

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

**ANA CLAUDIA AMARAL**

**EFEITO DA VAGOTOMIA ASSOCIADO OU NÃO À ESPLENECTOMIA SOBRE A  
HISTOLOGIA DO FÍGADO EM RATOS OBESOS-MSG**

CASCAVEL-PR  
(Maio/2019)

**ANA CLAUDIA AMARAL**

**EFEITO DA VAGOTOMIA ASSOCIADO OU NÃO À ESPLENECTOMIA SOBRE A  
HISTOLOGIA DO FÍGADO EM RATOS OBESOS-MSG**

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

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

ORIENTADOR: Sandra Lucinei Balbo

CO-ORIENTADOR: João Paulo de Arruda  
Amorim

CO-ORIENTADOR: Maria Lúcia Bonfleur

CASCADEL – PR

(Maio/2019)

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

Amaral, Ana Claudia  
EFEITO DA VAGOTOMIA ASSOCIADO OU NÃO À ESPLENECTOMIA SOBRE  
A HISTOLOGIA DO FÍGADO EM RATOS OBESOS-MSG / Ana Claudia  
Amaral; orientadora Sandra Lucinei Balbo; coorientador João  
Paulo Amorim. -- Cascavel, 2019.  
65 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) --  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências  
Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em BioCiências  
e Saúde, 2019.

1. Obesidade . 2. Fígado. 3. Nervo Vago. 4. Baço. I.  
Lucinei Balbo, Sandra, orient. II. Amorim, João Paulo,  
coorient. III. Título.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha mãe e ao meu marido, pelo apoio e por acreditarem em mim. Amo vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu marido Rodrigo, que sempre esteve do meu lado, por ser meu grande incentivador, acreditar em mim, pela paciência e por sua capacidade de me trazer paz.

À minha orientadora, Sandra Lucinei Balbo pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por confiar em mim e me aceitar como sua aluna sem nem mesmo me conhecer. Sou grata por todo apoio e ensinamentos.

Aos coorientadores professor João Paulo e Maria Lucia, por sua disposição, conhecimento, por todo suporte e apoio para a realização deste trabalho.

As professoras Sabrina, Ana Tereza e Sara pelos ensinamentos e contribuições à pesquisa.

À minha mãe pelo apoio incondicional, pelo amor, carinho, pela compreensão nos momentos de estresse e pelo apoio na superação das dificuldades, pelo incentivo constante em minha vida e por compartilhar dessa minha trajetória acadêmica. Você é a minha inspiração a continuar lutando pelos meus sonhos.

À minha irmã e ao meu cunhado, que estiveram ao meu lado e me ajudaram muito durante essa trajetória.

À Bárbara, por sua amizade durante todos esses anos e por sua ajuda tanto nesse trabalho como na vida.

À minha família, pelo apoio e por compreenderem minha ausência.

À Bruna, Sandra, Iala, Gabriela, Milara, Vanessa, Ana Claudia e a todos do laboratório que, de alguma forma, contribuíram com seus ensinamentos.

## RESUMO GERAL

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da vagotomia subdiafragmática associada ou não a esplenectomia sobre a morfologia hepática em ratos obesos induzidos pelo glutamato monossódico (MSG). Ratos machos recém-nascidos receberam durante os cinco primeiros dias de vida injeções de 4 g de MSG/Kg de peso corporal (grupo MSG) ou 1,25 g de solução salina/Kg de peso corporal - grupo controle (CTL). Aos 60 dias de vida os animais obesos MSG foram submetidos a vagotomia subdiafragmática (MSG VAG), ou a esplenectomia (MSG ESP), ou a vagotomia associada a esplenectomia (MSG VAG ESP), ou, a falsa operação (MSG FO). Com 150 dias os animais foram eutanasiados. Os estoques de gorduras perigonadal e retroperitoneal foram maiores nos animais MSG FO em relação ao CTL. O peso da gordura retroperitoneal foi menor nos MSG VAG, MSG ESP e MSG VAG ESP em relação aos grupos MSG FO. O grau de esteatose hepática foi menor nos animais MSG VAG quando comparado ao MSG FO. Assim a vagotomia exerceu um efeito protetor sobre a instalação da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) nos animais obesos MSG. Entretanto a esplenectomia exacerbou este parâmetro nos animais do grupo MSG ESP em relação ao grupo MSG FO. Interessantemente o grau de esteatose foi similar entre os animais MSG VAG ESP e o grupo MSG FO. Desta forma, conclui-se que o nervo vago e o baço tem participação importante, porém independentes, na instalação da DHGNA no modelo de obesidade induzida pelo MSG.

**Palavras-Chaves:** Fígado, obesidade, baço, nervo vago.

## **EFFECT OF VAGOTOMY ASSOCIATED OR NOT WITH SPLECTOMY ON LIVER HISTOLOGY IN OBESE RATS-MSG**

### **ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate the effect of subdiaphragmatic vagotomy associated or not to splenectomy on the liver morphology in obese rats induced by glutamate monosodium (MSG). Newborn male rats received during the first five days of life injections of either 4 g MSG/body weight kg (MSG group) or 1.25 g saline/body weight kg - control group (CTL). At 60 days of age the MSG obese animals were subjected to subdiaphragmatic vagotomy (MSG VAG), or splenectomy (MSG ESP) or vagotomy associated with splenectomy (MSG VAG ESP), or false operation (MSG FO). At 150 days the animals were euthanized. The perigonadal and retroperitoneal fat stocks were higher in MSG FO animals compared to CTL. Retroperitoneal fat weight was lower in MSG VAG, MSG ESP and MSG VAG ESP compared to MSG FO groups. The degree of hepatic steatosis was lower in MSG VAG animals when compared to MSG FO. Thus the vagotomy had a protective effect on the installation of the nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in obese animals MSG. However, splenectomy exacerbated this parameter in animals from the MSG ESP group compared to the MSG FO group. Interestingly the degree of steatosis was similar between the MSG VAG ESP animals and the MSG FO group. Thus, it is concluded that the vagus nerve and the spleen play an important but independent role in the installation of NAFLD in the MSG-induced obesity model.

**Key words:** Liver, obesity, spleen, vagus nerve.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>11</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Obesidade.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2 Metabolismo lipídico hepático e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).....</b>	<b>13</b>
<b>3.3 Sistema Nervoso Autônomo e sua ação sobre o metabolismo lipídico hepático.....</b>	<b>15</b>
<b>3.4 Ação do baço sobre o processo inflamatório e o perfil lipídico e sua relação com o sistema nervoso autônomo .....</b>	<b>17</b>
<b>3.5 Modelo de indução de obesidade por glutamato monossódico (MSG).....</b>	<b>19</b>
<b>4. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>21</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>34</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Esquema da hipótese de “ <i>duplo hit</i> ”.....	15
<b>Figura 2</b> - Parâmetros conteúdo lipídico hepático.....	44
<b>Figura 3</b> - Fotomicrografias do fígado de ratos obesos-MSG.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh - Acetilcolina	LAFEM - Laboratórios de Fisiologia Endócrina e Metabolismo
AGL - Ácidos Graxos Livres	MSG - Glutamato Monossódico
ANOVA - Análise da Variância	MSG ESP – MSG Esplenectomia
ARQ - Núcleo Arqueado	MSG FO – MSG Falso Operado
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais	MSG VAG - MSG Vagotomia
CH - Carcinoma Hepatocelular	MSG VAG ESP- MSG Esplenectomia e Vagotomia
CNA – Comprimento Naso-Anal	PCR - Proteína C Reativa
CTL ESP - Controle Esplenectomia	RI - Resistência À Insulina
CTL FO - Controle Falso Operado	SNA – Sistema Nervoso Autônomo
CTL VAG – Controle Vagotomia	SNC - Sistema Nervoso Central
CTL VAG ESP - Controle Esplenectomia e Vagotomia	SNP- Sistema Nervoso Parassimpático
DCNT- Doenças Crônicas Não Transmissíveis	SNS - Sistema Nervoso Simpático
DHGNA - Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica	TG – Triglicerídeos
DLP - Dislipidemia	TNF $\alpha$ - Fator de Necrose Tumoral
DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2	UNIOESTE - Universidade Estadual do Oeste do Paraná
EH - Esteatose Hepática	VAG – Vagotomia
EHNA – Esteato Hepatite Não Alcoólica	VLDL - Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
EM - Eminência Mediana	
ESP – Esplenectomia	
FO – Falsa Operação	
GH - Hormônio Do Crescimento	
HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica	
HGP - Glicose Hepática	
IL - Índice de Lee	
IL10 - INTERLEUCINA 10	
IL2- Interleucina 2	
IL-6 - Interleucina 6	

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade pode ser definida como um acúmulo de gordura em excesso que pode apresentar riscos para a saúde. Aproximadamente 50% da população brasileira apresenta sobrepeso, e se tornou cada vez mais frequente o aumento de peso infantil, sendo estimadas cerca de 41 milhões de crianças com obesidade (WHO, 2016).

