esplênica e autonômica vagal sobre aspectos histomorfométricos renais em roedores obesos-MSG. Trinta ratos Wistar machos foram utilizados, destes, vinte e quatro receberam durante os primeiros 5 dias de vida injeções subcutâneas de Glutamato monossódico (Grupos MSG) (4g/Kg de peso corporal), e seis animais receberam injeções subcutâneas de solução salina (grupo controle). Considerando a indução de obesidade com MSG, a esplenectomia e a vagotomia, foram organizados 5 grupos experimentais (n=6/grupo), conforme segue: Controle falso operado (CON-FO); obeso falso operado (MSG-FO); obeso vagotomizado (MSG-VAG); obeso esplenectomizado (MSG-ESP); obeso vagotomizado e esplenectomizado (MSG-VAG-ESP). Aos 150 dias os animais foram pesados e eutanasiados. O rim foi retirado, pesado e submetido a técnicas histológicas de fixação, desidratação e emblocamento. Os cortes foram corados pela técnica de HE e submetidos à análise histomorfométrica. Os animais do grupo MSG-FO apresentaram redução significativa de peso corporal e comprimento naso-anal quando comparados com os animais do grupo CON-FO ($P < 0,05$). A dupla cirurgia de vagotomia e esplenectomia (MSG-VAG-ESP), apresentaram redução significativa da maioria dos parâmetros biométricos associados a obesidade. Na análise histomorfométrica dos parâmetros renais, os animais MSG-FO apresentaram redução significativa do

peso renal e dos diâmetros de área de tufo glomerular, área da cápsula e espaço de Bowman quando comparados com os animais do grupo CON-FO ($P < 0,05$). Na análise dos parâmetros renais dos grupos MSG-VAG, MSG-ESP, MSG-VAG-ESP observou-se redução significativa no diâmetro, área de tufo glomerular, área da cápsula e espaço de Bowman quando comparados com o grupo MSG-FO. Concluímos que a vagotomia associada ou não a esplenectomia induz a redução da adiposidade e causa alterações histológicas nos rins de ratos obesos.

Palavras-chave: Obesidade hipotalâmica, Vagotomia, Esplenectomia, Rim.

VAGOTOMY OR SPLENECTOMY INFLUENCE IN THE RENAL MORPHOLOGICAL STRUCTURE OF OBESE-MSG RATS

Abstract

Chronic kidney disease (CKD) is one of the most important public health problems worldwide, and its main implications involve damage to nephron structures and loss of kidney function. Studies show that obesity is an independent risk factor for CKD. Obesity causes several structural, hemodynamic and metabolic changes in the kidney. Most of these changes can be compensatory responses to the systemic increase in metabolic demand observed in obesity. However, in some cases, kidney damage becomes clinically affected as a result of compensatory failure. Obesity-related glomerulopathy (GRO) is the best known. The aim of the work was to evaluate the relation of autonomic vagal and splenic activities on renal histomorphometric aspects in MSG-obese rodents. Thirty male Wistar rats were used, of which, twenty-four received subcutaneous injections of monosodium glutamate (MSG group) during the first 5 days of life (4g/kg body weight) and six animals received subcutaneous injections of equimolar saline solution (control group). They were assigned to five experimental groups (n = 6/group): False operated control (CON-FO); false operated obese (MSG-FO); vagotomized obese (MSG-VAG); splenectomized obese (MSG-ESP); vagotomized and splenectomized obese (MSG-VAG-ESP). At 150 days, the animals were weighed and euthanized. The kidney was removed, weighed and subjected to histological techniques for fixation, dehydration and embedding. Sections were stained with HE and subjected to histomorphometric analysis. MSG-FO group animals showed a significant reduction in body weight and snout-anus length, and a significant increase in obesity

parameters when compared to CON-FO group animals ($P < 0.05$). Vagotomy and splenectomy surgeries, either alone or in combination, significantly reduced most of the biometric parameters associated with obesity. The kidneys of MSG-FO group animals showed altered histological structure, associated with a significant reduction in renal weight and diameters of glomerular tuft area, capsule area and the Bowman space when compared to CON-FO group animals ($P < 0.05$). In the analysis of renal parameters of the MSG-VAG, MSG-ESP, MSG-VAG-ESP groups, there was a significant reduction in diameter, glomerular tuft area, capsule area, Bowman's space area when compared to the MSG-FO group, mainly in groups subjected to vagotomy alone or combined with splenectomy. We conclude that vagotomy in associated or not with splenectomy induces a reduction in adiposity and causes histological changes in the kidneys of obese rats.

Key words: Hypothalamic obesity, Vagotomy, Splenectomy, Kidney.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL -----	
2. OBJETIVOS -----	26
2.1 Geral -----	26
2.2 Específicos -----	26
3. METODOLOGIA -----	27
4. REFERÊNCIAS -----	31
5. INFLUÊNCIA DA VAGOTOMIA E/OU ESPLENECTOMIA SOBRE A ESTRUTURA MORFOLÓGICA RENAL EM RATOS OBESOS- MSG -----	39
6. ANEXOS -----	64

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Sistema renal é composto por dois órgãos denominados de rins. Esse sistema realiza a maior parte das funções de excreção, filtrando o sangue e removendo as toxinas da corrente sanguínea, no entanto, conserva-se sais, glicose, proteínas e água, bem como substâncias adicionais cruciais à saúde. Os rins possuem um sistema de tubos condutores do produto final deste filtrado, que é a urina, na qual denominamos de vias urinárias, que são compostas por pelve renal, ureteres, bexiga urinária e uretra (SILVERTHORN, 2010).

Considera-se os rins estruturas retroperitoneais, posicionados na região abdominal, revestidos pelo peritônio e envolvidos por um tecido areolar frouxo, superficialmente revestido por uma túnica fibrosa, conhecida como cápsula fibrosa. Apresentam coloração marrom escuro, formato de grão de feijão e possuem, aproximadamente, 12 cm de altura, de 5 a 7,5 cm de largura e 2,5 cm de espessura, com variação de peso entre 115 a 170 gramas (SILVERTHORN, 2010). Dispõem de um ápice, uma base, faces e margens distintas. Na face medial côncava encontramos fissura longitudinal designada de hilo renal. O hilo renal permite a entrada e saída de estruturas dos rins, o seio renal, que contém a pelve renal, cálices, vasos, nervos e gordura (TSUBOI *et al.*, 2017).

No rim encontramos duas estruturas essenciais, córtex renal e medula renal, ambos compondo-se de segmentos de néfrons, apontado como principal unidade funcional do rim. Encontra-se duas variedades de néfrons no rim de animais: néfrons corticais e os néfrons justamedulares, da qual o corpúsculo renal está localizado no córtex e as partes tubulares situadas na medula. O corpúsculo renal é formado pela cápsula de Bowman e pelo glomérulo renal, tufo de capilares fenestrados com polo vascular e o urinífero que é a região de continuação entre o corpúsculo renal e o túbulo proximal, o qual drena o espaço de Bowman. Nesta região de junção, o epitélio simples pavimentoso da camada parietal da cápsula de Bowman se junta com o epitélio cúbico simples do túbulo (TOBAR *et al.*, 2013).

O filtrado derivado do glomérulo entra no espaço de Bowman por meio de uma barreira de filtração formada por três estruturas: parede endotelial do capilar, lâmina basal e camada visceral da cápsula de Bowman, os podócitos. O fluido filtrado passa por um túbulo longo, no qual é transformado em urina a caminho do rim, ureteres e, posteriormente, para a bexiga e uretra (JOYCE *et al.*, 2018).

A inervação dos rins origina-se do plexo nervoso renal, formado por fibras simpáticas. Essas fibras circundam e seguem os vasos arteriais por meio do córtex e medula. O plexo nervoso renal é suprido por fibras do nervo esplâncnicos abdominopélvicos. Trabalhos científicos expõem a hipótese de inúmeros mecanismos associados no desenvolvimento da insuficiência renal, envolvendo a hiperatividade renal crônica, hiperatividade simpática renal, disfunção autonômica, estresse oxidativo, diferenças entre os sexos (SHARMA, 2015; TAIN; HSU, 2017).

A doença renal crônica (DRC) é um dos mais importantes problemas de saúde pública em todo o mundo, e suas principais implicações envolvem danos às estruturas do néfron e perda da função renal. Apresenta caráter progressivo e está relacionada à elevada morbidade e mortalidade (KARIYANNA *et al.*, 2010) A DRC é identificada pela destruição gradativa de néfrons provocado pelo aumento da pressão intraglomerular e hiperfiltração. Os mecanismos patogênicos que influenciam à DRC convergem em um meio em comum, no qual resulta em fibrose intersticial progressiva, perda capilar peritubular com hipóxia e destruição de néfrons funcionais em consequência à atrofia tubular (EDDY, 2005; VIANNA *et al.*, 2011).

Atualmente, tem-se considerado o papel da inflamação subclínica na evolução das doenças crônico-degenerativas (DORR *et al.*, 2015). A inflamação é apontada como processo fisiológico, no qual há presença de resposta a diferentes estímulos como infecções, alterações fisico-químicas e antigênicas ou danos traumáticos. A resposta inflamatória precisa ser rigorosamente ordenada, visto que deficiências ou excessos de resposta estão intimamente associadas a morbidade e mortalidade. Por exemplo, a inflamação que iniciou-se no glomérulo em virtude de algum trauma, provoca inúmeros mecanismos lesivos através da ativação do sistema imunológico de forma contínua e acentuada, que pode ser capaz de afetar o espaço do túbulo intersticial. Nesse cenário, há evidências de ativação do sistema imune sobre etapas precoces e tardias da DRC. Em contrapartida, estudos revelam a existência de relação negativa entre níveis circulantes de mediadores de inflamação e o estágio da doença (KIUCH *et al.*, 2015).

Estudos evidenciam que a obesidade é um fator de risco independente para DRC (AGRAWAL *et al.*, 2009; BRATOEVA *et al.*, 2017). Pesquisa mostra que pacientes norte-americanos obesos apresentam risco quatro vezes maior de desenvolver DRC que pacientes não obesos. Acredita-se que a obesidade interfere

nas alterações fisiopatológicas que favorecem a lesão renal. O aumento de lipídeos nos macrófagos é capaz de transformar o fenótipo das células e beneficiar o aparecimento de um ambiente pró-inflamatório responsável pelas alterações fisiopatológicas do rim relacionados à obesidade. Há evidências de associação de inúmeras citocinas pró-inflamatórias produzidas pelo tecido adiposo e por células inflamatórias às lesões renais provocadas pela obesidade (HERING *et al.*, 2013). Outro mecanismo, supostamente, envolvido na manifestação da DRC em pacientes obesos, é a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (DORR *et al.*, 2015).

Encontra-se em pesquisa, com animais experimentais, informações à respeito de mecanismos ligados às alterações cardiovasculares e renais relacionados à obesidade (HALL *et al.*, 2014). A obesidade provoca diversas alterações estruturais, hemodinâmicas e metabólicas no rim. A maioria dessas alterações podem ser de respostas compensatórias ao aumento sistêmico da demanda metabólica observada na obesidade. No entanto, em alguns casos a lesão renal torna-se clinicamente afetada em consequência da falha compensatória. A glomerulopatia relacionada à obesidade (GRO) é o mais conhecido de tais estados de doença (WU *et al.*, 2006).

Na literatura, encontramos a associação entre glomerulopatia e inflamação. Destaca-se que as doenças glomerulares indicam deterioração com maior velocidade da função renal quando comparadas a outras etiologias de DRC. A lesão glomerular pode ser provocada por diversos mecanismos imunológicos. Independente do mecanismo, a lesão ocorre inicialmente com a produção de mediadores inflamatórios que favorecem a ativação de leucócitos, macrófagos e células intrínsecas do glomérulo renal. Seguidamente, ocorre aumento da resposta inflamatória através da ativação dos linfócitos e macrófagos mediados pelo aumento da produção de citocinas e quimiocinas, provenientes das células inflamatórias e células glomerulares intrínsecas. Simultaneamente, ocorre a ativação das células mesangiais, estimulada pelo processo imunológico subjacente e também pelo estímulo de mediadores locais liberados pelas células inflamatórias e residentes (BRATOEVA *et al.*, 2017).

Encontra-se evidências clínicas e experimentais que comprovam o papel das citocinas e quimiocinas no desenvolvimento e progressão da DRC nas doenças glomerulares (EDDY, 2005). Em modelo animal de glomerulopatia, estudos

mostram que a citocina fibrogênica TGF- β 1 estimula a proliferação celular mesangial e em seguida a instalação da fibrose. Outros estudos revelam que a utilização de antagonista de receptor de IL-1 é capaz de melhorar a lesão renal em modelo experimental de glomerulopatia crescêntica (AGRAWAL *et al.*, 2009; BRATOEVA *et al.*, 2017).

A atividade simpática, através de diversos mecanismos, também pode estar associada à evolução da insuficiência renal. Estudos evidenciam que com a estimulação do nervo simpático renal ocorre um aumento da produção e liberação de noradrenalina, por outro lado, quando há interrupção da estimulação nervosa simpática, ocorre redução da sua produção e liberação. No momento em que os nervos simpáticos renais são estimulados, os receptores beta-1 aumentam a secreção de renina e os alfa-1 aumentam a reabsorção renal, propiciando vasoconstrição renal e redução do fluxo sanguíneo renal (GRASSI *et al.*, 2012). Na DRC, a hiperatividade simpática é evidenciada na fase clínica mais precoce da doença, revelando associação direta com a gravidade do estado de insuficiência renal (SCHLAICH *et al.*, 2013). O aumento do tônus simpático altera significativamente a função renal, em consequência de retenção de volume, reabsorção de sódio, redução do fluxo sanguíneo renal e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (LUO *et al.*, 2013).

Estudos têm evidenciado que a função renal comprometida é um fator de risco cardiovascular independente. A atividade nervosa simpática muscular basal foi significativamente maior em hipertensos com insuficiência renal leve, em comparação com hipertensos com função renal normal e com normotensos (DOLTRA *et al.*, 2014; BRANDT *et al.*, 2012). Outro estudo recente, mostrou que portadores de DRC apresentaram denervação renal simpática, conseqüentemente alterações na estrutura renal (MAHMOODI *et al.*, 2012).