Muitas são as causas atribuídas ao surgimento dessa epidemia de obesidade (GEARHARDT et al., 2012), uma das principais são as mudanças nos hábitos alimentares, que nos últimos anos passou de alimentos naturais e saudáveis para alimentos industrializados e mais palatáveis, ricos em gorduras e calorias, e pela falta de atividade física aumentando assim o sedentarismo (NUNES et al., 2006; COOK et al., 2001). Quando a energia consumida excede o gasto, ocorre um estado de balanço energético positivo, em que o excesso de energia é armazenado na forma de gordura no tecido adiposo (HILL et al., 2012). Devido a estas mudanças, é cada vez maior a incidência de obesidade, a qual afeta praticamente todos os grupos socioeconômicos e idades, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (ABESO, 2011). Esses fatores predispõem para o desenvolvimento de várias comorbidades, tais como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemia (DLP), câncer e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (MILIĆ et al., 2014; MORALES-VILLEGAS, 2013).

A DHGNA é caracterizada pelo acúmulo de gordura (principalmente triglicerídeos) nos hepatócitos, resultante da resistência à insulina (RI), não associado ao consumo de bebida alcoólica. Esta doença tem assumido um papel de extrema importância por ser a doença hepática mais comum no mundo (MILIĆ et al., 2014). Ela está presente em cerca de 80% dos obesos e em até 95% dos obesos mórbidos (LABRECQUE et al., 2014; VERNON et al., 2011). Ela pode variar de esteatose hepática simples (EH), até esteato hepatite não alcoólica (EHNA), podendo evoluir para uma cirrose ou carcinoma hepatocelular (CH) (RINELLA, 2015). A DHGNA é considerada uma manifestação hepática da síndrome metabólica (SM), estando relacionada a DM2, RI, hipertensão e DLP (DIETRICH; HELLERBRAND, 2014; VERNON et al., 2011).

Vários mecanismos estão envolvidos no controle do metabolismo corporal, e disfunções no sistema autônomo, por exemplo, o aumento da atividade parassimpática e diminuição da atividade simpática, que pode acarretar no

desequilíbrio da homeostase glicêmica e lipídica, e levar à RI e hiperinsulinemia, que pode causar várias complicações resultando no DM2. Licht e colaboradores mostraram que a hipertrigliceridemia em pacientes com SM está fortemente associada com essas disfunções na atividade do sistema nervoso autônomo (SNA), sendo relacionadas com o surgimento e progressão da doença (LICHT et al., 2010).

O acúmulo de lipídios que ocorre na EH desencadeia a inflamação sistêmica crônica de baixo grau, associada a um desequilíbrio na produção de citocinas e alterações nas células imunes (GREEVENBROEK et al., 2013; BAFFY, 2009; VAN; HOTAMISLIGIL, 2006; KREMER et al., 2006; LI et al., 2005; PESTKA et al., 2004). Estudos investigaram a relação entre o baço e o metabolismo lipídico, e observaram que ratos esplenectomizados, exibiram piora na dislipidemia, alterações inflamatórias no tecido adiposo, aumento de triglicérides nos tecidos e agravo na esteatose hepática (INOUE et al., 2012b). O baço é necessário na regulação da resposta inflamatória, e sob influência do nervo vago, pode regular a resposta imune e as concentrações de citocinas (BORGES et al., 2014; TRACEY, 2012; HUSTON et al., 2006). No entanto, ainda não foi identificada uma inervação direta no baço pelo nervo vago (ROSAS-BALLINA et al., 2008; MIGNINI et al., 2003; CANO et al., 2001; BERTHOUD; POWLEY, 1993; BELLINGER et al., 1989, 1993; NANCE, 1989).

Vários modelos experimentais são utilizados para entender melhor as complicações e as causas da obesidade. Um dos modelos é o de obesidade hipotalâmica, induzida por glutamato monossódico (MSG), que em doses elevadas no período neonatal causam lesões no sistema nervoso central (SNC). Ratos com obesidade hipotalâmica, induzida por MSG, apresentam hiperinsulinemia, resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemia e elevadas concentrações de ácidos graxos livres (AGL) e TG no fígado (SOARES et al., 2017). A vagotomia subdiafragmática bilateral precoce reduz o acúmulo de gordura e melhora a homeostase glicêmica e lipídica em ratos obesos MSG (LUBACZEUSKI, et al., 2015). Inoue e colaboradores, 2012 demonstraram que ratos esplenectomizados, exibiram piora na dislipidemia, aumento de TG nos tecidos e agravo na EH (INOUE et al., 2012a). Ainda não se conhece a relação entre SNA e o sistema imune esplênico sobre a instalação da obesidade e suas comorbidades. Desta forma este trabalho está sendo proposto na tentativa de entender melhor os efeitos da vagotomia e da esplenectomia, associadas ou não, sobre a obesidade-MSG.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da vagotomia associada ou não esplenectomia sobre perfis bioquímicos, homeostase lipídica e morfologia hepática em ratos obesos - MSG;

### **2.2 Objetivos Específicos**

Analisar em ratos obesos submetidos à a vagotomia e/ou esplenectomia os parâmetros relacionados:

- A obesidade;
- Ao perfil lipídico plasmático e hepático;
- Aos aspectos da morfologia hepática relacionados à presença de DHGNA.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Obesidade

A obesidade é uma doença que se tornou cada vez mais comum, e sua prevalência já atinge proporções epidêmicas (ABESO, 2016). No Brasil, a obesidade vem aumentando significativamente nos últimos anos. Segundo levantamentos do Ministério da Saúde (MS), uma em cada cinco pessoas no país está acima do peso. A prevalência de obesidade cresceu 60% em dez anos e passou de 11,8%, em 2006, para 18,9%, em 2016. Estima-se que em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos estarão com sobrepeso e cerca de 700 milhões apresentarão obesidade. A obesidade ocupa o quinto lugar no ranking das principais causas de morte no mundo. Aproximadamente 2,8 milhões de adultos morrem por ano em decorrência das consequências do excesso de peso. Devido ao aumento da sua incidência, a obesidade tem sido considerada a mais importante desordem nutricional tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (WHO, 2014; WHO, 2016).

Definida como acúmulo de gordura em excesso, a obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento de várias doenças tais como o diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemia (DLP), doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), e alguns tipos de câncer (LOPES, 2007; LEITE-CAVALCANTI et al., 2009; MORALES-VILLEGAS, 2013; MILIĆ et al., 2014). A chance de surgimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) é claramente proporcional ao aumento de peso no indivíduo. Sendo assim, indivíduos obesos tem mais chances de desenvolver doenças do que indivíduos com peso corporal normal (FISBERG; FIORILLO, 2009).

A obesidade também pode ser caracterizada por um estado inflamatório crônico de baixo grau no organismo, causado por um desequilíbrio energético onde a energia consumida excede o gasto, levando a um estado de balanço energético positivo, em que o excesso de energia é armazenado na forma de gordura no tecido adiposo (HILL et al., 2012; VELLOSO et al., 2011; HOTAMISLIGIL, 2006).

O tecido adiposo não é apenas responsável pelo armazenamento de energia, ele é considerado um tecido metabolicamente ativo e responsável pela regulação do metabolismo corporal (SHUSTER et al., 2012; PERRINI et al., 2008). O excesso de

tecido adiposo leva a alterações metabólicas associadas à secreção desregulada de adipocinas como a interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), leptina, resistina e adiponectina, resultando no estado inflamatório crônico de baixo grau no organismo, sendo este, considerado diferente da inflamação de origem não infecciosa (SHOELSON et al., 2007; TILG; MOSCHEN, 2006; HOTAMISLIGIL, 2006).

A produção em excesso de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo é considerado um fator de risco para o desenvolvimento da RI (LUMENG; SALTIEL, 2007; ODEGAARD et al., 2007), estando relacionado também ao desenvolvimento de desordens metabólicas como a DHGNA, DM2, hiperlipidemia, hipertensão arterial, aterogênese, que contribuem para a progressão da síndrome metabólica (SM) (KLÖTING; BLÜHER, 2014; JOHNSON; OLEFSKY, 2013; TRAYHURN; WOOD, 2004; YUDKIN, 2003).

### **3.2 Metabolismo lipídico hepático e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)**

O fígado é um órgão essencial na regulação do metabolismo energético corporal, e na manutenção da homeostase de carboidratos, proteínas e lipídios (KOO, 2013; RUI, 2011).

Os lipídeos são substâncias orgânicas insolúveis no meio aquoso que possuem um importante papel no fornecimento de energia para o organismo (QUINTÃO et al., 2011). Podem ser armazenados em gotículas de gorduras, e estas podem ser provenientes da lipogênese, da captação de ácidos graxos da circulação que foram liberados por outros tecidos através da lipólise, ou pela captação de gorduras provenientes da dieta, cujo excesso leva a um aumento das concentrações plasmáticas de TG e AGL (LEAVENS; BIRNBAUM, 2011; BRADBURY, 2006).

O armazenamento de TG e COL hepático são regulados por diversos fatores e, sob condições fisiológicas normais, a captação e a liberação de lipídeos pelos hepatócitos se mantêm de forma equilibrada (RUI, 2014). Quando este equilíbrio é alterado por eventos que aumentam as concentrações de triglicerídeos hepáticos, resulta na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (KAWANO; COHEN, 2013). A DHGNA é uma condição clínica caracterizada tanto histologicamente quanto metabolicamente pelo acúmulo de lipídios no interior dos hepatócitos sem associação com o consumo de bebida alcoólica. O acúmulo de lipídios pode ser derivado de múltiplos fatores, como o aumento da lipólise das células adiposas ou o aumento da

ingestão de gordura dietética, seguido pelo aumento de AGL, deficiências genéticas ou RI devido à hiperglicemia e hiperinsulinemia (BRUNT et al., 2015; DONNELLY et al., 2005). Ela abrange um amplo espectro de doenças, que causam alterações histopatológicas e também na função hepática. Varia de EH, sendo considerada a forma mais benigna da doença, até EHNA que é forma mais grave da doença, pois envolve dano e inflamação dos hepatócitos, além do excesso de gordura que aumenta as chances de desenvolver cirrose, insuficiência hepática e CH (FABBRINI; MAGKOS, 2015; RINELLA, 2015; CHAVES et al., 2012; DAY; JAMES, 1998).

Atualmente é considerada uma das mais frequentes doenças hepáticas, sendo um grave problema de saúde pública (SOUZA et al., 2012). Estima-se que os casos de DHGNA tenham dobrado nos últimos 20 anos, e que sua prevalência na população em geral seja entre 3% e 24% e superior a 80% em indivíduos obesos e diabéticos e em até 95% dos obesos mórbidos (LABRECQUE et al., 2014; SILVA; ESCANHOELA, 2012; WGO, 2012; VERNON et al., 2011).

O aumento da incidência da obesidade foi considerado um dos fatores de risco para o desenvolvimento de DHGNA, principalmente devido aos hábitos sedentários e de dietas com alta densidade calórica. A DHGNA é considerada a principal manifestação hepática da SM, devido ao seu amplo espectro de doenças relacionadas com a obesidade, como à RI, o DM2, DLP e a HAS (DUMAS et al., 2014; DIETRICH et al., 2014; MILIĆ et al., 2014; VERNON et al., 2011; TINIAKOS et al., 2010; BELLENTANI; MARINO, 2009; COTRIM, 2009; LAU et al., 2007). Depois da obesidade, o DM2 foi considerado o fator de risco que mais se relacionou à presença de DHGNA, independentemente de outros fatores relacionados a DHGNA. Em pacientes com DM2 a DHGNA é mais intensa e há um risco maior de progressão da doença, com consequente aumento na taxa de mortalidade (ORTIZ-LOPEZ et al., 2012; FERREIRA et al., 2010; CUSI et al., 2009; BOSQUES et al., 2008).

Os mecanismos envolvidos na etiologia da DHGNA ainda não foram totalmente esclarecidos. Atualmente a teoria mais aceita para explicar a progressão da DHGNA, é denominada de “duplo hit” de hipóteses, proposta por Day e James (1998). No “primeiro hit” a RI associada a obesidade, predispõem o acúmulo de TG nos hepatócitos, que ocasiona um desequilíbrio de fatores locais e sistêmicos que controlam o balanço entre a entrada e a saída de lipídios hepáticos. Tal fato aumenta a suscetibilidade de acontecer o “segundo hit”, que pode estar relacionado a diversos fatores, como o aumento do estresse oxidativo, desequilíbrio na produção de citocinas

inflamatórias e outros mecanismos relacionados com o excesso de lipídios nesse órgão. Conseqüentemente, esses fatores causam danos nos hepatócitos e inflamação, e estão relacionados à progressão da DHGNA (DAY; JAMES, 1998).

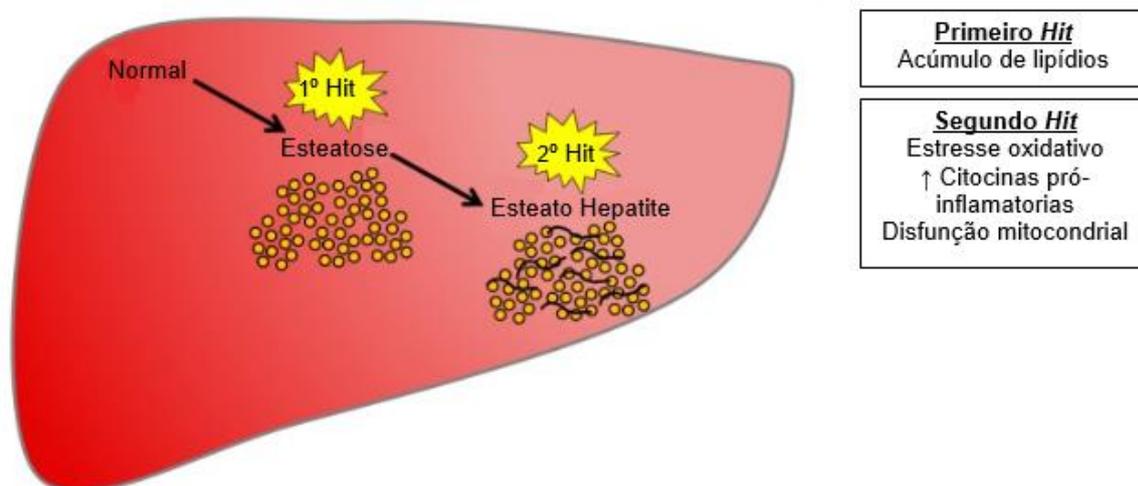


Figura 1 – Esquema da hipótese de “duplo hit”. Adaptado de Chen et al. (2018).

### 3.3 Sistema Nervoso Autônomo e sua ação sobre o metabolismo lipídico hepático

O sistema nervoso autônomo (SNA) é composto pelo sistema nervoso simpático (SNS) e sistema nervoso parassimpático (SNP). O SNA trabalha em estreita colaboração com o sistema nervoso central (SNC) para manter a homeostase do corpo e regular funções como ingestão alimentar, balanço energético, homeostase da glicose, processos inflamatórios e secreções glandulares (SILVERTHORN, 2017; PAGE; KENTISH, 2014; LEWELLYN-SMITHI, 2011; JÄNIG, 2008).