Obesidade, Baço e atividade esplênica

A obesidade é uma doença caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo em um nível que compromete a saúde dos indivíduos, acarretando alterações nas funções fisiológicas, hormonais, neurais e imunológicas, além de constituir um fator de risco para enfermidades tais como dislipidemias, doenças

cardiovasculares, diabetes *melitus* tipo II e alguns tipos de câncer. Encontra-se na literatura um consenso de que a etiologia da obesidade é bastante complexa, apresentando um caráter multifatorial, envolvendo, portanto, uma série de fatores (COCKS *et al.*, 2013; CUNHA *et al.*, 2010). Atualmente, a obesidade tem sido apontada como a mais importante desordem nutricional global que tem avançado nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, devido ao aumento significativo da sua incidência (EGGERS *et al.*, 2016).

Na obesidade, o aumento do tecido adiposo está diretamente relacionado ao desenvolvimento do desajuste metabólico que reúne alterações, principalmente, cardiovasculares, renais e hepáticas, uma vez que se torna disfuncional (MORCELLI *et al.*, 2018; RAHMOUNI *et al.*, 2005; TADA; MIURA, 2018). O tecido adiposo é um dos principais focos das pesquisas em obesidade e já está claro que o tecido adiposo branco que era visto apenas como um depósito de energia é, atualmente, reconhecido como foco principal do processo inflamatório que ocorre na obesidade, capaz de produzir uma ampla variedade de fatores conhecidos como adipocinas (LOBATO *et al.*, 2011). Essas proteínas secretadas envolvem o Fator Tumoral de Necrose (TNF- α), interleucinas (IL), adiponectina, resistina, leptina, entre outras, as quais exercem inúmeras funções, apresentando formas e propriedades estruturais das citocinas e compreendem proteínas relacionadas ao sistema imune (KORBUT, 2006; NAVARRO; ARDILES, 2015; GUZIK; MANGALAT; KORBUT, 2006).

O baço é considerado o maior órgão linfóide do organismo, situado no hipocôndrio esquerdo, sob a proteção da arcada costal. Várias funções de extrema importância são desempenhadas pelo baço: função hematopoiética, função imunológica, função de armazenamento de células sanguíneas, função de hemocaterese, função de regulação lipídica. Do ponto de vista hematológico, podemos ressaltar que o órgão age como um filtro fagocítico, através da remoção com destruição das células senescentes e defeituosas da circulação, partículas sólidas a partir do citoplasma dos eritrócitos e microrganismos trazidos pelo sangue, além de atuar na resposta imune, com a produção de anticorpos (SILVERTHORN, 2010).

Órgão constituído de tecido mole, muito vascularizado, de coloração púrpura e com relativa mobilidade, o baço consiste em três regiões funcionais a polpa vermelha, a polpa branca e a zona marginal. A massa principal desse órgão é

formada pela polpa vermelha e os linfócitos envolvem as arteríolas que o penetram, compondo áreas da polpa branca, da qual a região mais interna é dividida em uma camada linfoide periarteriolar, compreendendo principalmente células T e revestidas por uma coroa de célula B. Apresenta duas faces, uma diafragmática e outra visceral, na qual está presente o hilo, onde ocorre a passagem dos elementos neurovasculares do órgão. A artéria esplênica, que varia de 8 a 32 cm de comprimento, passa pela superfície pósterio-superior do corpo e da cauda do pâncreas (OLIVEIRA *et al.*, 2008; SILVERTHORN, 2010).

O baço é o único órgão capaz de realizar hemocaterese, processo esse em que as hemácias velhas ou parasitadas, por perderem a sua flexibilidade e por não conseguirem penetrar nos sinusoides, são fagocitadas e destruídas pelos macrófagos. Esse órgão contém mais de 15% dos macrófagos de todo o organismo, assim como um número considerável de linfócitos T (LT) e células Natural Killer (NK), das quais produzem inúmeras citocinas que atuam como mediadores da comunicação intercelular, regulando a resposta imunológica por meio da maturação, proliferação, diferenciação, ativação ou inibição de diferentes células do sistema imunológico (WU *et al.*, 2014).

O Fator de Necrose Tumoral TNF α , foi descoberto em 1975 por Carswell *et al.*, sendo considerado uma das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios e imunes. O baço é a fonte primária na produção de TNF α durante a endotoxemia letal. A literatura evidencia que em ratos esplenectomizados há redução significativa nos níveis de TNF α . Encontra-se, em estudos, considerável relação entre o tipo de citocina produzida pelo baço e a recirculação dos linfócitos TCD4 ou T helper (Th). Os linfócitos TCD4 podem se diferenciar em Th1, Th2, Th17 ou em outros subtipos, cada um deles apresentam distintos padrões de citocinas secretadas e diferentes respostas efectoras (NISHIMURA *et al.*, 2009).

Os linfócitos de Th1 produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias IL-2 e TNF α , que induz a proliferação de LT, citocinas essenciais na ativação de macrófagos, as quais atuam na resposta imune celular. A segunda população Th tem papel fundamental nas respostas imunes humorais, anti-inflamatórias, que produz IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 favorecendo a produção de anticorpos (CERUTTI *et al.*, 2013). Dados na literatura apontam diferenças na resposta imune entre indivíduos obesos e não obesos, em obesos há modificação nos perfis dos linfócitos Th1 e Th2, acarretando aumento de citocinas pró-

inflamatórias e diminuição das citocinas anti-inflamatórias (WU *et al.*, 2014; CERUTTI *et al.*, 2013). A obesidade está relacionada com maior contagem de leucócitos, neutrófilos e monócitos e maior proliferação de linfócitos (NISHIMURA *et al.*, 2009).

O baço pode sofrer alterações por inúmeras condições, em virtude de sua ampla variedade de função, entre elas a obesidade. A literatura indica que o aumento do baço pode ser um parâmetro que manifesta baixo grau de inflamação crônica. Dessa forma, encontra-se a esplenomegalia na obesidade. Além disso, dieta rica em gordura pode causar aumento do volume do baço. Os indivíduos obesos, também, têm mostrado aumentada vulnerabilidade a infecções, bacteremia e fragilidade na regeneração à ferimentos (OSBORN & OLEFSKY, 2012).

Estudos mostram que a participação do baço na inflamação e obesidade é evidenciado pela esplenectomia. A literatura releva que o baço é um dos principais órgãos responsáveis pela produção da citocina anti-inflamatória a IL – 10. Nos obesos encontra-se menores níveis dessa citocina (NISHIMURA *et al.*, 2009; VADASZ *et al.*, 2013). Em estudo realizado por Gotoh *et al.*, (2012) evidenciou-se que ratos esplenectomizados apresentaram maior vulnerabilidade aos efeitos deletérios da obesidade induzida por dieta rica em gordura e, também, alterações no controle alimentar, na inflamação e morfologia do tecido adiposo.

A produção das citocinas, estão em conformidade com o conceito de modulação do estímulo neural, principalmente da intensificação de células imunes que estão em movimentos no baço. Enquanto as citocinas movimentam-se pelo baço, as células imunológicas passam pela matriz vascular na proximidade das terminações neuronais, resultante dos principais nervos que sustentam a inervação simpática abdominal (VADASZ *et al.*, 2013). Por consequência, impulsionar a atividade do nervo vago, pode impactar na restauração e regulação anti-inflamatória neuro-imune no nível do baço.

Inervação Autônoma e Vagotomia

O Sistema Nervoso Autônomo (SNA) compreende três componentes, o Sistema Nervoso Simpático (SNS) o Sistema Nervoso Parassimpático (SNP) e o Sistema Nervos Entérico (SNE). O SNA ou visceral eferente é a porção do sistema

nervoso responsável pela função de manutenção da homeostasia, influenciando desde a função cardiovascular, respiratória, gastrointestinal e renal até ao controle dos níveis da temperatura corporal e sistema imunológico (MESSINA *et al.*, 2013).

Anatomicamente, é formado por neurônios e fibras pré e pós-ganglionares. No SNS, os neurônios pré-ganglionares estão localizados na medula torácica e lombar, as fibras são curtas. Os neurônios pós-ganglionares encontram-se próximos da coluna vertebral e distantes das vísceras, as fibras são longas. No SNP, os neurônios pré-ganglionares estão localizados no tronco encefálico e medula sacral, as fibras são longas. Os neurônios pós-ganglionares estão próximos ou dentro das vísceras, as fibras são curtas. Conseqüentemente, esses sistemas oferecem homeostase para o organismo, garantindo o balanço entre as atividades que se integram e se complementam. Dessa forma, as desordens autonômicas em eventos patológicos são mais complexas do que a função antagônica entre as duas principais subdivisões (AICHER, 2000).

Pesquisas revelam que há importante associação entre a atividade autonômica e o funcionamento do sistema imune, afetando principalmente o baço (NANCE & SANDERS 2012; STERNBERG, 2004). As vias eferentes, responsáveis por transmitir o impulso nervoso até os órgãos efetadores, são capazes de modular respostas imunes. As fibras simpáticas noradrenérgicas, em diversas espécies de mamíferos, inervam órgãos linfoides. A inervação do SNS do baço, na ontogênese, desenvolve-se em paralelo ao aparecimento das células T maduras, resultando em contato entre fibras simpáticas e células T. Em contrapartida, os produtos liberados pelas células imunes são capazes de influenciar os mecanismos noradrenérgicos centrais e periféricos e ainda, estimular alterações endócrinas importantes para a imunorregulação (MESSINA *et al.*, 2013). Pesquisas em roedores, mostram que o SNS modula diversos aspectos da função imune (ZHOU *et al.*, 1993).

O nervo vago, maior nervo craniano, possui ampla distribuição parassimpática, conduzindo neurônios pré - ganglionares para os músculos involuntários das vísceras torácicas e abdominais e também, apresenta alguma influência simpática, no qual transmite informações sensitivas desses órgãos para SNC. Esse nervo é o principal nervo eferente, age como um nervo misto, contendo tanto fibras aferentes, quanto eferentes (PAVLOV *et al.*, 2006). Tracey, em 2007, mostrou interação do SNP via nervo vago como eferência neural para o reflexo

inflamatório, no qual a ação anti-inflamatória do vago depende da presença do baço e de nervo esplênico, evidenciando a importância dos mecanismos simpáticos na modulação da resposta imune. Em estudo VIDA *et al.* (2011), sugeriram uma via indireta de conexão, em que os neurônios vagais pré-ganglionares realizam sinapse com neurônios pós-ganglionares simpáticos que suprem o órgão. Todavia, Bratton *et al.* (2012), não evidencia conexões vagais com neurônios esplênicos simpáticos. Os estudos ainda demonstram dúvidas a respeito do controle autônomo da atividade esplênica.

Acredita-se, atualmente, que inúmeros estímulos oriundos do Sistema Nervoso Central (SNC) são capazes de modular uma resposta imune (CRUVINEL *et al.*, 2010). Trabalho de Borovikova *et al.* (2000) mostraram que o SNC, por meio do nervo vago é capaz de modular o nível de $\text{TNF}\alpha$ induzido por endotoxina. Mecanismo este, recentemente, identificado e denominado de via colinérgica anti-inflamatória, capaz de inibir a produção de citocinas através da liberação da acetilcolina (Ach). Huston *et al.* (2006) mostraram ao realizar ativação vagal em animais esplenectomizados, falha em inibir a produção de $\text{TNF}\alpha$, revelando que o baço contribui significativamente para o efeito anti-inflamatório vagal. O nervo vago é capaz de monitorar as respostas imunes via citocinas. A injeção intraperitoneal de citocinas pró-inflamatórias expressa aumento significativo na resposta de fase agudo mediada pelo SNC. Resultados recentes mostram que o nervo vago é capaz de identificar as alterações na produção local de citocinas e gerar uma resposta inflamatória. Apesar de evidências significativas do papel dessas células na ativação imune, por meio da síntese e liberação de citocinas, pouco se sabe a respeito do papel do vago na modulação das respostas imunes.

Por meio da vagotomia, secção cirúrgica do nervo vago, alguns pesquisadores procuram analisar a atuação desse procedimento em linfócitos. Evidencia-se significativa diminuição na ativação dessas células, assim como diminuição de células T regulatórias nos animais submetidos ao procedimento. Embora seja plausível que o nervo vago consiga realizar interferência direta nas células T regulatórias, uma hipótese é que outros intermediários celulares estejam envolvidos (BOROVIKOVA *et al.*, 2000). A atividade simpática, por meio de diversos mecanismos, também pode estar associada à evolução da insuficiência renal, envolvendo a hiperatividade renal crônica, hiperatividade simpática renal e

disfunção autonômica (KIUCHI; MION, 2016). Dentre estes mecanismos, especial atenção tem sido dada à disfunção autonômica (MARK *et al.*, 2006).

Modelo MSG

Um modelo semelhante de SM pode ser obtido em ratos por administração subcutânea de MSG, que, em doses elevadas, danifica as áreas centrais do hipotálamo como o ARQ e neurônios circunventriculares, sendo este modelo denominado de modelo MSG (HIRATA *et al.*, 1997). Durante a idade adulta, roedores MSG apresentam crescimento atrofiado, obesidade leve, aumento do acúmulo de gordura, DLP, hiperleptinemia, hiperinsulinemia e RI, o que o caracteriza como um modelo de SM (GASPAR *et al.*, 2016).

O modelo de roedores MSG apresenta aumento da modulação simpática da variabilidade da frequência cardíaca, barorreflexo alterado e é hipertenso quando adulto (KARLEN-AMARANTE *et al.*, 2014). A ativação do SNS implica na patogênese de componentes específicos da SM e está associada ao aumento do risco cardiovascular. Estudos em animais confirmaram que a ativação excessiva do SNS exerce efeitos desfavoráveis sobre o sistema cardiovascular induzindo hipertrofia cardíaca, remodelação arterial e disfunção endotelial (GRASSI, 2006). Este aumento da atividade pode levar ao aumento da PA via vasoconstrição periférica e aumento da reabsorção tubular renal de Na⁺ (RAHMOUNI *et al.*, 2005).