As fibras vagais possuem um papel crucial na regulação da homeostase corporal (BERTHOUD, 2008a). O nervo vago, o principal nervo da divisão parassimpática do SNA, consiste de aproximadamente 80% de fibras aferentes e 20% de fibras eferentes. Possui papel fundamental na saciedade e metabolismo regulando a fisiologia intestinal, cardiovascular, respiratória, imunológica e endócrina (JOHNSON; WILSON, 2018; BROWNING et al., 2017; YU et al., 2008; BERTHOUD, 2008b).

Existem vários mecanismos complexos envolvidos no controle do metabolismo corporal (FRIEDMAN, 2004). Estudos mostram que humanos e animais obesos

apresentam disfunções no SNA, apresentando diminuição da atividade simpática e aumento da atividade parassimpática. O aumento da atividade vagal pode levar ao aumento no armazenamento de gordura, perturbando a homeostase energética corporal (STEARNS et al., 2012; WEHRWEIN et al., 2011; PERSSON-SJÖGREN et al., 2004; INOUE; BRAY, 1977). Inoue e Bray em 1997, verificaram que a vagotomia subdiafragmática reverte a obesidade produzida por lesões hipotalâmicas em ratos. A vagotomia ocasiona perda de peso significativa, redução da secreção de insulina e melhora da homeostase glicêmica em modelos animais de obesidade (LUBACZEUSKI et al., 2017; BALBO et al., 2016; STEARNS et al., 2012; KRAL et al., 2009).

As ilhotas pancreáticas são ricamente innervadas por nervos parassimpáticos que potencializam a secreção de insulina das células  $\beta$  pancreáticas e nervos simpáticos que inibem a secreção de insulina (AHRÉN, 2000; BLOOM; EDWARDS, 1975). Assim, disfunções no SNA levam a uma diminuição na ação da insulina, causando um desequilíbrio na homeostase da glicose, produzindo hiperinsulinemia durante os estados de jejum e alimentação, o que pode causar várias complicações resultando no DM2 (KALSBECK et al., 2010; GREENFIELD; CAMPBELL, 2008; SHAFRIR, 1996; LAUTT, 1980).

A insulina possui um papel crucial na manutenção da homeostase de carboidratos e lipídios hepáticos, pois suprime a produção de glicose e promove a síntese lipídica (POSTIC; GIRARD, 2008; BROWN; GOLDSTEIN, 2008). O fígado é um dos principais órgãos envolvidos na manutenção da homeostase metabólica, ele é responsável pela produção de glicose hepática (HGP) e captação de glicose, sendo regulado pelo hipotálamo por meio de mecanismos mediados pelo nervo vago, que é um dos reguladores essenciais da ação normal da insulina no metabolismo da glicose (KALSBECK 2010; BERTHOUD, 2004; LAUTT, 1999; SHIMAZU et al., 1976).

Evidentemente, o SNA possui um papel importante na regulação do metabolismo lipídico hepático. Licht e colaboradores mostraram que a hipertrigliceridemia em pacientes com síndrome metabólica está fortemente associada com disfunções na atividade do SNA (LICHT et al., 2010). Estudos mostraram que disfunções autonômicas são comuns em pacientes com doença hepática, sendo relacionadas com o surgimento e progressão da doença (SABATH et al., 2015; KAWANO; COHEN, 2013; OLIVER et al., 1997). A vagotomia hepática pode alterar o metabolismo lipídico, diminuindo significativamente a concentração

basal de TG plasmáticos e a secreção de Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (VLDL). Segundo Gao e colaboradores ela também previne a EHNA e normalizou a expressão de proteínas envolvidas na síntese de AGL (GAO et al., 2015).

### **3.4 Ação do baço sobre o processo inflamatório e o perfil lipídico e sua relação com o sistema nervoso autônomo**

O baço é o maior órgão linfoide do corpo e desempenha um papel importante na resposta imune, uma vez que é responsável por filtrar o sangue de partículas antigênicas e de células anormais e envelhecidas. É organizado em duas regiões chamadas polpa vermelha e polpa branca, a polpa vermelha contém muitos macrófagos que agem como um filtro capturando e destruindo material estranho circulante no sangue. A polpa branca é o local de armazenamento para linfócitos T e B que protegem o organismo contra doenças e infecções, desempenhado assim um papel fundamental na modulação de respostas imunológicas e inflamatórias (BRONTE; PITTET, 2013; TARANTINO et al., 2013; TARANTINO et al., 2011).

Disfunções do sistema imunológico esplênico podem ocorrer na obesidade, devido ao acúmulo de lipídios que desencadeiam uma inflamação sistêmica crônica de baixo grau de origem não infecciosa (VAN GREEVENBROEK et al., 2013; HOTAMISLIGIL, 2006; PESTKA et al., 2004). Vários tipos de células do sistema imune participam da inflamação desencadeada pela obesidade (LUMENG; SALTIEL, 2011). Estudos mostraram que ratos obesos apresentam expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias, como IL 6 e TNF- $\alpha$  e uma diminuição da produção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina 2 (IL2) e interleucina 10 (IL10) (GOTOH et al., 2012; LAMAS et al., 2004; LAMAS et al., 2002).

A inflamação induzida pela obesidade ocorre em vários tecidos envolvidos na homeostase energética como o pâncreas, tecido adiposo, SNC e o fígado (INCIO et al., 2016; BUCKMAN et al., 2014; PARK et al., 2010; XU et al., 2003). Nesses tecidos, a inflamação possui um papel crucial na progressão e desenvolvimento de várias comorbidades associadas à obesidade, como DM2, doenças cardiovasculares e DHGNA (CHANG et al., 2008; TARGHER et al., 2008; HOTAMISLIGIL, 2006; LI et al., 2005).

Na esteatose hepática as vias de sinalização envolvidas na inflamação são aumentadas, o acúmulo excessivo de lipídios causa danos nos hepatócitos, ativando

a resposta inflamatória, semelhante ao que ocorre obesidade, estando assim, associada ao aumento nas citocinas pró-inflamatórias e nas células imunes (WREE et al., 2014; BAFFY, 2009; KREMER et al., 2006; LI et al., 2005). O baço possui uma correlação anatômica com o fígado. Alguns estudos analisaram a relação entre o metabolismo lipídico e o baço e demonstraram que o baço desempenha um papel importante no metabolismo lipídico, evidenciando que as atividades metabólicas dos dois tecidos podem estar ligados (KERAMIDA et al., 2018; PAULO et al., 2009; PAULO et al., 2007; PETROIANU et al., 2006; BROWN, 1992).

Estudos investigaram a relação entre o baço e o metabolismo lipídico usando roedores esplenectomizados e alimentados com dieta rica em gordura. Observaram que após a esplenectomia os animais apresentaram um aumento no acúmulo de lipídios hepáticos (INOUE et al., 2012a; PAULO et al., 2009; FATOUROS et al., 1995). Inoue e colaboradores mostraram que ratos esplenectomizados, exibiram piora na dislipidemia, alterações inflamatórias no tecido adiposo, aumento de triglicerídeos nos tecidos e agravo na EH (INOUE et al., 2012b).

Estudos demonstraram que o sistema imunológico é influenciado pelo SNC por meio do nervo vago, sugerindo que o nervo vago serve como uma via informativa para sinais inflamatórios que se originam fora do cérebro. O nervo vago atinge diferentes órgãos, incluindo o baço, um órgão necessário para o controle da inflamação, através da via anti-inflamatória colinérgica, regulando a resposta imune e as concentrações de citocinas através de um receptor nicotínico de acetilcolina contendo a subunidade  $\alpha 7$  (PAVLOV; TRACEY, 2012; TIN et al., 2012; WANG et al., 2003).

A acetilcolina (ACh) é o principal neurotransmissor vagal, e através da sua ativação, o nervo vago controla a produção de citocinas pró-inflamatórias (HUSTON et al., 2006; WANG et al., 2003; BOROVIKOVA et al., 2000). Borovikova e colaboradores evidenciaram que a ACh atenuou significativamente a liberação de citocinas pró-inflamatórias, mas não alterou a liberação de IL-10, mostrando assim o efeito inibitório da ACh sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias (BOROVIKOVA et al., 2000).

A influência do nervo vago sobre o baço é necessária para a regulação de citocinas (HUSTON et al., 2006). Um estudo com modelo experimental mostrou que a esplenectomia reduziu significativamente os níveis séricos de TNF- $\alpha$  em 80%, sugerindo que o baço é um dos principais contribuintes para a produção sistêmica de

TNF- $\alpha$ . Também foi relatado que a estimulação do nervo vago não foi capaz de inibir a produção de TNF- $\alpha$  em camundongos esplenectomizados (HUSTON et al., 2006). Estas evidências indicam a ocorrência de interconexões funcionais entre os sistemas imune e nervoso, no entanto, ainda não foi identificada uma inervação direta do baço pelo nervo vago (ROSAS-BALLINA et al., 2008; MIGNINI et al., 2003; CANO et al., 2001; BERTHOUD; POWLEY, 1993; BELLINGER et al., 1989; NANCE, 1989).

### **3.5 Modelo de indução de obesidade por glutamato monossódico (MSG)**

Vários modelos experimentais de obesidade são utilizados para o estudo de alterações metabólicas. Um deles é o de obesidade hipotalâmica, induzida por glutamato monossódico (MSG), que em doses elevadas causam lesões no SNC. Quando administrado na fase neonatal, onde a barreira hematoencefálica ainda não se encontra totalmente desenvolvida, o MSG provoca lesões em regiões hipotalâmicas, principalmente no Núcleo Arqueado (ARQ) e na eminência mediana (EM) do hipotálamo devido ao acesso facilitado da substância no SNC, levando ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos (CUNHA et al., 2010; CESARETTI; KOBLMANN-JUNIOR, 2006; MACHO et al., 2000; OLNEY, 1969; OLNEY; SHARPE, 1969). Essas lesões induzem redução na concentração do hormônio do crescimento (GH), resultando em um retardo no crescimento e redução do peso corporal e da maioria dos órgãos (MAITER et al., 1991; KLINGBERG et al., 1987). Este modelo tem sido descrito por assemelhar-se, pelo menos em partes, à situação clínica de síndrome metabólica. Animais MSG são caracteristicamente obesos apresentando normo ou hipofagia, RI e DM. Além disso, apresentam aumento nas concentrações plasmáticas de TG e AGL, que levam à alterações hepáticas semelhantes a esteatose hepática em humanos (NARDELLI et al., 2011; CUNHA et al., 2010; SASAKI et al., 2009; NAKANISHI et al., 2008; BALBO et al., 2007; MACHO et al., 2000; HIRATA et al., 1997).

A participação do SNA neste modelo experimental é muito importante, visto que seu funcionamento é prejudicado pela lesão hipotalâmica. Alterações dos ramos autonômicos como diminuição da atividade simpática e elevada atividade parassimpática contribuem diretamente para aumentar a secreção de insulina, diminuir a lipólise no tecido adiposo e estimular a lipogênese sendo essa uma das causas da obesidade (ANDREAZZI et al., 2011; INOUE & BRAY, 1977;

JEANRENAUD et al., 1992; BRAY, 1991; JEANRENAUD, 1985; ROHNER-JEANRENAUD et al., 1983).

Todas as alterações características que ocorrem no modelo MSG citadas acima, se assemelham às encontradas em pacientes com obesidade hipotalâmica, o que o torna um bom modelo para o estudo dessas alterações.

#### 4. REFERÊNCIAS

ANDREAZZI, A. E.; GRASSIOLLI, S.; MARANGON, P. B.; MARTINS, A. G.; DE OLIVEIRA, J. C.; TORREZAN, R.; DE FREITAS MATHIAS, P. C. Impaired sympathoadrenal axis function contributes to enhanced insulin secretion in prediabetic obese rats. **Experimental diabetes research**, v. 2011, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA – ABESO. Ganho de peso na gestação. Disponível em <<http://abeso.org.br/pagina/14/artigos.shtml>> 2011.

AHRÉN, B. Autonomic regulation of islet hormone secretion—implications for health and disease. **Diabetologia**, v. 43, n. 4, p. 393-410, 2000.

BAFFY, G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. **Journal of hepatology**, v. 51, n. 1, p. 212-223, 2009.

BALBO, S. L.; GRASSIOLLI, S.; RIBEIRO, R. A.; BONFLEUR, M. L.; GRAVENA, C.; DO BRITO, N. M.; TORREZAN, R. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. **Endocrine**, v. 31, n. 2, p. 142-148, 2007.

BALBO, S. L.; RIBEIRO, R. A.; MENDES, M. C.; LUBACZEUSKI, C.; MALLER, A. C. P. A.; CARNEIRO, E. M.; BONFLEUR, M. L. Vagotomy diminishes obesity in cafeteria rats by decreasing cholinergic potentiation of insulin release. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 72, n. 4, p. 625-633, 2016.

BELLENTANI, S.; MARINO, M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol*, v. 8, n. Suppl 1, p. S4-S8, 2009.

BELLINGER, D. L.; FELTEN, S. Y.; LORTON, D.; FELTEN, D. L. Origin of noradrenergic innervation of the spleen in rats. **Brain, behavior, and immunity**, v. 3, n. 4, p. 291-311, 1989.

BERNIK, T. R.; FRIEDMAN, S. G.; OCHANI, M.; DIRAIMO, R.; SUSARLA, S.; CZURA, C. J.; TRACEY, K. J. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. **Journal of vascular surgery**, v. 36, n. 6, p. 1231-1236, 2002.

BERTHOUD, H. R.; POWLEY, TERRY. L. Characterization of vagal innervation to the rat celiac, suprarenal and mesenteric ganglia. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 42, n. 2, p. 153-169, 1993.

BERTHOUD, H. R. Anatomy and function of sensory hepatic nerves. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, v. 280, n. 1, p. 827-835, 2004.

BERTHOUD, H. R. The vagus nerve, food intake and obesity. **Regulatory peptides**, v. 149, n. 1-3, p. 15-25, 2008, a.

BERTHOUD, H. R. Comunicação vagal e hormonal do intestino-cérebro: da saciedade à satisfação. **Neurogastroenterol Motil**, v. 20, p. 64-72, 2008, b.

BLOOM S. R.; EDWARDS, A. V. The release of pancreatic glucagon and inhibition of insulin in response to stimulation of the sympathetic innervation. **Journal Physiol**, v. 253, p.157-173, 1975.

BOROVIKOVA, L. V.; IVANOVA, S.; ZHANG, M.; YANG, H.; BOTCHKINA, G. I.; WATKINS, L. R.; TRACEY, K. J. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 458, 2000.

BOSQUES-PADILLA, F.; AGUIRRE, J. G.; TAMAYO, J. L.; ROMETTI, M. S.; ENRÍQUEZ, W. K.; AGUILERA, J. C.; LÓPEZ, A. E.; ÁVALOS, L. A.; ARIÑO-MUCIÑO, M. Gastroenterology diagnosis and treatment guidelines of non alcoholic hepatic disease. **Revista de gastroenterologia de Mexico**, v. 73, n. 2, p. 129, 2008.

BRADBURY, M. W. Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 2, p. G194-G198, 2006.

BRAY, G, A.; YORK, D, A. The MONA LISA hypothesis in the time of leptin. *Recent Progress in Hormone Research*, v. 53, p. 95-117; discussion 117-8, 1998.

BRAY, G. A.; INOUE, S.; NISHIZAWA, Y. Hypothalamic obesity. **Diabetologia**, v. 20, n. 1, p. 366-377, 1981.

BRAY, G.A. Obesity, a disorder of nutrient partitioning: the Monalisa hypothesis. **The Journal of nutrition**, v. 121 (8), p. 1146-1162, 1991.