O aumento do sistema nervoso autônomo renal (SNAR) observado em roedores modelo MSG sugere que um fluxo simpático alterado para o rim pode contribuir para a HAS leve no roedor obeso MSG e também sugere o envolvimento do SRAA na obesidade do MSG; sendo que o aumento do SNAR observado no modelo MSG pode ser devido ao aumento dos níveis de leptina (MATTOS *et al.*, 2012). Observou-se em rato MSG com 3 meses de idade um aumento no nível plasmático de leptina em comparação com ratos controle (MACHO *et al.*, 2000). A leptina causa ativação simpática em outros leitos que não são geralmente considerados termogênicos, como o rim e a glândula adrenal (MATTOS *et al.*, 2012).

Um estudo que se propôs a investigar as características de receptores de angiotensina II no tecido adiposo de roedores MSG, observou elevação de proteína receptora angiotensina 1 (AT1) e, menor ligação à angiotensina II no tecido adiposo

neste modelo. Os autores sugeriram que poderia ser um defeito geral na membrana celular dos adipócitos para a obesidade MSG (PINTÉROVÁ *et al.*, 2001; ZORAD *et al.*, 2003).

Este modelo MSG também é caracterizado por hiperinsulinemia e maior secreção de insulina associada à hiperglicemia precoce. Todas as disfunções neste modelo são essenciais para fazer dos animais obesos e pré-diabéticos MSG um bom modelo para estudar as doenças metabólicas e seus distúrbios associados (MARTIN *et al.*, 2016).

O acúmulo excessivo de gordura abdominal é um fator de risco para o DM2 e está associado à DLP e um aumento nos níveis séricos de cortisol. Um aumento do cortisol também foi observado em animais alimentados com dietas com altas doses de MSG (COLLISON *et al.*, 2011).

O peso corporal dos roedores MSG é menor, uma vez que a regulação da liberação do hormônio do crescimento nestes roedores é deficiente devido à perda relativa do fator liberador do hormônio do crescimento, embora a gordura armazenada como o Índice de Lee é muito grande, o que é uma característica incomum devido à falta de hormônio de crescimento neste modelo experimental (HERMANUSSEN *et al.*, 2006). A administração de MSG em roedores recém-nascidos resulta em danos no ARQ e na eminência mediana do hipotálamo, diminuindo a liberação do hormônio liberador do hormônio do crescimento, que prejudica a secreção do hormônio do crescimento pelos somatossomos da hipófise anterior (GASPAR *et al.*, 2016).

O modelo MSG também está relacionado a danos renais, sendo que dados publicados em estudos indicam que a fibrose renal está associada ao consumo crônico de MSG e o estresse oxidativo é a principal causa de lesão renal (SHARMA *et al.*, 2014).

A presença de receptores glutamatérgicos (Glu-Rs) foi demonstrada no rim (CONTINI *et al.*, 2017). Os receptores NMDA são amino tetraméricos receptores de ácido que atuam como canais de cálcio da membrana. O receptor é delimitado pela ligação do L-glutamato e seu cofator L-glicina, permitindo que o cálcio entre na célula. O receptor foi bem descrito no sistema nervoso, onde a entrada de cálcio produz ativação e produção de NO. Recentemente, a presença de NMDA foi demonstrada no rim (LEUNG *et al.*, 2002), onde exerce efeito tônico vasodilatador

na fluência do glomérulo e efeito pró-reabsorvente no túbulo proximal (DENG; THOMSON, 2009).

A administração crônica de MSG em ratos produz hiperfiltração com aumento da reabsorção tubular renal de Na⁺, potássio e água, que com o tempo pode causar alteração de íons, tendo efeitos em nível renal e sistêmico, tal como insuficiência renal e HAS (MAHIEU *et al.*, 2016). Também se observa alterações nos sistemas antioxidantes e marcadores renais, incluindo subprodutos de peroxidação lipídica. Além disso, o MSG dietético aumenta o pH urinário em ratos e a urina alcalina pode influenciar a capacidade renal de secretar ou reabsorver metabólitos que contribuem para a formação de cálculos, como no caso dos produtos com fosfato de cálcio, com subsequente hidronefrose e fibrose intersticial (SHARMA *et al.*, 2013).

Em relação a alterações histopatológicas renais em ratos modelo MSG, observam-se alteração de glomérulos e prejuízo túbulo-intersticial. Os glomérulos apresentam diferentes estágios de degeneração, aumento do número de células mesangiais e fibrose na cápsula de Bowman. No córtex, há atrofia focal ou dilatação dos túbulos com perda da borda em escova, deslocamento de núcleos para o lúmen tubular e descamação celular. Muitas vezes, os túbulos dilatados apresentam cilindros de proteínas intratubulares. Fibrose de tecido intersticial pode ser observada entre os túbulos danificados com leve acúmulo de células mononucleares. A retenção de Na⁺ que leva à HAS foi acompanhada por alterações patológicas, estresse oxidativo intrarrenal e redução da excreção de NO (CONTINI *et al.*, 2017).

Portanto, identifica-se a necessidade de mais estudos que busquem compreender os efeitos do modelo MSG, no que diz respeito às alterações renais, para dessa forma criar estratégias tanto de prevenção quanto de tratamento que visem minimizar os possíveis danos a este órgão.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a relação das atividades esplênica e/ou autonômica vagal sobre aspectos histomorfométricos renais em roedores obesos-MSG.

2.2 Específicos

- Caracterizar a estrutura renal de roedores obesos-MSG;
- Investigar se a vagotomia associada a esplenectomia é capaz de alterar o diâmetro do tufo glomerular, áreas do tufo glomerular, da cápsula glomerular e do espaço de Bowman em ratos obesos.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados trinta ratos Wistar machos, destes, vinte e quatro receberam durante os primeiros 5 dias de vida injeções de Glutamato monossódico (MSG) (4g/Kg de peso corporal) (OLNEY, 1969). No mesmo período seis ratos (CON) receberam injeções subcutâneas de salina equimolar. Os animais foram adaptados e mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Cascavel-PR, sendo acomodados em gaiolas coletivas de polietileno (43x30x15), sob condições controlada de temperatura, mantida entre $22^{\circ} \pm 25^{\circ}$ C, luminosidade-fotoperíodo de 12 horas (período de luz 7:00 ~19:00h). Os procedimentos experimentais estiveram de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA) da UNIOESTE (em ANEXO).

3.2 Delineamento experimental

Considerando a indução de obesidade com MSG, a esplenectomia e a vagotomia, foram organizados 5 grupos experimentais (n=6/grupo), conforme segue: Controle falso operado (CON-FO); obeso falso operado (MSG-FO); obeso vagotomizado (MSG-VAG); obeso esplenectomizado (MSG-ESP); obeso vagotomizado e esplenectomizado (MSG-VAG-ESP).

3.3 Procedimentos Cirúrgicos

3.3.1 Esplenectomia: Animais dos grupos MSG-ESP e MSG-VAG-ESP foram submetidos a esplenectomia (ESP) aos 60 dias de vida. Para o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados intraperitonealmente, com uma mistura (v:v) de xilazina (0,2 mg/g) e cetamina 0,5 (mg/g) de peso de cada animal. Posteriormente os animais foram laparotomizados, o baço localizado e os vasos esplênicos amarrados com fio cirúrgico verde de poliéster de 3x3 mm da marca PolySuture®, o baço foi retirado e pesado e a região do corte suturada com o mesmo tipo de fio cirúrgico utilizado para amarrar os vasos e os animais devolvidos ao

biotério. Grupos falso operados (FO), passaram pelos mesmos processos, exceto a retirada do baço.

3.3.2 Vagotomia Subdiafragmática: Os animais dos grupos MSG-VAG e MSG-VAG-ESP foram submetido a vagotomia (VAG) subdiafragmática aos 60 dias de vida conforme protocolo de Balbo *et al.* 2007, com adaptações. Para realização da vagotomia, os animais foram anestesiados intraperitonealmente conforme descrito anteriormente. Em seguida os animais foram submetidos a tricotomia na região ventral, realizando-se a antisepsia do campo cirúrgico com utilização de PVPI (polivinil pirrolidona-iodo) com incisão ventral cutânea de aproximadamente dois centímetros, inferiormente ao esterno, na linha mediana do abdome. Incisão similar ocorreu na parede muscular abdominal. O intestino foi retraído caudalmente e o fígado cranialmente para expor o esôfago. Com o auxílio de uma lupa, os ramos anterior e posterior do nervo vago, que se localizam junto à superfície do esôfago, foram gentilmente manipulados e seccionados com tesouras e pinças de precisão. Em animais selecionados para a falsa-vagotomia (grupos FO), após a abertura da cavidade peritoneal, foi realizada a exploração da cavidade, sendo o nervo vago manuseado e afastado do esôfago, porém não seccionado. Ao final, a incisão muscular foi fechada com sutura contínua absorvível e a incisão cutânea com sutura simples não absorvível.

3.4 Eutanásia, peso de órgãos e adiposidade

Aos 150 dias de vida os animais foram pesados e eutanasiados por decapitação em guilhotina. Os animais foram submetidos à laparotomia abdômino-pélvica para remoção dos órgãos e tecidos, que foram pesados em balança digital. O peso dos órgãos e tecidos foi expresso em unidades normalizadas correspondentes ao grama de órgão/100g de peso corporal (peso relativo= peso do órgão ou tecido/peso corporal X 100).

Para avaliar o desenvolvimento da obesidade no grupo MSG foi mensurado os pesos de depósitos de gordura da cavidade abdominal (retroperitoneal, mesentérica e perigonadal) e subcutânea (inguinal) e realizado o cálculo do Índice de Lee em todos os animais, utilizando a relação entre a raiz cúbica do peso corporal em gramas (g) pelo comprimento naso-anal (cm), seguindo procedimento descrito por Novelli *et al.* (2007).

3.5 Análise morfológica e morfométrica dos Rins

Os rins foram fixados em ALFAC (álcool, formol e ácido acético) por 24 horas, lavadas em água corrente e mantidas em álcool 70°. Posteriormente foram processados com metodologia adequada para microscopia de luz, com inclusão em Paraplast Plus® (Sigma-Aldrich). Para as análises morfológicas, foram realizados cortes semi-seriados com 5µm de espessura, utilizando micrótomo rotativo manual (Olympus 4060), equipado com navalha de aço descartável. Os cortes obtidos foram desparafinizados com xilol, hidratados com água destilada e submetidos à técnica de coloração com hematoxilina e eosina (HE) para análise.

Para análise morfométrica, foi utilizada uma secção histológica renal e desprezadas outras três subseqüentes ao longo do órgão, perfazendo-se uma média de dez secções/animal. Foram selecionados 50 glomérulos por rim e mensurados: diâmetro do tufo glomerular, área do tufo glomerular, área da cápsula e do espaço de Bowman (Figura 1). Para saber a área do espaço de Bowman, foi feito o cálculo da área da cápsula subtraindo a área do tufo glomerular (WAGROWSKA-DANILEWICZ, 1998; DIXIT et al., 2014). Todos os cortes foram observados por meio de microscópio Olympus BX61. As imagens de glomérulo renal foram observadas em aumento de 400X. As imagens foram registradas utilizando câmera digital Olympus DP71 com o software DP Controller 3.2.1.276 e analisadas pelo programa Image Pro-Plus 4.1. Os resultados foram expressos em micrômetros (µm).

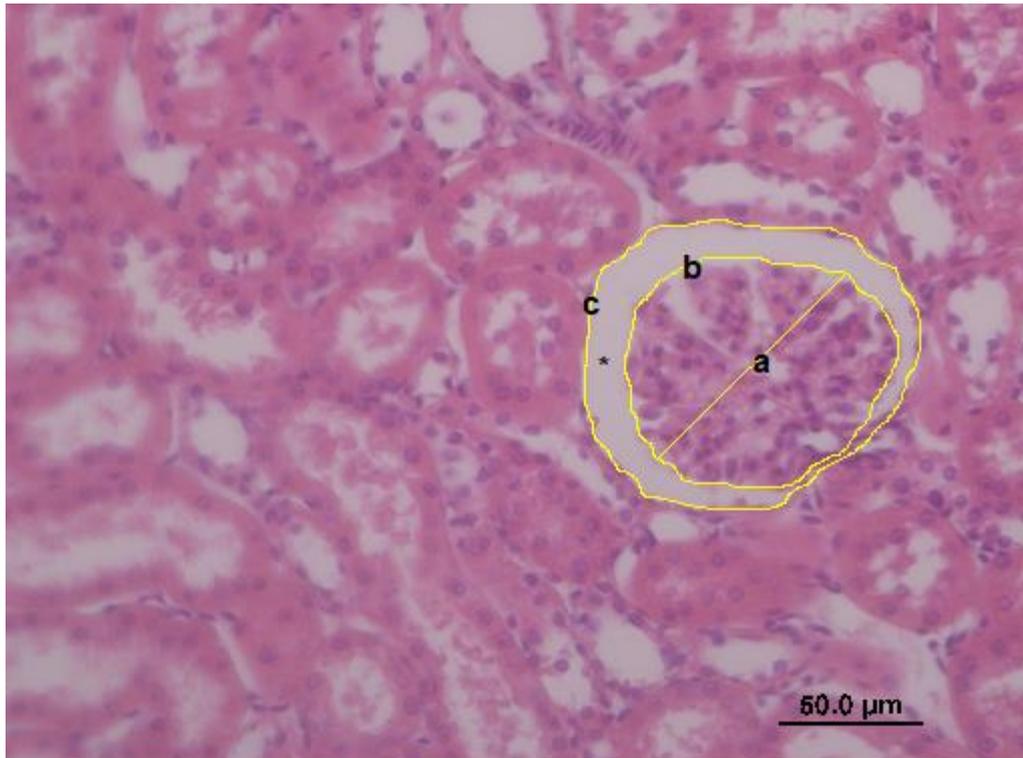


Figura 1 – Fotomicrografia representativa mostrando a medida de diâmetro do tufo glomerular (a), área do tufo glomerular (b), área da cápsula de Bowman (c) e área do espaço de Bowman (*).