BRONTE, V.; PITTET, M, J. The spleen in local and systemic regulation of immunity. **Immunity**, v. 39, n. 5, p. 806-818, 2013.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J.sab L. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. **Cell metabolism**, v. 7, n. 2, p. 95-96, 2008.

BROWNING, K. N.; VERHEIJDEN, S.; BOECKXSTAENS, G. E. The vagus nerve in appetite regulation, mood, and intestinal inflammation. **Gastroenterology**, v. 152, n. 4, p. 730-744, 2017.

BRUINSTROOP, E.; PEI, L.; ACKERMANS, M.T.; FOPPEN, E.; BORGERS, A.J.; KWAKKEL, J.; ALKEMADE, A.; FLIERS, E.; KALSBECK, A. Hypothalamic neuropeptide Y (NPY) controls hepatic VLDL-triglyceride secretion in rats via the sympathetic nervous system. **Diabetes**, p.111-142, 2012.

BUCKMAN, L, B.; HASTY, A. H.; FLAHERTY, D. K.; BUCKMAN, C. T.; THOMPSON, M. M.; MATLOCK, B. K.; ELLACOTT, K. L. Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. **Brain, behavior, and immunity**, v. 35, p. 33-42, 2014.

CAIAZZO, R.; ARNALSTEEN, L.; PIGEYRE, M.; DEZFOULIAN, G.; VERKINDT, H., KIRKBY-BOTT, J.; PATTOU, F. Long-term metabolic outcome and quality of life after laparoscopic adjustable gastric banding in obese patients with type 2 diabetes mellitus or impaired fasting glucose. **British Journal of Surgery**, v. 97, n. 6, p. 884-891, 2010.

CANO, G. SVED, A. F.; RINAMAN, L.; RABIN, B. S.; & CARD, J. P. Characterization of the central nervous system innervation of the rat spleen using viral transneuronal tracing. **Journal of Comparative Neurology**, v. 439, n. 1, p. 1-18, 2001.

CARVALHO, B. de M. A influência da flora intestinal e da esplenectomia na resistência à insulina induzida por obesidade. Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, 2012.

CESARETTI, M. L. R.; KOBLMANN-JUNIOR, O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 190-197, 2006.

CHANG, Y.; RYU, S.; SUNG, E.; WOO, H. Y.; OH, E.; CHA, K.; KIM, W. S. Nonalcoholic fatty liver disease predicts chronic kidney disease in nonhypertensive and nondiabetic Korean men. **Metabolism**, v. 57, n. 4, p. 569-576, 2008.

CHAVES, G. V.; SOUZA, D. S.; PEREIRA, S. E.; SABOYA, C. J.; PERES, W. A. F. Associação entre doença hepática gordurosa não alcoólica e marcadores de função/lesão hepática com componentes da síndrome metabólica em indivíduos obesos classe III. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 288-293, 2012.

COOK, T.; RUTISHAUSER, I. H. E.; SEELIG, M. Comparable data on food and nutrient intake and physical measurements from the 1983, 1985 and 1995 national nutrition surveys. *Health and Aged Care*, 2001.

COTRIM, H. P. Doença hepática gordurosa não-alcoólica: história natural. **Gazeta médica da Bahia**, v. 79, n. 1, 2009.

CUNHA, N. V.; DE ABREU, S. B.; PANIS, C.; GRASSIOLLI, S.; GUARNIER, F. A.; CECCHINI, R.; MARTINS-PINGE, M. CCox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats. **Life Sciences**, v.87, n.11– 12, p.375–381, 2010.

CUSI K. Nonalcoholic fatty liver disease in type diabetes mellitus. *Current Opinion in Endocrinology*, **Diabetes and Obesity**, v. 16, n. 2, p. 141-149, 2009.

DAY, C.P.; JAMES, O. F. Steatohepatitis: a tale of two "hits". **Gastroenterology**, n. 114, p. 842-845, 1998.

DEMIR, M.; LANG, S.; STEFFEN, H. Nonalcoholic fatty liver disease: current status and future directions. **Journal of Digestive Diseases**, v. 16, n. 10, p. 541-557, 2015.

DONNELLY, Kerry L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D., & Parks, E. J. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 5, p. 1343-1351, 2005.

DUMAS, R.; CAMOMILLA, V.; BONCI, T.; CHEZE, L.; CAPPOZZO, A. A qualitative analysis of soft tissue artefact during running. **Computer methods in biomechanics and biomedical engineering**, v. 17, n. sup1, p. 124-125, 2014.

DIETRICH P, HELLERBRAND C. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 28, n. 4, p. 637-653, 2014.

FABBRINI, E.; MAGKOS, F. Hepatic steatosis as a marker of metabolic dysfunction. **Nutrients**, v. 7, n. 6, p. 4995-5019, 2015.

FARRELL, G. C.; VAN ROOYEN, D.; GAN, L.; CHITTURI, S. Nash is an inflammatory disorder: pathogenic, prognostic and therapeutic implications. **Gut and liver**, v. 6, n. 2, p. 149, 2012.

FERREIRA, V. S. G.; PERNAMBUCO, R. B.; LOPES, E. P.; MORAIS, C. N., RODRIGUES, M. C.; ARRUDA, M. J.; VILAR, L. Frequency and risk factors associated with non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 4, p. 362-368, 2010.

FISBERG, M.; FIORILLO, C. Obesidade infantil: multifatorial e multifacial. In: WAITZBERG, D.L. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica, 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 1217-1229, 2009.

FRIEDMAN, Jeffrey M. Modern science versus the stigma of obesity. **Nature medicine**, v. 10, n. 6, p. 563, 2004.

FRITSCHÉ, L.; WEIGERT, C.; HARING, H. U.; LEHMANN, R. How insulin receptor substrate proteins regulate the metabolic capacity of the liver-implications for health and disease. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 13, p. 1316-1329, 2008.

GAO, X.; VAN DER VEEN, J. N.; ZHU, L., CHABA, T.; ORDOÑEZ, M., LINGRELL, S.; JACOBS, R. L. Vagus nerve contributes to the development of steatohepatitis and obesity in phosphatidylethanolamine N-methyltransferase deficient mice. **Journal of hepatology**, v. 62, n. 4, p. 913-920, 2015.

GLUCHOWSKI, N. L.; BECUWE, M.; WALTHER, T. C.; FARESE JR, R. V. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 6, p. 343, 2017.

GOTOH, K.; INOUE, M.; MASAKI, T.; CHIBA, S.; SHIRAISHI, K.; SHIMASAKI, T.; AOKI, K. Obesity-related chronic kidney disease is associated with spleen-derived IL-10. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 28, n. 5, p. 1120-1130, 2012.

GEARHARDT, A. N.; BRAGG, M. A.; PEARL, R. L.; SCHVEY, N. A.; ROBERTO, C. A.; BROWNELL, K. D. Obesity and public policy. **Annual review of clinical psychology**, v. 8, p. 405-430, 2012.

GREENFIELD, J. R.; CAMPBELL, L. V. Role of the autonomic nervous system and neuropeptides in the development of obesity in humans: targets for therapy? **Current pharmaceutical design**, v. 14, n. 18, p. 1815-1820, 2008.

GUARINI, S.; ALTAVILLA, D.; CAINAZZO, M. M.; GIULIANI, D.; BIGIANI, A.; MARINI, H.; ADAMO, E. B. Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor- $\kappa$ B activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock. **Circulation**, v. 107, n. 8, p. 1189-1194, 2003.

HAMAOKA, K.; KUSUNOKI, T. Morphological and cell proliferative study on the growth of visceral organs in monosodium L-glutamate-treated obese mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 32, n. 4, p. 395-411, 1986.

HILL, J. O.; WYATT, H. R.; PETERS, J. C. Energy balance and obesity. **Circulation**, v. 126, n. 1, p. 126-132, 2012.

HIRATA, A. E.; ANDRADE, I. S. D.; VASKEVICIUS, P.; DOLNIKOFF, M. S. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 671-67, 1997.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860, 2006.

HUSTON, JARED M.; OCHANI, M.; ROSAS-BALLINA, M.; LIAO, H.; OCHANI, K.; PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 7, p. 1623-1628, 2006.

INCIO, J.; LIU, H.; SUBOJ, P.; CHIN, S. M.; CHEN, I. X.; PINTER, M.; BABYKUTTY, S. Obesity-induced inflammation and desmoplasia promote pancreatic cancer progression and resistance to chemotherapy. **Cancer discovery**, p. CD-15-1177, 2016.

INOUE, S.; BRAY, G. A. The effects of subdiaphragmatic vagotomy in rats with ventromedial hypothalamic obesity. **Endocrinology**, v. 100, n. 1, p. 108-114, 1977.

INOUE, M.; GOTOH, K.; SEIKE, M.; MASAKI, T.; ORIBE, J.; HONDA, K.; YOSHIMATSU, H. Involvement of remnant spleen volume on the progression of steatohepatitis in diet-induced obese rats after a splenectomy. **Hepatology Research**, v. 42, n. 2, p. 203-212, 2012, a.

INOUE, M.; GOTOH, K.; SEIKE, M.; MASAKI, T.; HONDA, K.; KAKUMA, T.; YOSHIMATSU, H. Role of the spleen in the development of steatohepatitis in high-fat-diet-induced obese rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, n. 4, p. 461-470, 2012, b.

JÄNIG, W. Integrative action of the autonomic nervous system: Neurobiology of homeostasis. Cambridge University Press, p. 268-285, 2008.

JEANRENAUD, B.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; CUSIN, I.; GUILLAUME-GENTIL, C.; TERRETTAZ, J. Role of the autonomic nervous system in obesity and type II diabetes in rodents. In: *Obesity: Basic Concepts and Clinical Aspects*. **Karger Publishers**, p. 151-156, 1992.

JEANRENAUD, B. An hypothesis on the aetiology of obesity: dysfunction of the central nervous system as a primary cause. **Diabetologia**, v. 28, n. 8, p.502-513, 1985.

JOHNSON, A. M. F.; OLEFSKY, J. M. The origins and drivers of insulin resistance. **Cell**, v. 152, n. 4, p. 673-684, 2013.

JOHNSON, R, L.; WILSON, C, G. A review of vagus nerve stimulation as a therapeutic intervention. **Journal of inflammation research**, v. 11, p. 203, 2018.

JOU, J. CHOI, S. S.; DIEHL, A. M. Mechanisms of Disease Progression in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Seminars in Liver Disease**, n. 28, p. 4-14, 2008.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Santos, 1983.

JUNQUEIRA, L, C, U.; CARNEIRO, J. Histologia Básica, 12ª edição, 2013.

KALSBECK, A.; BRUINSTROOP, E., YI, C. X., KLIEVERIK, L. P., LA FLEUR, S. E., & FLIERS, E. Hypothalamic control of energy metabolism via the autonomic nervous system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1212, n. 1, p. 114-129, 2010.

KAWANO, Y.; COHEN, D. E. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of gastroenterology**, v. 48, n. 4, p. 434-441, 2013.

KLINGBERG, H.; BRANKACKI, J.; KLINGBERG, F. Long-term effects on behaviour after postnatal treatment with monosodium-L-glutamate. **Biomed. Biochem. Acta**. v. 46, p. 705–711, 1987.

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

KRAL, J. G.; PAEZ, W.; WOLFE, B. M. Vagal nerve function in obesity: therapeutic implications. **World journal of surgery**, v. 33, n. 10, p. 1995, 2009.

LABRECQUE, D. R.; ABBAS, Z.; ANANIA, F.; FERENCI, P.; KHAN, A. G.; GOH, K. L.; HAMID, S. S.; ISAKOV, V.; LIZARZABAL, M.; PENARANDA, M. M.; RAMOS, J. F.; SARIN, S.; STIMAC, D.; THOMSON, A. B.; UMAR, M.; KRABSHUIS, J. L. A. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 48, n. 6, p. 467-473, 2014.

LAM, T. K.; GUTIERREZ-JUAREZ, R.; POCAI, A.; BHANOT, S.; TSO, P.; SCHWARTZ, G.J.; ROSSETTI, L. Brain glucose metabolism controls the hepatic secretion of triglyceride-rich lipoproteins. **Nature medicine**, v.13, n.2, p.171. 2007.

LAMAS, O.; MARTÍNEZ, J. A.; MARTI, A. Decreased splenic mRNA expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in diet-induced obese animals. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 60, n. 4, p. 279, 2004.

LAMAS, O.; MARTI, A.; MARTINEZ, J. A. Obesity and immunocompetence. **European journal of clinical nutrition**, v. 56, n. S3, p. S42, 2002.

LAU, D. C. W.; DOUKETIS, J. D.; MORRISON, K. M.; HRAMIAK, I. M.; SHARMA, A. M, UR, E. Canadian clinical practice guidelines on the management and prevention of obesity in adults and children. **Canadian medical association journal**, v. 176, n. 8, p. 1-13, 2007.

LAUTT, W. W. Hepatic parasympathetic neuropathy as cause of maturity-onset diabetes? General Pharmacology: **The Vascular System**, v. 11, n. 4, p. 343-345, 1980.

LAUTT, W. W. The HISS story overview: a novel hepatic neurohumoral regulation of peripheral insulin sensitivity in health and diabetes. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 77, n. 8, p. 553-562, 1999.

LEITE-CAVALCANTI, C.; RODRIGUES-GONÇALVES, M. D. C.; RIOS-ASCIUTTI, L. S.; LEITE-CAVALCANTI, A. Prevalência de doenças crônicas e estado nutricional em um grupo de idosos brasileiros. **Revista de Salud Pública**, v. 11, n. 6, 2009.

DE CARVALHO LEITE, N.; MONTES, E. G.; FISHER, S. V.; CANCIAN, C. R. C.; DE OLIVEIRA, J. C., MARTINS-PINGE, M. C.; GRASSIOLLI, S. Splenectomy attenuates obesity and decreases insulin hypersecretion in hypothalamic obese rats. **Metabolism**, v. 64, n. 9, p. 1122-1133, 2015.

LEAVENS, K, F.; BIRNBAUM, M. J. Insulin signaling to hepatic lipid metabolism in health and disease. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 46, n. 3, p. 200-215, 2011.

LEWELLYN-SMITH I, J. Sympathetic preganglionic neurons Central Regulation of Autonomic Functions. New York: Oxford University Press, p. 98- 119 ,2011.

LI, ZHIPING; SOLOSKI, MARK J.; DIEHL, ANNA MAE. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 880-885, 2005

LICHT, C. M. M.; VREEBURG, S. A.; VAN REEDT DORTLAND, A. K.; GILTAY, E. J.; HOOGENDIJK, W. J.; DERIJK, R. H.; PENNINX, B. W. Increased sympathetic and decreased parasympathetic activity rather than changes in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity is associated with metabolic abnormalities. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 5, p. 2458-2466, 2010.

LOPES D. S.; COSTA MACIEL, T. R.; SABLICH, G. M. Diabetes tipo 2 na infância: revisão de literatura. **ConScientiae Saúde**, v. 6, n. 1, 2007.

LUBACZEUSKI, C.; BALBO, S. L.; RIBEIRO, R. A.; VETTORAZZI, J. F.; SANTOS-SILVA, J. C.; CARNEIRO, E. M.; BONFLEUR, M. L. Vagotomy ameliorates islet morphofunction and body metabolic homeostasis in MSG-obese rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 5, p. 447-457, 2015.

LUBACZEUSKI, C.; GONÇALVES, L. M.; VETTORAZZI, J. F.; KURAUTI, M. A.; SANTOS-SILVA, J. C.; BONFLEUR, M. L.; CARNEIRO, E. M. Vagotomy Reduces Insulin Clearance in Obese Mice Programmed by Low-Protein Diet in the Adolescence. **Neural plasticity**, v. 2017, 2017.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesidade induz uma mudança fenotípica na polarização dos macrófagos do tecido adiposo. **Journal of Clinical Investigation**, v.117, p.175–184, 2007.