3.6 Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão, sendo utilizado o teste estatístico para análise de variância - ANOVA, com pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no programa Sigma Plot (versão 11.0; Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

4. REFERÊNCIAS

AICHER, S.A. *et al.* Anatomical substrates for baroreflex sympathoinhibition in the rat. **Brain Res Bull**, v. 15, n. 51, p. 107-10. 2000.

AGRAWAL, V. *et al.* Impact of treating the metabolic syndrome on chronic kidney disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 5, n. 9, p. 520-528, set. 2009.

BALBO, S. L. *et al.* Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. **Endocrine**, v. 31, n. 2, p. 142-148, abr. 2007.

BRANDT, M.C. *et al.* Renal sympathetic denervation reduces left ventricular hypertrophy and improves cardiac function in patients with resistant hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 59, n.10, p. 901. 2012.

BRATOEVA, K. *et al.* Manifestations of renal impairment in fructose-induced metabolic syndrome. **Cureus**, v. 9, n. 11, p. 1-10. 2017.

BRATTON, B.O. *et al.* Neural regulation of inflammation: no neural connection from the vagus to splenic sympathetic neurons. **Exp Physiol**. v. 97, n. 11, p. 1180-5. 2012.

BOROVIKOVA, L.V. *et al.* Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**. v. 405, n. 6785, p. 458-62. 2000.

BOROVIKOVA, L.V. *et al.* Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. **Auton Neurosci**. v. 85, n. 3, p. 141-7.2010.

CERUTTI, A. *et al.* Células da zona marginal B: Virtudes de linfócitos produtores de anticorpos do tipo inato . **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 2, p. 118 – 132. 2013.

COCKS, M. *et al.* Sprint interval and endurance training are equally effective in increasing muscle microvascular density and e NOS content in sedentary males. **The Journal of Physiology**, v. 591, n. 3. p. 641-656. 2013.

COLLISON, K. S. *et al.* Effect of trans-fat, fructose and monosodium glutamate feeding on feline weight gain, adiposity, insulin sensitivity, adipokine and lipid profile. **The British Journal of Nutrition**, v. 106, n. 2, p. 218-226. 2011.

CONTINI, M. D. C. *et al.* Adverse effects in kidney function, antioxidant systems and histopathology in rats receiving monosodium glutamate diet. **Experimental and Toxicology Pathology**, v. 69, n. 7, p. 547-556. 2017.

CRUVINEL, W.M. *et al.* Sistema imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev. Bras. Reumatol.** v. 50, n. 4. 2010.

CUNHA, N. V. *et al.* Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats. **Life Sciences**, v. 87, n. 1, p.375-381, set. 2010.

DANILEWICZ, M.; WAGROWSKA-DANILEWICZ, G. Diffuse idiopathic mesangial proliferative glomerulonephritis in re-biopsied patients. A quantitative study. **Medical Science Monitor**, v. 4, n. 6, p. CR955-959. 1998.

DENG, A.; THOMSON, S, C. Renal NMDA receptors independently stimulate proximal reabsorption and glomerular filtration. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 296, n. 5, p. F976-F982, maio. 2009.

DIXIT, S. G. *et al.* To study the effect of monosodium glutamate on histomorphometry of cortex of kidney in adult albino rats. **Renal Failure**, v. 36, n. 2, p. 266–270, mar. 2014.

DOLTRA, A. *et al.* Potential reduction of interstitial myocardial fibrosis with renal denervation. **J Am Heart Assoc**, v. 3, n.6. 2014.

DORR, O. *et al.* Influence of Renal Sympathetic Denervation on Cardiac Extracellular Matrix Turnover and Cardiac Fibrosis. **Am J Hypertens**, v.28, n.28. 2015.

EDDY, A. A. Progression in chronic kidney disease. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 12, n. 4, p. 353-65, out. 2005.

EGGERS, S. *et al.* Obesity prevalence and health consequences: findings from the survey of the health of wisconsin, 2008-2013. **WMJ**, v. 115, n. 5, p. 238-44, nov. 2016.

GASPAR, R. S. *et al.* Reproductive alterations in hyperinsulinemic but normoandrogenic MSG obese female rats. **The Journal of Endocrinology**, v. 229, n. 2, p.61-72, maio. 2016.

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

GRASSI, G. Sympathetic Overdrive and cardiovascular risk in the metabolic syndrome. **Hypertension Research**, v. 29, n. 11, p. 839–847, nov. 2006.

GUZIK, T. J.; MANGALAT, D.; KORBUT, R. Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, n. p. 505-528, dez. 2006.

HALL, M. E. *et al.* Obesity, hypertension, and chronic kidney disease. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, v. 7, p. 75–88, fev. 2014.

HIRATA, A. E. *et al.* Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 5, p. 671–674, maio.1997.

HERING, D. *et al.* Substantial reduction in single sympathetic nerve firing after renal denervation in patients with resistant hypertension. **Hypertension**, v. 61, n.2, p. 457-64. 2013.

HERMANUSSEN, M. *et al.* Obesity, voracity, and short stature: the impact of glutamate on the regulation of appetite. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, n. 1, p. 25–31, jan. 2006.

HUSTON J.M. *et al.* Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. **J Exp Med**. v. 203, n. 7, p. 1623-8. 2006.

KIUCHI, M.G.; MION, D. Doença renal crônica e fatores de risco para morte súbita cardíaca – denervação renal simpática: um sopro de esperança? **Relampa**, v. 29, n. 3, p. 108-19. 2016.

JOYCE, T. *et al.* Renal damage in the metabolic syndrome (MetSx): Disorders implicated. **European Journal of Pharmacology**, v. 818, p. 554–568, jan. 2018.

KARIYANNA, S.S.; LIGHT, R.P.; AGARWAL, R. A longitudinal study of kidney structure and function in adults. **Nephrol Dial Transplant**, 1120–1126. 2010.

KARLEN-AMARANTE, M. *et al.* Altered baroreflex and autonomic modulation in monosodium glutamate-induced hyperadipose rats. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 61, n. 10, p. 1435–1442, out. 2014.

KIUCHI, M.G.B. *et al.* Effects of renal sympathetic denervation in left ventricular hypertrophy in CKD refractory hypertensive patients. **Int J Cardiol**, v. 202, p. 121-3. 2015.

LEUNG, J. C. *et al.* Expression and developmental regulation of the NMDA receptor subunits in the kidney and cardiovascular system. **American Journal Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 283, p. R964–R971, jun. 2002.

LUO, D. *et al.* Renal sympathetic denervation for the treatment of resistant hypertension with chronic renal failure: first-in man experience. **Chin Med J**, v. 126, n.7, p. 1392. 2013.

LOBATO, N. S. *et al.* Obesity induced by neonatal treatment with monosodium glutamate impairs microvascular reactivity in adult rats: Role of NO and prostanoids. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. 10, p. 808–816, out. 2011.

MACHO, M. *et al.* Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. **Physiological Research**, v. 49, suppl. 1, p. S79–S85, 2000.

MAHIEU, S. *et al.* Monosodium glutamate intake affect the function of the kidney through NMDA receptor. **Life Sciences**, v. 149, p. 114-11915, mar. 2016.

MAHMOODI, B.K. *et al.* Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium. Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease

in individuals with and without hypertension: a meta-analysis. **Lancet**, v. 380, p. 1649-61.2012.

MARK, P.B. *et al.* Redefinition of uremic cardiomyopathy by contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging. **Kidney Int.** v. 69, n. 10, p. 1839-45. 2006.

MARTIN, J. M. *et al.* Maternal diet supplementation with n-6/n-3 essential fatty acids in a 1.2:1.0 ratio attenuates metabolic dysfunction in MSG-induced obese Mice.**International Journal of Endocrinology**, p.1-10, 2016.

MATTOS, A. M. da. S. *et al.* Renal sympathetic nerve activity is increased in monosodium glutamate induced hyperadipose rats. **Neuroscience Letters**, v. 522, n. 2, p. 118– 122, ago. 2012.

MESSINA. G. *et al.* Autonomic nervous system in the control of energy balance and body weight: personal contributions. **Neurol Res Int.**, v.3, n.8, p.639. 2013.

MORCELLI, L. L. *et al.* Control of Energy Expenditure by AgRP Neurons of the Arcuate Nucleus: Neurocircuitry, Signaling Pathways, and Angiotensin. **Current Hypertension Reports**, v. 20, n. 3, p.1-8, mar. 2018.

NANCE D M & SANDERS VM. Autonomic innervation and regulation of the immune system. **Exp Physiol**, v. 97, n. 11, p. 1180–1185. 2012.

NAVARRO, G.; ARDILES, L. Obesidad y enfermedad renal crónica: Una peligrosa asociación. **Revista Médica do Chile**, v.143, n.1, p.77-84, jan. 2015.

NISHIMURA, S. *et al.* As células T CD8 + efetoras contribuem para o recrutamento de macrófagos e a inflamação do tecido adiposo na obesidade. **Nat Med**, v. 15, n. 8, p. 914 – 920. 2009.

NOVELLI, E. L. B. *et al.* Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, n. 1, p. 111–119, jan. 2007.

OLIVEIRA, IMO. *et al.* Correlação da segmentação arterial esplênica com a anatomia de superfície. **Rev. Col. Bras. Cir.** v. 35, n. 6, p. 406-10. 2008.

OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 164, n. 880, p. 719-721, 1969.

OSBORN, O; OLEFSKY, JM. As redes celulares e de sinalização que ligam o sistema imunológico e o metabolismo na doença. **Nat Med**, v. 18, n. 3, p. 363 – 374. 2012.

PAVLOV, V.A. *et al.* Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 28 n. 103, p. 5219–5223. 2006.

PINTÉROVÁ, L. *et al.* Elevated AT1 receptor protein but lower angiotensin II-binding in adipose tissue of rats with monosodium glutamate-induced obesity. **Hormone and Metabolic Research**, v. 33, n. 12, p. 708–712, dez. 2001.

RAHMOUNI, K. *et al.* Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms. **Hypertension**, v. 45, n. 1, p. 9–14, jan. 2005.

ROHEN, J.W. *et al.* Embriologia funcional: o desenvolvimento dos sistemas funcionais do organismo humano. 2a ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 2005.

SCHLAICH, MP. *et al.* Feasibility of catheter-based renal nerve ablation and effects on sympathetic nerve activity and blood pressure in patients with end-stage renal disease. **Int J Cardiol**, v.168, n. 3. 2013.

SHARMA, A. *et al.* Monosodium glutamate (MSG) consumption is associated with urolithiasis and urinary tract obstruction in rats. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. 1-9, set. 2013.

SHARMA, A. *et al.* Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to monosodium glutamate. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. 1-11, dez. 2014.

SHARMA, A. Monosodium glutamate-induced oxidative kidney damage and possible mechanisms: a mini-review. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, n. 93, p.1-6. 2015.

SILVERTHORN. Dee Unglaub; **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 5. ed. São Paulo: Manole, 2010.

STERNBERG, E. Psiconeuroimunologia – A relação entre o sistema nervoso central e o sistema imunológico. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v.26, n. 3. 2004.

TAIN, Y. L.; HSU, C. N. Developmental Origins of Chronic Kidney Disease: Should We Focus on Early Life? **International of Journal Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 1-16, fev. 2017.

TADA, A.; MIURA, H. Association of mastication and factors affecting masticatory function with obesity in adults: a systematic review. **BMC Oral Health**, v. 18, n.1, p. 76, maio. 2018.

TOBAR, A. *et al.* Proximal tubular hypertrophy and enlarged glomerular and proximal tubular urinary space in obese subjects with proteinuria. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. 1-9, set. 2013.

TRACEY KJ. Physiology and immunology of the cholinergic anti-inflammatory pathway. **J Clin Invest.** n. 117, v. 2, p. 289–296. 2007.

TSUBOI, N. *et al.* The renal pathology of obesity. **Kidney International Report**, v.2, n. 2, p.251-260, mar. 2017.

VADASZ, Z. *et al.* Células B-reguladoras em autoimunidade e inflamação mediada por imune. **FEBS Lett**, v. 587, n. 13, p. 2074 – 2078. 2013.

VIDA, G. *et al.* $\alpha 7$ -cholinergic receptor mediates vagal induction of splenic norepinephrine. **J Immunol.** v. 186, n 7, p. 4340- 6. 2011.

VIANNA, H. R. *et al.* Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 33, n. 3, p. 351-364, jul-set. 2011.

ZHOU, D. *et al.* Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin 6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Endocrinology.** v. 133, n. 6. 1993.

WU, Y. *et al.* Obesity-related glomerulopathy: insights from gene expression profiles of the glomeruli derived from renal biopsy samples. **Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 44–50, jan. 2006.

WU, L. *et al.* Spleen supports a pool of innate-like B cells in white adipose tissue that protects against obesity-associated insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 43. 2014.

ZORAD, S. *et al.* Low number of insulin receptors but high receptor protein content in adipose tissue of rats with monosodium glutamate-induced obesity. **General Physiology and Biophysics**, v. 22, n. 4, p. 557–560, dez. 2003.

Os resultados foram organizados no formato de artigo e submetido ao periódico Acta Cirúrgica Brasileira

5. Vagotomia associada com esplenectomia reduz acumulação lipídica e causa alterações histológicas renais em ratos com obesidade hipotalâmica.

Vagotomy associated with splenectomy reduces lipid accumulation and causes kidneys histological changes in rats with hypothalamic obesity

Kamila Aparecida Medeiros¹, Bruna Schumaker Siqueira², Marianela Andrea Díaz Urrutia², Elaine Manoela Porto³, Sabrina Grassioli^{1,2}, João Paulo de Arruda Amorim^{1,3*}

¹Postgraduate Program in Applied Health Sciences, State University of Western Parana (UNIOESTE). Rodovia Vitório Traiano - Km 02 - Contorno Leste - Bairro Água Branca, Francisco Beltrão, Paraná, Brazil. Postal code: 85601-970

²Biologics Science and Health Center, Laboratory of Endocrine and Metabolic Physiology, State University of Western Parana (UNIOESTE). Rua Universitária, 2069 – Bairro Universitário, Cascavel, Paraná, Brazil. Postal code: 85819-110

³Biologics Science and Health Center, Laboratory of Tissue Biology and Reproduction, State University of Western Parana (UNIOESTE). Rua Universitária, 2069 – Bairro Universitário, Cascavel, Paraná, Brazil. Postal code: 85819-110

* João Paulo de Arruda Amorim - Rua Universitária, 2069 – Bairro Universitário, Cascavel, Paraná, Brazil. Postal code: 85819-110. Tel.: +55 45 3220-7402; fax: +55 45 3220-3131. E-mail address: amorimjpa@yahoo.com.br

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação das atividades esplênica e autonômica vagal sobre aspectos histomorfométricos renais em roedores obesos. Trinta ratos Wistar machos foram utilizados, destes, vinte e quatro receberam durante os primeiros 5 dias de vida injeções subcutâneas de glutamato monossódico (Grupos MSG) (4g/Kg de peso corporal), e seis animais receberam injeções subcutâneas de solução salina (grupo controle). Os animais foram organizados em 5 grupos experimentais (n=6/grupo), Grupos: falso operado (CON-FO); obeso falso operado (MSG-FO); obeso vagotomizado (MSG-VAG); obeso esplenectomizado (MSG-ESP); obeso vagotomizado e esplenectomizado (MSG-VAG-ESP). Aos 150 dias os animais foram pesados e eutanasiados, os rins foram retirados, pesados e submetido ao processamento histológico. Os animais do grupo MSG-FO apresentaram redução significativa de peso corporal e comprimento naso-anal quando comparados com os animais do grupo CON-FO ($P < 0,05$). Os animais submetidos a dupla cirurgia de vagotomia e esplenectomia (MSG-VAG-ESP), apresentaram redução significativa da maioria dos parâmetros biométricos associados a obesidade. Na análise histomorfométrica dos parâmetros renais, os animais MSG-FO apresentaram redução significativa do peso renal e dos diâmetros de área de tufo glomerular, área da cápsula e espaço de Bowman quando comparados com os animais do grupo CON-FO ($P < 0,05$). Na análise dos parâmetros renais dos grupos MSG-VAG, MSG-ESP, MSG-VAG-ESP observou-se redução significativa no diâmetro, área de tufo glomerular, área da cápsula e espaço de Bowman quando comparados com o grupo MSG-FO. Concluímos que a vagotomia associada ou não a esplenectomia induz a redução da adiposidade e causa alterações histológicas nos rins de ratos obesos.

Palavras-chave: Obesidade hipotalâmica, Vagotomia, Esplenectomia, Rim.

Introdução

A doença renal crônica (DRC) é um dos mais importantes problemas de saúde pública em todo o mundo, e suas principais implicações envolvem danos às estruturas do néfron e perda da função renal. Apresenta caráter progressivo e está relacionada à elevada morbidade e mortalidade¹. A DRC é identificada pela destruição gradativa de néfrons provocado pelo aumento da pressão intraglomerular e hiperfiltração. Os mecanismos patogênicos que influenciam nessa doença convergem em um meio em comum, no qual resulta em fibrose intersticial progressiva, perda capilar peritubular com hipóxia e destruição de néfrons funcionais em consequência à atrofia tubular^{2,3}.

Atualmente, tem-se considerado o papel da inflamação subclínica na evolução das doenças crônico-degenerativas⁴. A inflamação é apontada como processo fisiológico, no qual há presença de resposta a diferentes estímulos como infecções, alterações físico-químicas e antigênicas ou danos traumáticos. A resposta inflamatória precisa ser rigorosamente ordenada, visto que deficiências ou excessos de resposta estão intimamente associadas a morbidade e mortalidade. Por exemplo, a inflamação que iniciou-se no glomérulo em virtude de algum trauma, provoca inúmeros mecanismos lesivos através da ativação do sistema imunológico de forma contínua e acentuada, que pode ser capaz de afetar o espaço do túbulo intersticial. Nesse cenário, há evidências de ativação do sistema imune sobre etapas precoces e tardias da DRC. Em contrapartida, estudos revelam a existência de relação negativa entre níveis circulantes de mediadores de inflamação e o estágio da doença⁵.

Estudos evidenciam que a obesidade é um fator de risco independente para DRC^{6,7}. Pesquisa mostra que pacientes norte-americanos obesos apresentam risco

quatro vezes maior de desenvolver DRC que pacientes não obesos. Acredita-se que a obesidade interfere nas alterações fisiopatológicas que favorecem a lesão renal. O aumento de lipídeos nos macrófagos é capaz de transformar o fenótipo das células e beneficiar o aparecimento de um ambiente pró-inflamatório responsável pelas alterações fisiopatológicas do rim relacionados à obesidade. Há evidências de associação de inúmeras citocinas pró-inflamatórias produzidas pelo tecido adiposo e por células inflamatórias às lesões renais provocadas pela obesidade⁸.

A obesidade provoca diversas alterações estruturais, hemodinâmicas e metabólicas no rim. A maioria dessas alterações podem ser de respostas compensatórias ao aumento sistêmico da demanda metabólica observada na obesidade. No entanto, em alguns casos a lesão renal torna-se clinicamente afetada em consequência da falha compensatória. A glomerulopatia relacionada à obesidade (GRO) é o mais conhecido⁹. Na literatura, encontramos a associação entre glomerulopatia e inflamação. Destaca-se que as doenças glomerulares indicam deterioração com maior velocidade da função renal quando comparadas a outras etiologias de DRC. A lesão glomerular pode ser provocada por diversos mecanismos imunológicos¹⁰. A atividade simpática também pode estar associada à evolução da insuficiência renal. Segundo estudo de Luo *et al.*¹¹ o aumento do tônus simpático altera significativamente a função renal.

Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a relação das atividades esplênica e/ou autonômica vagal sobre aspectos histomorfométricos renais em roedores obesos-MSG.

Materiais e Métodos

Animais

Vinte e quatro ratos Wistar machos receberam durante os primeiros 5 dias de vida injeções subcutâneas de Glutamato monossódico (MSG) (4g/Kg de peso corporal)¹². No mesmo período seis ratos receberam injeções subcutâneas de solução salina equimolar (Controle). Os animais foram adaptados e mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Cascavel-PR, sendo acomodados em gaiolas coletivas de polietileno (43x30x15), sob condições controlada de temperatura, mantida entre $22^{\circ} \pm 25^{\circ}$ C, luminosidade-fotoperíodo de 12 horas (período de luz 7:00 ~19:00h). Os procedimentos experimentais estiveram de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA) da UNIOESTE (em ANEXO).

Delineamento experimental

Considerando a indução de obesidade com MSG, a esplenectomia e a vagotomia, foram organizados 5 grupos experimentais (n=6/grupo), conforme segue: Controle falso operado (CON-FO); obeso falso operado (MSG-FO); obeso vagotomizado (MSG-VAG); obeso esplenectomizado (MSG-ESP); obeso vagotomizado e esplenectomizado (MSG-VAG-ESP).

Procedimentos Cirúrgicos

Esplenectomia: Animais dos grupos MSG-ESP e MSG-VAG-ESP foram submetidos a esplenectomia (ESP) aos 60 dias de vida. Para o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados intraperitonealmente, com uma mistura (v:v) de xilazina (0,2 mg/g) e cetamina 0,5 (mg/g) de peso de cada animal. Posteriormente os animais foram laparotomizados, o baço localizado e os vasos esplênicos amarrados com fio cirúrgico verde de poliéster de 3x3 mm da marca PolySuture®, o baço foi retirado e pesado e a região do corte suturada com o mesmo tipo de fio cirúrgico utilizado para amarrar os vasos e os animais devolvidos ao biotério. Grupos falso operados (FO), passaram pelos mesmos processos, exceto a retirada do baço.

Vagotomia Subdiafragmática: Os animais dos grupos MSG-VAG e MSG-VAG-ESP foram submetidos a vagotomia (VAG) subdiafragmática aos 60 dias de vida conforme protocolo de Balbo *et al.*¹³ com adaptações. Para realização da vagotomia, os animais foram anestesiados intraperitonealmente conforme descrito anteriormente. Em seguida os animais foram submetidos a tricotomização na região ventral, realizando-se a anti-sepsia do campo cirúrgico com utilização de PVPI (polivinil pirrolidona-iodo) com incisão ventral cutânea de aproximadamente dois centímetros, inferiormente ao esterno, na linha mediana do abdome. Incisão similar ocorreu na parede muscular abdominal. O intestino foi retraído caudalmente e o fígado cranialmente para expor o esôfago. Com o auxílio de uma lupa, os ramos anterior e posterior do nervo vago, que se localizam junto à superfície do esôfago, foram gentilmente manipulados e seccionados com tesouras e pinças de precisão. Em animais selecionados para a falsa-vagotomia (grupos FO), após a abertura da cavidade peritoneal, foi realizada a exploração da cavidade, sendo o nervo vago manuseado e afastado do esôfago, porém não seccionado. Ao final, a incisão

muscular foi fechada com sutura contínua absorvível e a incisão cutânea com sutura simples não absorvível.

Eutanásia, peso de órgãos e adiposidade

Aos 150 dias de vida os animais foram pesados e eutanasiados por decapitação em guilhotina. Os animais foram submetidos à laparotomia abdômino-pélvica para remoção dos órgãos e tecidos, que foram pesados em balança digital. O peso dos órgãos e tecidos foi expresso em unidades normalizadas correspondentes ao grama de órgão/100g de peso corporal (peso relativo= peso do órgão ou tecido/peso corporal X 100).

Para avaliar o desenvolvimento da obesidade no grupo MSG foi mensurado os pesos de depósitos de gordura da cavidade abdominal (retroperitoneal, mesentérica e perigonadal) e subcutânea (inguinal) e realizado o cálculo do Índice de Lee em todos os animais, utilizando a relação entre a raiz cúbica do peso corporal em gramas (g) pelo comprimento naso-anal (cm)¹⁴.

Análise morfológica e morfométrica dos Rins

Os rins foram fixados em ALFAC (álcool, formol e ácido acético) por 24 horas, lavados em água corrente e mantidos em álcool 70°. Posteriormente foram processados com metodologia adequada para microscopia de luz, com inclusão em Paraplast Plus® (Sigama-Aldrich). Para as análises morfológicas, foram realizados cortes semi-seriados com 5µm de espessura, utilizando micrótomo rotativo manual (Olympus 4060), equipado com navalha de aço descartável. Os cortes obtidos foram desparafinizados com xilol, hidratados com água destilada e submetidos à técnica de coloração com hematoxilina e eosina (HE) para análise.

Para análise morfométrica, foi utilizada uma secção histológica renal e desprezadas outras três subseqüentes ao longo do órgão, perfazendo-se uma média de dez secções/animal. Foram selecionados 50 glomérulos por rim e mensurados: diâmetro do tufo glomerular, área do tufo glomerular, área da cápsula e do espaço de Bowman. Para saber a área do espaço de Bowman, foi feito o cálculo da área da cápsula subtraindo a área do tufo glomerular^{15,16}. Todos os cortes foram observados por meio de microscópio Olympus BX61. As imagens de glomérulo renal foram observadas em aumento de 400X. As imagens foram registradas utilizando câmera digital Olympus DP71 com o software DP Controller 3.2.1.276 e analisadas pelo programa Image Pro-Plus 4.1. Os resultados foram expressos em micrômetros (μm).

Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão, sendo utilizado o teste estatístico para análise de variância - ANOVA, com pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no programa Sigma Plot (versão 11.0; Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

Resultados

Parâmetros biométricos associados a obesidade:

Ao final do período experimental (150 dias de vida) os animais do grupo obeso MSG-FO apresentaram redução significativa de peso corporal e comprimento naso-anal quando comparados com os animais do grupo não-obeso CON-FO ($P < 0,05$). Com relação aos demais parâmetros associados a obesidade

(índice de Lee e depósitos de gorduras), os animais do grupo MSG-FO apresentaram aumento significativo dessas medidas quando comparados com os animais do grupo CON-FO ($P < 0,05$) (Tabela 1).

A cirurgia de vagotomia realizada nos animais obesos (MSG-VAG) não afetou o peso corporal e o comprimento naso-anal quando comparados com os animais do grupo MSG-FO, porém, reduziu significativamente o índice de Lee e os depósitos de gorduras retroperitoneal, perigonadal e mesentérica. ($P < 0,05$) (Tabela 1). A cirurgia de esplenectomia (MSG-ESP) reduziu significativamente o índice de Lee e gordura retroperitoneal na comparação com os animais do grupo MSG-FO ($P < 0,05$), no entanto, a retirada do baço não afetou os demais depósitos de gorduras (Tabela 1). Os animais obesos submetidos a dupla cirurgia de vagotomia e esplenectomia (MSG-VAG-ESP), apresentaram redução significativa da maioria dos parâmetros biométricos associados a obesidade quando comparados com os animais do grupo MSG-FO ($P < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros biométricos dos diferentes grupos ao final do período experimental.

Parâmetros	CON-FO	MSG-FO	MSG-VAG	MSG-ESP	MSG-VAG-ESP
Peso corporal (g)	439,60±6,41	294,00±13,39 ^{*a}	292,00±5,97 ^a	306,80±10,18 ^{ab}	262,20±3,60 ^d
Comprimento naso-anal (cm)	23,25±0,12	19,30±0,27 ^{*a}	20,20±0,30 ^a	20,40±0,24 ^b	19,20±0,20 ^{abd}
Índice de Lee	327,00±1,49	343,79±2,11 ^{*a}	328,78±3,88 ^b	330,37±2,02 ^{bc}	332,82±3,47 ^{bcd}
Gordura Retroperitoneal (g/100gPC)	1,53±0,10	1,70±0,26 ^{*a}	0,68±0,02 ^b	0,95±0,04 ^c	0,74±0,02 ^{bd}
Gordura Perigonadal (g/100gPC)	1,54±0,07	2,5±0,09 ^{*a}	1,93±0,09 ^b	2,75±0,05 ^{ac}	1,99±0,05 ^{bd}
Gordura Inguinal (g/100gPC)	0,28±0,03	0,59±0,07 ^{*a}	0,84±0,17 ^b	0,57±0,02 ^{ac}	0,48±0,10 ^{acd}

Gordura Mesentérica (g/100gPC)	0,99±0,08	2,29±0,17 ^a	1,53±0,18 ^b	2,13±0,11 ^{bc}	1,48±0,19 ^d
---------------------------------------	-----------	------------------------	------------------------	-------------------------	------------------------

Valores expressos em média ± erro padrão. N= 6 animais/grupo. PC = Peso Corporal. Análise de variância – ANOVA (One-Way), com pós-teste de Tukey, * $p < 0,05$ entre os grupos CON-FO e MSG-FO. Letras minúsculas diferentes ^{a,b,c,d} $p < 0,05$, na comparação entre os grupos obesos.

Análise Histomorfométrica Renal:

Os animais do grupo CON-FO apresentaram estrutura renal preservada, com região cortical mais escura de aparência granulosa, contendo néfrons, corpúsculos renais, túbulos contorcidos e porções finas de alças de Henle (Figura 1A).

Os rins dos animais do grupo MSG-FO apresentaram estrutura histológica alterada, apresentando glomérulos, túbulos e cartilagem imaturos circundados por tecido mesenquimatoso indiferenciado e frouxo (Figura 1B), alguns glomérulos levemente aumentados com espessamento difuso das paredes capilares (Figura 1C). Glomérulo com aumento proeminente da matriz mesangial, formando várias lesões nodulares, dilatação de capilares glomerulares e membranas basais capilares espessadas (Figura 1D). Evidencia-se lobulação glomerular acentuada com maior quantidade de células e de matriz no mesângio e espessamento de paredes capilares (Figura 1E). São evidentes, também, o espessamento da parede capilar a hiper celularidade (Figura 1F). Encontra-se alguns glomérulos com necrose glomerular focal e formação de crescente (Figura 1G). Nos animais MSG-VAG e MSG-VAG-ESP foram encontrados rins com múltiplas áreas de infarto renal caracterizadas por palidez acentuada, se estendendo para a superfície subcapsular (Figura 1H).

Na análise histomorfométrica dos parâmetros renais, os animais obesos MSG-FO apresentaram redução significativa do peso renal e dos diâmetros de área de tufo glomerular, área da cápsula e espaço de Bowman quando comparados com

os animais do grupo CON-FO ($P < 0,05$) (Tabela 2). Na análise dos parâmetros renais dos grupos obesos e operados (MSG-VAG, MSG-ESP, MSG-VAG-ESP) observou-se redução significativa no diâmetro, área de tufo glomerular, área da cápsula e espaço de Bowman quando comparados com o grupo MSG-FO, principalmente nos grupos de vagotomia (MSG-VAG) e vagotomia associado com esplenectomia (MSG-VAG-ESP) ($P < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Histomorfometria glomerular dos diferentes grupos experimentais ao final do período experimental.

Parâmetros	CON-FO	MSG-FO	MSG-VAG	MSG-ESP	MSG-VAG-ESP
Peso renal (g/100gPC)	0,30±0,009	0,23±0,01 ^{*a}	1,88±0,41 ^b	0,23±0,005 ^{ac}	0,24±0,01 ^{acd}
Diâmetro do tufo glomerular (µm)	119,98±1,25	93,15±0,82 ^{*a}	33,83±0,42 ^b	35,19±0,37 ^{bc}	34,2±0,37 ^{bcd}
Área do Tufo Glomerular (µm²)	9176,39±106,32	8081,42±124,21 ^{*a}	869,10±12,41 ^b	917,96±18,33 ^{bc}	863,54±15,25 ^{bcd}
Área da Cápsula de Bowman (µm²)	7517,01±108,86	5620,90±101,96 ^{*a}	637,30±11,30 ^b	672,48±15,44 ^{bc}	599,52±12,20 ^{bcd}
Área do Espaço de Bowman (µm²)	119,98±1,25	93,15±0,82 ^{*a}	33,83±0,42 ^b	35,19±0,37 ^{bc}	34,20±0,37 ^{bcd}

Valores expressos em média ± erro padrão. N= 6 animais/grupo. Análise de variância – ANOVA (One-Way), com pós-teste de Tukey, $*=p < 0,05$ entre os grupos CON-FO e MSG-FO. Letras minúsculas diferentes ^{a,b,c,d} $=p < 0,05$, na comparação entre os grupos obesos.

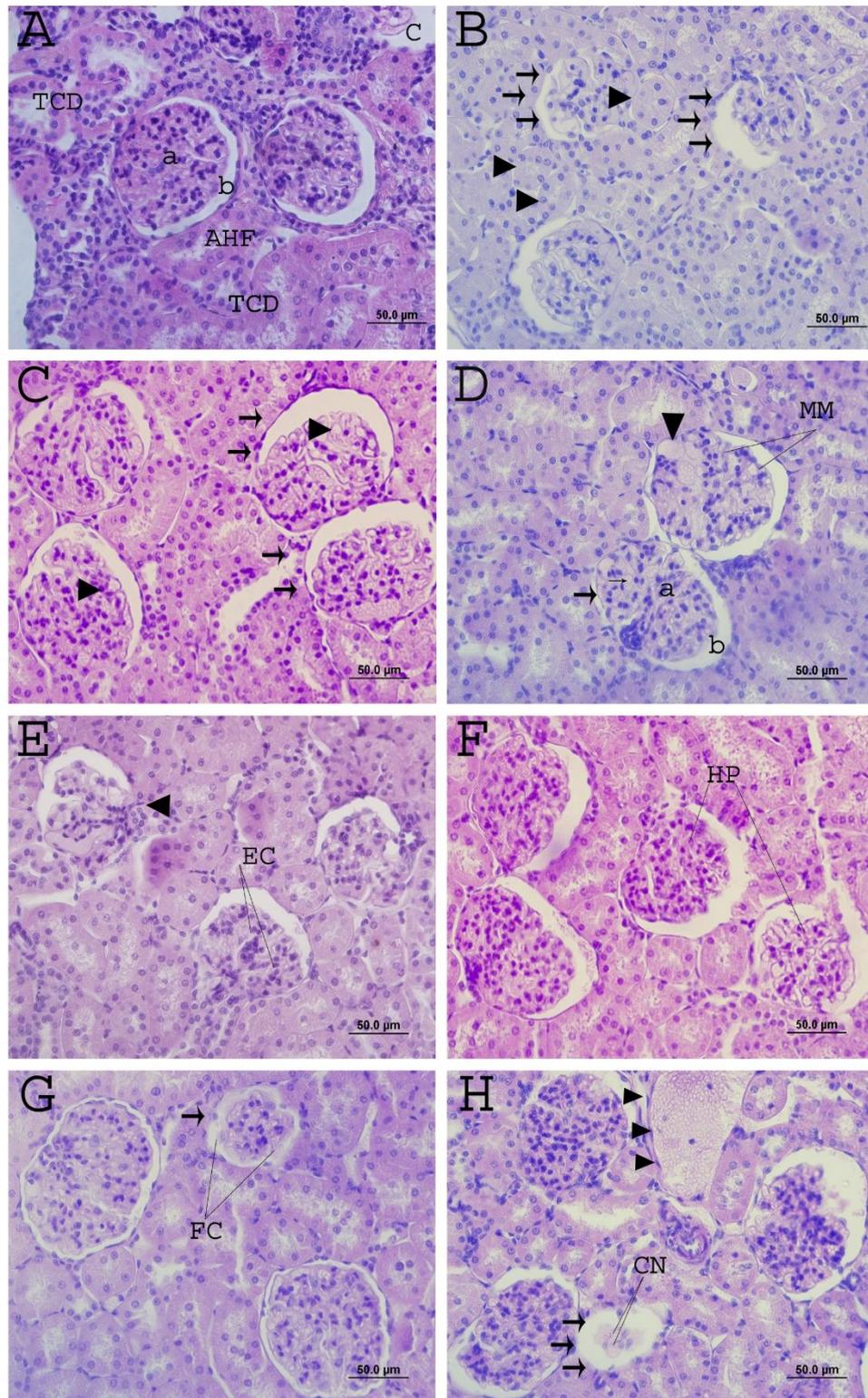


Figura 1 - Fotomicrografia de glomérulo renal de animais dos diferentes grupos experimentais. **A.** Glomérulo com aspecto normal nos animais do grupo CON-S exibindo corpúsculo renal, túbulos contorcidos distais (TCD), porções delgadas da alça de Henle (AHF), capilares sanguíneos (C), tufo glomerular (a), espaço de Bowman (b). **B.** Glomérulos reduzidos e com aspecto alterado nos animais do grupo MSG-FO (setas), túbulos imaturos (cabeça de seta). **C.** Glomérulos com diâmetros aumentados (setas), espessamento difuso das paredes capilares (cabeça de seta). **D.** Aumento da matriz mesangial (MM), lesões nodulares (cabeça de seta), dilatação de capilares (seta fina),

membranas basais capilares (seta grossa). **E.** Lobulação glomerular (cabeça de seta), espessamento de paredes capilares (EC). **F.** Espessamento da parede capilar e hiper celularidade (HP). **G.** Necrose glomerular (seta) e formação de crescente (FC). **H.** Infarto renal em animais MSG-VAG-ESP (seta), células necróticas (CN), vaso sanguíneo (cabeça de seta). Coloração = Hematoxilina de Harris e Eosina.

Discussão

A obesidade está associada à resistência à insulina, diabetes, dislipidemia e hipertensão. Coletivamente, essas condições compreendem a síndrome metabólica, que envolve um estado pró-inflamatório crônico de baixo grau¹⁷. Além disso, a obesidade é a principal causa de doença renal crônica, especialmente na doença renal terminal, sendo a glomerulopatia relacionada à obesidade (GRO) a doença renal mais conhecida associada à obesidade^{18,19}.

Nossos resultados demonstraram que os animais do grupo obeso MSG-FO apresentaram redução significativa de peso corporal e CNA quando comparados aos animais do grupo não-obeso. Essa redução pode ser atribuída ao efeito colateral da aplicação de MSG, uma vez que, dentre as alterações endócrinas encontra-se a redução dos níveis circulantes do hormônio de crescimento (GH), devido à destruição permanente dos neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo, local de produção do GH-RH. Verificamos em nosso estudo que, apesar do menor peso corporal e CNA desses animais, ocorreu aumento significativo do índice de Lee e depósitos de gorduras. A menor secreção de GH implica na redução e retardo do crescimento do animal, devido ao inadequado crescimento do volume e do número de células. Esse hormônio é considerado um hormônio calorífero, que produz lipólise e anabolismo e, além de ser diabetogênico, a sua redução implica na falha da mobilização das gorduras, contribuindo, assim, para o aumento do tecido adiposo desses animais^{20,21,22}. Entretanto, estudo realizado por Tordoff et

*al.*²³, mostra não ter encontrado evidências de que o consumo de MSG influencia no peso corporal.

Nos animais submetidos à vagotomia (MSG-VAG), houve redução significativamente do índice de Lee e dos depósitos de gorduras retroperitoneal, perigonadal e mesentérica. Souza *et al.*²⁴ mostra que esses efeitos são mais evidentes em ratos com lesão hipotalâmica. O autor, também, evidencia e defende que a vagotomia promove perda de peso e redução de ingestão alimentar de forma mais importante nos primeiros dias pós-operatório, uma das explicações para este fato é que o procedimento bloqueia o efeito inibitório alimentar, conseqüentemente, esses animais ingerem menores quantidades e mais frequentes porções de dieta líquida, e maiores quantidades e menos frequentes porções de dieta sólida, possivelmente explicado pela redução do tônus do esfíncter pilórico. King *et al.*²⁵, evidencia que a redução do índice de Lee desses animais é devido à hipofagia, conseqüentemente, reduz o peso e o percentual de depósitos de gorduras. Com base nesses estudos, pode-se deduzir que a redução do índice de Lee e os depósitos de gorduras nesses animais ocorrem por dois possíveis mecanismos: redução da ingestão alimentar e interrupção do estímulo vagal ao pâncreas, reduzindo a hiperinsulinemia.

Observou-se, nos animais submetidos à esplenectomia (MSG-ESP), diminuição significativa do índice de Lee e gordura retroperitoneal, não afetando os demais depósitos de gorduras. Segundo Gotho *et al.*²⁶ a esplenectomia diminui a ingestão alimentar em animais MSG-ESP. No estudo de Maury & Brichard²⁷ constataram o aumento da gordura retroperitoneal, bem como aumento na área dos adipócitos. Evidenciaram, também, hipertrofia, hipóxia, infiltração de

macrófagos, fibrose e resistência à insulina no tecido adiposo, condições que podem culminar na síndrome metabólica.

O estudo de Carvalho²⁸, a fim de avaliar a influência do baço no metabolismo, realizou a esplenectomia em camundongos e induziu obesidade com a utilização de dieta rica em gordura. Observou que em camundongos obesos e esplenectomizados, houve diminuição dos depósitos de gorduras e aumento na sensibilidade à insulina, refletida por redução na glicemia. Também houve redução na infiltração de macrófagos no fígado e no tecido adiposo dos camundongos esplenectomizados. Segundo Montes²⁹, a esplenectomia reduz a obesidade, a hiperinsulinemia e a resistência à insulina em ratos MSG, alterações que podem estar relacionadas a redução do processo inflamatório oriundo do baço.

Em nosso estudo, os animais obesos submetidos a dupla cirurgia de vagotomia e esplenectomia (MSG-VAG-ESP), apresentaram redução significativa da maioria dos parâmetros biométricos associados a obesidade quando comparados com os animais do grupo MSG-FO. Não há dados na literatura avaliando a dupla cirurgia. No entanto, existe uma possível relação com a diminuição dos parâmetros biométricos e a dupla cirurgia. Segundo estudo de Furness *et al.*³⁰ a vagotomia isolada já é suficiente para reduzir a ingestão da dieta e levar a perda de peso em humanos e animais de laboratório. Estes autores mostraram que ratos apresentaram uma diminuição da ingestão diária de ração, reduzindo peso e depósitos de gorduras. Este efeito segundo o estudo é devido à perda de vias eferentes vagais, que despertam o apetite e mudanças endócrinas.

Os primeiros estudos realizados demonstrando a inervação parassimpática nas vísceras abdominais é o estudo de Swan³¹, o qual demonstra terminações do ramo vagal posterior no plexo celíaco. O plexo celíaco é responsável pela inervação

de órgãos da porção retrodiafragmática do sistema digestório, na qual contribui para a inervação do baço³². Assim como em nosso estudo, diversos trabalhos sugerem ou demonstram a existência de conexão nervo vago-gânglio celíaco^{33,34,35,36,37,38,39}.

Nossos resultados demonstram que os animais do grupo CON-FO apresentam estrutura renal preservada, diferentemente dos animais do grupo MSG-FO, que apresentaram estrutura histológica alterada, além de glomérulos, túbulos e cartilagem imaturos circundados por tecido mesenquimatoso indiferenciado e frouxo, glomérulos aumentados com espessamento difuso das paredes capilares, proeminência da matriz mesangial e necrose glomerular focal. Segundo Smeltzer et al.⁴⁰, a obesidade é uma das principais causas de alterações na função renal e representa um importante fator de risco para o desenvolvimento de doença renal crônica. Segundo Vianna *et al.*⁴¹ a obesidade ocasiona uma sobrecarga metabólica e inicia uma série de alterações como hipertensão arterial, diabetes *mellitus* e metabolismo lipídico anormal, consideradas as principais causas de doença renal crônica.

Weisinger *et al.*⁴² levantou pela primeira vez, a relação direta entre obesidade e lesão renal, demonstrando a associação entre obesidade mórbida, proteinúria, glomerulomegalia e glomerulosclerose segmental focal, afirmando que a obesidade possui relação direta na falha da função renal. No estudo de Kambham *et al.*⁴³, foram encontrados glomerulopatia associada à obesidade e, ainda, de acordo com os autores a lesão renal associada à obesidade independe de doença hipertensiva ou diabética. Segundo Zhu & Scherer⁴⁴ a obesidade provoca desordens metabólicas podendo afetar a função renal, evidenciando glomeruloesclerose segmentar focal perihilar associada à obesidade.

Na análise histomorfométrica dos parâmetros renais, os animais obesos MSG-FO apresentaram redução do peso renal e dos diâmetros de área de tufo glomerular, área da cápsula e espaço de Bowman quando comparados com os animais do grupo CON-FO. Segundo Schelb et al.⁴⁵, a obesidade eleva as necessidades metabólicas basais, aumentando o fluxo sanguíneo, débito cardíaco e pressão arterial. Os autores defendem que parte do débito cardíaco é destinada ao rim, ocorrendo vasodilatação da arteríola aferente, aumento do fluxo plasmático renal e hiperfiltração glomerular.

De acordo com Lee et al.⁴⁶, as alterações dos depósitos de gorduras que acompanham a obesidade, encontram-se associadas à progressão da doença renal, por lesão celular epitelial e mesangial. De Paula et al.⁴⁷, também, evidencia à progressão da doença renal e alterações glomerulares como vasodilatação da arteríola aferente com aumento do fluxo sanguíneo renal, hipertensão e hiperfiltração glomerulares e espessamento das membranas basais glomerular e tubular. Segundo esses autores, os mecanismos responsáveis pela vasodilatação renal no obeso não estão bem esclarecidos, todavia podem estar relacionados ao mecanismo de “feedback” da mácula densa, em que o aumento da reabsorção de sódio nos segmentos proximais do néfron acarretam redução da oferta de cloreto de sódio ao túbulo distal, estimulando a mácula densa a causar vasodilatação aferente e a secretar renina, resultando em maior expansão do volume extracelular.

De acordo com nossos resultados, foi observado redução significativa no diâmetro e área de tufo glomerular, área da cápsula e espaço de Bowman nos grupos obesos e operados (MSG-VAG, MSG-ESP, MSG-VAG-ESP) quando comparados com o grupo MSG-FO, principalmente nos grupos de vagotomia (MSG-VAG) e vagotomia associado com esplenectomia (MSG-VAG-ESP). No

entanto, a vagotomia isolada (MSG-VAG) apresentou aumento significativo do peso renal. A redução dos parâmetros renais nos grupos operados pode ser explicada pela inervação renal, que se origina do plexo nervoso renal, formado por fibras simpáticas dos nervos esplâncnicos torácicos e parassimpáticas do nervo vago, além de fibras dos nervos esplâncnicos abdômino pélvicos, sugerindo que a falta de inervação resulta na atrofia renal^{48,49}.

Até o momento não há estudos relacionando vagotomia associado à esplenectomia e modelo de obesidade induzida por MSG. Considerando que há presença de alterações significativas nos parâmetros renais desses animais (MSG-VAG-ESP) quando comparados com o grupo MSG-FO, vale ressaltar que há pesquisas que revelam a importante associação entre a atividade autonômica e o funcionamento do sistema imune, afetando principalmente o baço^{50,51}.

A atividade simpática, através de diversos mecanismos, também pode estar associada à evolução da insuficiência renal. Estudos evidenciam que com a estimulação de fibras simpáticas renais ocorre aumento da produção e liberação de noradrenalina, por outro lado, quando há interrupção da estimulação nervosa simpática, ocorre redução da sua produção e liberação. Na DRC, a hiperatividade simpática é evidenciada na fase clínica mais precoce da doença, revelando associação direta com a gravidade do estado de insuficiência renal⁵². Outro estudo demonstrou que portadores de DRC apresentaram denervação renal simpática, com consequentemente alterações na estrutura renal⁵³.

Sabe-se que o baço pode sofrer alterações por inúmeras condições, em virtude de sua ampla variedade de função, entre elas a obesidade. Estudos mostram que a participação do baço na inflamação e obesidade é evidenciado pela esplenectomia^{54,55}. Nosso estudo demonstrou que a esplenectomia influencia os

parâmetros renais dos animais obesos. Segundo Kopple⁵⁶ e Hall *et al.*⁵⁷ a esplenectomia diminui a ingesta alimentar nesses animais e, conseqüentemente restrição proteica, provocando o baixo peso e diminuição no tamanho renal, resultando em lesão glomerular.

Conclusão

Concluimos que a vagotomia associada ou não a esplenectomia induz a redução da adiposidade e causa alterações histológicas nos rins de ratos obesos.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado em parte pela CAPES – Código do financiamento: 001.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Contribuições dos autores

Kamila Aparecida Medeiros, Bruna Schumaker Siqueira, Marianela Andrea Díaz Urrutia, Elaine Manoela Porto, Sabrina Grassioli e João Paulo de Arruda Amorim, conceberam a ideia inicial do estudo, realizaram coleta de dados, análise e interpretação dos dados, redação e revisão final do manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram a versão final do manuscrito.

Referências

1. KARIYANNA, S.S.; LIGHT, R.P.; AGARWAL, R. A longitudinal study of kidney structure and function in adults. **Nephrol Dial Transplant**, 1120–1126. 2010.
2. EDDY, A. A. Progression in chronic kidney disease. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 12, n. 4, p. 353-65, out. 2005.
3. VIANNA, H. R. *et al.* Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 33, n. 3, p. 351-364, jul-set. 2011.
4. DORR, O. *et al.* Influence of Renal Sympathetic Denervation on Cardiac Extracellular Matrix Turnover and Cardiac Fibrosis. **Am J Hypertens**, v.28, n.28. 2015.
5. KIUCHI, M.G.B. *et al.* Effects of renal sympathetic denervation in left ventricular hypertrophy in CKD refractory hypertensive patients. **Int J Cardiol**, v. 202, p. 121-3. 2015.
6. AGRAWAL, V. *et al.* Impact of treating the metabolic syndrome on chronic kidney disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 5, n. 9, p. 520-528, set. 2009.
7. BRATOEVA, K. *et al.* Manifestations of renal impairment in fructose-induced metabolic syndrome. **Cureus**, v. 9, n. 11, p. 1-10. 2017.
8. HERING, D. *et al.* Substantial reduction in single sympathetic nerve firing after renal denervation in patients with resistant hypertension. **Hypertension**, v. 61, n.2, p. 457-64. 2013.
9. WU, Y. *et al.* Obesity-related glomerulopathy:insights from gene expression profiles of the glomeruli derived from renal biopsy samples. **Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 44–50, jan. 2006.
10. BRATOEVA, K. *et al.* Manifestations of renal impairment in fructose-induced metabolic syndrome. **Cureus**, v. 9, n. 11, p. 1-10. 2017.
11. LUO, D. *et al.* Renal sympathetic denervation for the treatment of resistant hypertension with chronic renal failure: first-in man experience. **Chin Med J**, v. 126, n.7, p. 1392. 2013.

12. OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 164, n. 880, p. 719-721, 1969.
13. BALBO, S. L. *et al.* Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. **Endocrine**, v. 31, n. 2, p. 142-148, abr. 2007.
14. NOVELLI, E. L. B. *et al.* Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, n. 1, p. 111–119, jan. 2007.
15. DANILEWICZ, M.; WAGROWSKA-DANILEWICZ, G. Diffuse idiopathic mesangial proliferative glomerulonephritis in re-biopsied patients. A quantitative study. **Medical Science Monitor**, v. 4, n. 6, p. CR955-959. 1998.
16. DIXIT, S. G. *et al.* To study the effect of monosodium glutamate on histomorphometry of cortex of kidney in adult albino rats. **Renal Failure**, v. 36, n. 2, p. 266–270, mar. 2014.
17. Festa A. , D'Agostino R., Jr , Williams K. , Karter AJ , Mayer-Davis EJ , Tracy RP e Haffner SM. The body fat mass ratio and distribution of chronic inflammation markers. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Desordem.** v. 25, p. 1407 - 1415. 2001.
18. TSUBOI, N. *et al.* The renal pathology of obesity. **Kidney International Report**, v.2, n. 2, p.251-260, mar. 2017.
19. YEBEI, L. *et al.* Efficacy and Safety of Jinshuibao Combined With ACEI/ARB in the Treatment of Diabetic Kidney Disease: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Journal of Renal Nutrition**, v. 30, n. 2, pp 92-100. 2020.
20. DOLNKOFF, M.S.; KATER, C.E.; EGAMI, M.; ANDRADE, I.S.; MARMO, M R. Neonatal treatment with monosodium glutamate increases plasma corticosterone in the rats. **Neuroendocrinology**, v.48(6), p.645-649, Dec. 1988.
21. MIRANDA R.A., AGOSTINHO A.R., TREVENZOLI I.H., BARELLA L.F., FRANCO C.C., TROMBINI A.B. *et al.* Insulin oversecretion in MSG-obese rats is related to alterations in cholinergic muscarinic receptor subtypes in pancreatic islets. **Cell Physiol Biochem**, v. 33, n. 4, p. 1075-1086. 2014.

22. GASPAR, R. S. *et al.* Reproductive alterations in hyperinsulinemic but normoandrogenic MSG obese female rats. **The Journal of Endocrinology**, v. 229, n. 2, p.61-72, maio. 2016.
23. TORDOFF, M. G. *et al.* No effects o monosodium glutamate consumption on the body weight or composition of adult rats and mice. **Physiol. Behav.**, v. 107, p. 338. 2012.
24. SOUZA F, MARCHESINI JB, CAMPOS ACL, MALAFAIA O, MONTEIRO OG, RIBEIRO FB, ALVES HFP, SIROTI FJ, MEISTER H, MATHIAS PCF. Effect of vagotomy in rats neonatally injected with monosodium glutamate: biometry study. **Acta Cir Bras**, v. 16. 2001.
25. KING BM, PHELPS GR, FROHMAN LA. Hypothalamic obesity in female rats in absence of vagally mediated hyperinsulinemia. **Am J Physiol**, v. 6, E437-41. 1980.
26. GOTOH, K. *et al.* A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced hypothalamic inflammation. **J. Neurochem**, v. 120, p. 752-764. 2012.
27. MAURY, E. and S. M. BRICHARD. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. **Mol Cell Endocrinol**, v. 314, n. 1, p. 1-16. 2010.
28. CARVALHO, B.M. **A influência da flora intestinal e da esplenectomia na resistência à insulina induzida por obesidade.** Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, SP. 2012
29. MONTES, Elisangela Gueiber. **O EFEITO DA ESPLENECTOMIA SOBRE A OBESIDADE INDUZIDA POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO (MSG).** 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva) - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA, Ponta Grossa, 2013.
30. FURNESS JB, KOOPMANS HS, ROBBINS HL, *et al.* Effects of vagal and splanchnic section on food intake, weigh serum leptin and hypothalamic neuropeptide Y in rat. **Auton Neurosci**, sep 11. 2001.

31. SWAN, J. A demonstration of the Nerves of the Human Body. **Logman**. 1834.
32. KUNTZ, A.; VAN BUSKIRK, C. Reflex inhibition of Bile Flow and Intestinal Motility Mediated Through Decentralized Celiac Plexus. **Proceedings Society Experimental Biology Medicine**, v.46, n.1, p.519-23, 1941.
33. MCCREA, E.D. The Abdominal Distribution of the Vagus. **J Anat**, v. 59, p.18-40. 1924.
34. GLASER, W. Uber die motorische Innervierung der Blutgease der Milz. **Ztsch Anat Etwgsch**, v.87, p. 741-745. 1928.
35. DALE, H. H. & DUDLEY, H.W. The presence o histamine e acetylcholine in the splenn of the ox e the horse. **J Physiol**, v. 68, p. 97 – 123. 1929.
36. COLOUMA, P. **La terminaison des nerfs pneumogastriques et ses variantions . – Etude d Anatomie descriptive comparé che l´ Homme et dans la série des Vertébrés**. Lille´s University, Paris, France. 1937.
37. MITCHEGLL, G.A.G. The nerve-supply of the gastro-cesophageal junction. **British Journal of Surgery**, v. 26, p. 333-345. 1938.
38. CLARA, M. Das Nervensystem des Menschen. **Lehruchur Studierende und Arte. Barth**, Leipzig.1924.
39. GREENE, E. **Anatomy of the rat**. Hafner Pub. Co. New York. 1963.
40. SMELTZER, S. C. *et al.* **Brunner & Suddarth, tratado de enfermagem médico-cirúrgica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2009.
41. VIANNA, H. R. *et al.* Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. **J. Bras. Nefrol**. v. 33. n. 3. 2011.
42. WEISINGER, J.R. *et al.* The Nephrotic Syndrome: A Complication of Massive Obesity. **Annals of Internal Medicine**. v. 81, p. 440-447. 1974.
43. KAMBHAM, N. *et al.* Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. **Kidney International**, v. 59, n. 4, p. 1498–1509, abr. 2001.

44. ZHU, Q.; SCHERER, P. E. Immunologic and endocrine functions of adipose tissue: implications for kidney disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 14, n. 2, p. 105–120, feb. 2018.
45. SCHELBA, J.E.C. *et al.* Obesity and Kidney disease: pathophysiological aspects. **HU Revista**, v. 44, n. 2, p. 231-240, abr./jun. 2018
46. LEE KB, HYUN YY, KIM H. Dash dietary pattern and chronic kidney disease in elderly Korean population. **Nephrol Dial Transplant**. v. 30. 2015.
47. DE PAULA, R. B.; SILVA, A. A.; HALL, J. E. Aldosterone antagonism attenuates obesity-induced hypertension and glomerular hyperfiltration. **Hypertension**, v. 43, n. 1, p. 41-47, jan. 2004.
48. SHARMA, A. Monosodium glutamate-induced oxidative kidney damage and possible mechanisms: a mini-review. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, n. 93, p.1-6. 2015.
49. TAIN, Y. L.; HSU, C. N. Developmental Origins of Chronic Kidney Disease: Should We Focus on Early Life? **International of Journal Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 1-16, fev. 2017.
50. NANCE D M & SANDERS VM. Autonomic innervation and regulation of the immune system. **Exp Physiol**, v. 97, n. 11, p. 1180–1185. 2012.
- 51.ROMANOVSKY, A.A. The inflamatory reflex: the current model shouçd be revised. **Exp Physiol**. v. 97, n. 11, p. 1178–1179. 2012.
52. SCHLAICH, MP. *et al.* Feasibility of catheter-based renal nerve ablation and effects on sympathetic nerve activity and blood pressure in patients with end-stage renal disease. **Int J Cardiol**, v.168, n. 3. 2013.
53. MAHMOODI, B.K. *et al.* Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium. Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without hypertension: a meta-analysis. **Lancet**, v. 380, p. 1649-61.2012.

54. NISHIMURA, S. *et al.* As células T CD8 + efetoras contribuem para o recrutamento de macrófagos e a inflamação do tecido adiposo na obesidade. **Nat Med**, v. 15, n. 8, p. 914 – 920. 2009.
55. VADASZ, Z. *et al.* Células B-reguladoras em autoimunidade e inflamação mediada por imune. **FEBS Lett**, v. 587, n. 13, p. 2074 – 2078. 2013.
56. KOPPLE JD. Obesity and chronic kidney disease. **J Ren Nutr**;; v. 20, n. 29, p. 30. 2010
57. HALL JE, HENEGAR JR, DWYER TM, LIU J, SILVA AA, KUO JJ, *et al.* Is obesity a major cause of chronic kidney disease? **Adv Ren Replace Ther**, v. 41, n. 54. 2004.
- .

6. ANEXOS

ANEXO A – Certificado do comitê de ética



Autorização

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

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

Cascavel, 20/06/2017

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

ANEXO B – Comprovante de submissão do artigo científico

29/07/2020

ScholarOne Manuscripts

 Acta Cirúrgica Brasileira

 Home

 Author

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Acta Cirúrgica Brasileira

Manuscript ID

ACB-2020-0188

Title

Vagotomy associated with splenectomy reduces lipid accumulation and causes kidneys histological changes in rats with hypothalamic obesity

Authors

Medeiros, Kamila

Siqueira, Bruna

Urrutia, Marianela

Porto, Elaine

Grassioli, Sabrina

Arruda de Amorim, João Paulo

Date Submitted

29-Jul-2020

[Author Dashboard](#)

ANEXO C – Normas da revista Acta Cirúrgica Brasileira

INSTRUCTIONS TO THE AUTHORS

- Scope and policy
- Ethical Considerations
- Editorial review and processing
- Publication types

Scope and policy

Acta Cirúrgica Brasileira is a peer-reviewed journal that publishes original papers on basic and applied research in surgery, and biomedical sciences, new surgical techniques, surgical education, advances in biomedicine and scientific communication, which is relevant to surgical practice and teaching.

Acta Cirúrgica Brasileira meets the standards of International Committee of Medical Journal Editors (www.icmje.org), the Committee on Publication Ethics (COPE – <https://publicationethics.org/>), the Council of Science Editors (CSE – <https://www.councilscienceeditors.org/>), and the World Association of Medical Editors (WAME – <http://www.wame.org/>).

Acta Cirúrgica Brasileira is registered in PubMed/MEDLINE (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/9103983>), JCR Science Edition, PubMed Central (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3665/>), SCOPUS – (<https://www.scopus.com/sourceid/146161>),

Directory of Open Access Journals (<https://bit.ly/2Zo0y6l>), and SciELO (<http://www.scielo.br/acb>). It also complies with funding agencies policies that require deposition of the published articles they finance into openly accessible databases. Articles become freely accessible as soon as they are published.

Acta Cirúrgica Brasileira has rule, norm, standard and style must be fulfilled. Authors must follow the Instructions available from www.scielo.br/acb. Please, review accurately the manuscript before submitting for publication, otherwise, the manuscript will be unsubmitted to you by the Editorial Office, during the preliminary evaluation. All articles are checked through Crossref - Similarity Check (<http://www.ithenticate.com>) to ensure originality. Acceptance will be based on originality, relevance and scientific contribution. Articles with merely advertising or commercial purposes will not be accepted. Articles should be submitted only in English, using simple and accurate language and avoiding the informality of colloquialism. Only manuscripts whose data are not being evaluated by other journals and/or not previously published will be considered for evaluation.

Ethical Considerations

Ethical Considerations in the Conduct and Reporting of Research, Authorship and Contributorship, and International Clinical Trial Registration (<http://www.who.int/ictrp/network/en/> or in clinicaltrials.org). For Brazilian Clinical trials visit <http://www.ensaiosclinicos.gov.br/>. The research in laboratory animals must be submitted to the Ethical Committee of the Institution (case number) in accord with Brazilian law and the Council for International Organization of Medical Sciences-CIOMS (<http://www.cioms.ch/index.php/12->

[newsflash/227-cioms-and-iclas-release-the-new-international-guiding-principles-for-biomedical-research-involving-animals.](#)

The Journal adheres to the Code of Conduct and Best Practice Guidelines set forth by the Committee on Publication Ethics (COPE). As per these guidelines, failure to adhere to the conditions outlined within will result in the editor publishing an appropriate correction, a statement of retraction, or enacting a withdrawal of the article. It should pay attention to plagiarism, duplicate or redundant publication, data fabrication and falsification, corrections and retractions.

The research on human subjects must be submitted to the Ethical Committee of the Institution (case number) in accord with the Helsinki Declaration of 1975 as revised in 2013 (World Medical Association, available at: <https://www.wma.net/wp-content/uploads/2016/11/DoH-Oct2013-JAMA.pdf>) and Brazilian National Health Council Resolution 466/2012, available at: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html.

Manuscripts should be accompanied by a statement that the research was conducted with the informed and appropriate consent of each participant.

Written consent must be obtained from the patient (legal guardian or executor, if appropriate) for the publication of any detail or photograph that may identify an individual.

The research in laboratory animals must be submitted to the Ethical Committee of the Institution (case number) in accord with Brazilian law and the Council for International Organization of Medical Sciences-CIOMS

<https://cioms.ch/shop/product/international-guiding-principles-for-biomedical-research-involving-animals-2/>.

The Journal reserves the right not to accept an article on the grounds that appropriate ethical or experimental standards have not been reached.

Editorial review and processing

Manuscripts submitted by authors to the Acta Cirúrgica Brasileira will be initially evaluated by the Editor-in-Chief, regarding the scope, standards, and similarity index.

In this phase, the manuscript may be rejected or returned to the author for adjustments. If the manuscript is in accordance with the rules, it will be forwarded to the Associate Editor, who shall designate the peer-reviewers (single-blinded) for evaluation of the scientific content. The Associate Editor communicates to the Editor-in-Chief for the final decision.

The process can be followed by the author in the management system. All accepted manuscript will be edit by our publishing team to fit format of the journal. Authors should revise carefully the final version of the manuscript before approve, because it will be not possible to alter/include or exclude authors after publication. After authors' approval, the manuscript will be published. The manuscript should be reviewed by experts in scientific English prior to submission. All approved manuscripts will receive a final professional English revision provided by the Journal.

Acta Cirúrgica Brasileira considers all article participants as authors. Authors are considered those who have effective intellectual and scientific contribution to the work. It is not the role of the editor, arbitrate conflicts related to authorship. The **lead author** is responsible for the integrity of the article as a whole, not necessarily be the first author, however must be the **corresponding author**. The Journal does not accept undergraduate and graduate as lead authors. The **lead author** takes responsibility for the effective participation of each author and the agreement with the content of the article. Participants who had purely technical activity (surgery, literature review, department heads, services or funded) should be listed in the acknowledgements.

Publication types

The journal accepts research articles, preferably on experimental surgery, clinical research and review requested by the Editorial Board. Systematic review and meta-analysis focusing on surgical topics of current interest will be considered for publication. All contents published on Acta Cirúrgica Brasileira are under license from Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.pt>).

Experimental Research: It should follow the Animal Research Reporting of in Vivo Experimental (ARRIVE) guideline <https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>, that allows the planning of animal experiments, ensuring a robust design of the study and reliable and reproducible results.

Clinical Research: Randomized controlled trials should include a Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) flowchart <http://www.consort-statement.org>, showing the number of participants in each intervention group, as well as a detailed description of how many patients were excluded at each step of the data analysis. All clinical trials must be recorded and made available on an open access website. The trial protocol (including the complete statistical analysis plan) should be submitted with the manuscript.

Review Article: Systematic methods and explicit criteria to identify, select, and critically evaluate relevant research. This category includes Systematic Review with and without meta-analyzes. Protocols of systematic reviews should be registered with PROSPERO - <https://www.crd.york.ac.uk/prospero/>, or made available on an open access site. Systematic reviews should be reported in accordance with PRISMA guidelines -

<http://www.prisma-statement.org/>, and should include the flow chart as a figure and the checklist as supplementary material (<http://www.prisma-statement.org/2.1.2%20-%20PRISMA%202009%20Checklist.pdf>).

ORIGINAL ARTICLES

The Main document in the electronic system must contain abstract and the manuscript.

Title page, figures with legends, and tables with title should be uploaded in the specific file.

Title Page

- The title of the article should be concise but informative.
- Full name of all authors with the sequence number superscript (roman) indicating below the highest academic degree of each author, including institutional affiliation (division/department and university).
- Open Researcher and Contributor ID - ORCID of all authors (<https://orcid.org/signin>).
- Authors' responsibility and contributions: It is mandatory that each author attests to have participated sufficiently in the work to assume responsibility for a significant portion of the manuscript content. Each of the authors must specify their contributions to the work:
 - Substantive scientific and intellectual contributions to the study;
 - Conception and design;
 - Acquisition of data;
 - Analysis and interpretation of data;
 - Technical procedures;
 - Histopathological examinations;
 - Statistics analysis;
 - Manuscript preparation;

- Manuscript writing;
- Critical revision;
- Final approval.

Authorship Changes: Any addition, deletion or reorganization of author names in the authorship list should be done only prior to acceptance of the manuscript and only if approved by the Journal Editor. To request such change, the Editor must receive the following email from the corresponding author: (a) the reason for the change in the author list and (b) written confirmation (email, letter) from all authors that they have agree to the addition, removal or reorganization. In the case of adding or removing authors, this includes confirmation of the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider adding, deleting, or rearranging authors after acceptance of the manuscript. While the Editor considers the request, the publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online edition, any requests will be accepted.

Main Document

- Must contain title of the article;
- **Abstract:** Must not exceed 250 words and should be presented in a structured format:
 - Purpose: clear, precise and concise, without comment.
 - Methods: sample and procedures.
 - Results: main findings with specified data and statistical significance.
 - Conclusion: clear, precise and concise, answering the purpose, without comment.
 - Key words: should be provided 3 to 6 terms based on Medical Subject Headings – Mesh

<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>. Terms that are not part of MeSH impede the location of the article.

- **Introduction:** Clearly state the purpose of the study and give only pertinent citations, and do not review the subject extensively. Authors should be presented in lowercase or simply cited by superscript numbers, without the year article.
- **Methods:** Ethical information should be included here. The sample (quantity and quality) and procedures in sufficient detail should be included to allow other researchers to replicate the results. Identify precisely all drugs and chemicals used, including generic name(s), dosage(s), and route(s) of administration. Do not use patient's names, initials, or hospital numbers. Describe statistical methods with detail and provide references to established procedures. Main author is responsible for the accuracy of the data including all statistical calculations.
- **Results:** In the text, emphasize the important findings. Include the statistical significance.
 - **Tables:** are open and numbered in sequence (use arabic numerals), and supply a brief title for each at the top. Use only approved abbreviations. Explain in footnotes all non-standards abbreviations that are used in each table. Must be without vertical lines.
 - **Figures** (illustrations, photos, photomicrographs, and graphics): must be with good quality. Digital files are recommended to have 350 dpi or higher, and TIFF or JPEG (editable formats).
 - Do not repeat in the text all the data in tables and figures. Figures should also be numbered

consecutively in Arabic numerals. The legends must be in the bottom of the figure.

- **Discussion:** Emphasize the new and important aspect of the study. Compare the method and the results with those formerly published. Do not repeat results.
- **Conclusion:** It should be clear and concise and answer the purpose of the study. Avoid repeat data and comments.
- **Acknowledgements:** Recognize those who contributed to the work, but without holding the characteristics of authors.
- **References**
 - References should be updated, select and use the most important relevant research published in peer-reviewed journal;
 - The rules of Vancouver (www.icmje.org) must be followed. In addition, include **doi**;
 - The titles of journals should be abbreviated according to the style used in MEDLINE/PubMed;
 - References should be numbered consecutively in the order they were first mentioned in the text;
 - It should be included the names of all authors (*et al.* is not accepted);
 - References to abstracts are not accepted, personal communication or any other non-indexed source (text books and thesis).
- **Correspondence**

Full name of the main author, address, phone and e-mail.