LUMENG, C. N.; SALTIEL, A R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2111-2117, 2011.

MACHO, L.; FICKOVA, M. ZORAD, S. Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. **Physiology Research**, v.49, n. 1, p.79-85, 2000.

MAITER, D.; UNDERWOOD, L. E.; MARTIN, J. B.; KOENIG, J. I. Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. **Endocrinology**, v. 128, p. 1100-1106, 1991.

MILIĆ, S.; LULIĆ, D.; ŠTIMAC, D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 28, p. 9330, 2014.

MIGNINI, F.; STRECCIONI, V.; AMENTA, F. Autonomic innervation of immune organs and neuroimmune modulation. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, v. 23, n. 1, p. 1-25, 2003.

MORALES-VILLEGAS, E. Dyslipidemia, hypertension and diabetes metaflammation: A unique mechanism for 3 risk factors. **Current hypertension reviews**, v. 9, n. 4, p. 278-296, 2013.

MURATA, K.; SHIRAKI, K.; SUGIMOTO, K.; TAKASE, K.; NAKANO, T.; FURUSAKA, A.; TAMEDA, Y. Splenectomy enhances liver regeneration through tumor necrosis factor (TNF)-alpha following dimethylnitrosamine-induced cirrhotic rat model. **Hepato-gastroenterology**, v. 48, n. 40, p. 1022-1027, 2001.

MURATA, K.; ITO, K.; YONEDA, K.; SHIRAKI, K.; SAKURAI, H.; ITO, M. Splenectomy improves liver function in patients with liver cirrhosis. **Hepato-gastroenterology**, v. 55, n. 85, p. 1407-1411, 2008.

NAKANISHI, Y.; TSUNEYAMA, K.; FUJIMOTO, M.; SALUNGA, T. L.; NOMOTO, K.; AN, J. L.; SHIMADA, T. Monosodium glutamate (MSG): a villain and promoter of liver inflammation and dysplasia. **Journal of autoimmunity**, v. 30, n. 1-2, p. 42-50, 2008.

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

NARDELLI, T. R.; RIBEIRO, R. A.; BALBO, S. L.; VANZELA, E. C.; CARNEIRO, E. M.; BOSCHERO, A. C.; BONFLEUR, M. L. Taurine prevents fat deposition and ameliorates plasma lipid profile in monosodium glutamate-obese rats. **Amino acids**, v. 41, n. 4, p. 901-908, 2011.

NUNES, J. R. N. F.; DEBASTIANI, D.; NUNES, A. D.; PERES, K. G. Prevalência de fatores de risco cardiovascular em adultos de Luzerna, Santa Catarina, 2006. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 89, n. 5, p. 319-324, 2007.

ODEGAARD, J. I.; RICARDO-GONZALEZ, R. R.; GOFORTH, M. H.; MOREL, C. R.; SUBRAMANIAN, V.; MUKUNDAN, L.; CHAWLA, A. Macrophage-specific PPAR $\gamma$  controls alternative activation and improves insulin resistance. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1116, 2007.

OLIVER, M. I.; MIRALLES, R.; RUBIES-PRAT, J.; NAVARRO, X.; ESPADALER, J. M.; SOLA, R.; ANDREU, M. Autonomic dysfunction in patients with non-alcoholic chronic liver disease. **Journal Hepatol**, 26: 1242-1248, 1997.

OLNEY, J. W.; SHARPE, L. G. Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 166, n. 3903, p. 386-388, 1969.

OLNEY, J. W.; ADAMO, N. J.; RATNER, A. Monosodium glutamate effects. **Science**, v. 172, n. 3980, p. 294-294, 1971.

ORTIZ-LOPEZ, C.; LOMONACO, R.; ORSAK, B.; FINCH, J.; CHANG, Z.; KOCHUNOV, V. G.; HARDIES, J.; CUSI, K. Prevalence of prediabetes and diabetes and metabolic profile of patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Diabetes Care**, v. 35, p. 873-878, 2012.

PAGE, A. J.; KENTISH, S. J. Vagal leptin signalling: A double agent in energy homeostasis? **Molecular metabolism**, v. 3, n. 6, p. 593, 2014.

PARK, E. J.; LEE, J. H.; YU, G. Y.; HE, G.; ALI, S. R.; HOLZER, R. G.; OSTERREICHER, C. H.; TAKAHASHI, H.; KARIN, M. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. **Cell**, v. 140, n. 2, p. 197-208, 2010.

PAULO, D. N. S.; PAULO, I. C.; MORAIS, A. A.; KALIL, M.; GUERRA, A. J.; COLNAGO, G. L.; Faintuch, J. Is splenectomy a dyslipidemic intervention? Experimental response of serum lipids to different diets and operations. **Microsurgery: Official Journal of the International Microsurgical Society and the European Federation of Societies for Microsurgery**, v. 29, n. 2, p. 154-160, 2009.

PAULO, I. C. A. L.; PAULO, D. N. S.; KALIL, M.; GUERRA, A. J.; GUERZET, E. A. Lípidios plasmáticos em ratos após cirurgia esplênica—efeito de dois tipos de dieta. **Cep**, v. 29042, p. 753, 2007.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The vagus nerve and the inflammatory reflex—linking immunity and metabolism. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 12, p. 743, 2012.

PERRINI, S.; LEONARDINI, A.; LAVIOLA, L.; GIORGINO, F. Biological specificity of visceral adipose tissue and therapeutic intervention. **Archives of physiology and biochemistry**, v. 114, n. 4, p. 277-286, 2008.

PERSSON-SJÖGREN, S.; ELMI, A.; LINDSTRÖM, P. Effects of leptin, acetylcholine and vasoactive intestinal polypeptide on insulin secretion in isolated ob/ob mouse pancreatic islets. **Acta diabetologica**, v. 41, n. 3, p. 104-112, 2004.

PETROIANU, A.; VELOSO, D. F. M.; COSTA, G. R.; ALBERTI, L. R. Efeitos de operações sobre o baço no lipidograma de ratas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 1, p. 56-9, 2006.

PESTKA, SIDNEY. KRAUSE, C. D., SARKAR, D., WALTER, M. R., SHI, Y., & FISHER, P. B. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annu. Rev. Immunol**, v. 22, p. 929-979, 2004.

POSTIC, C.; GIRARD, J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 3, p. 829-838, 2008.

QUINTÃO, E. C.; NAKANDAKARE, E. R.; PASSARELLI, M. Lípidios: do metabolismo à aterosclerose. São Paulo: Sarvier, 2011.

RINELLA, M. E. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. **Jama**, v. 313, n. 22, p. 2263-2273, 2015.

ROSAS-BALLINA, M.; OCHANI, M.; PARRISH, W. R.; OCHANI, K.; HARRIS, Y. T.; HUSTON, J. M.; TRACEY, K. J. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 31, p. 11008-11013, 2008.

ROHNER-JEANRENAUD, F.; HOCHSTRASSER, A. C.; JEANRENAUD, B. Hyperinsulinemia of preobese and obese fa/fa rats is partly vagus nerve mediated. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 244, n. 4, p. E317-E322, 1983.

SABATH, E.; BÁEZ-RUIZ, A.; BUIJS, R. M. Non-alcoholic fatty liver disease as a consequence of autonomic imbalance and circadian desynchronization. **Obesity reviews**, v. 16, n. 10, p. 871-882, 2015.

SASAKI, Y.; SHIMADA, T.; IIZUKA, S.; NAKAMURA, S.; NAGATA, M.; ABURADA, M. Dose dependent development of diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis in monosodium glutamate-induced obese mice. **Life sciences**, v. 85, n. 13-14, p. 490-498, 2009.

SHAFRIR, E. Development and consequences of insulin resistance: lessons from animals with hyperinsulinaemia. **Diabetes & metabolism**, v. 22, n. 2, p. 122-131, 1996.

SHIMAZU, T.; MATSUSHITA, H; ISHIKAWA, K. Cholinergic stimulation of the rat hypothalamus: effects of liver glycogen synthesis. **Science**, v. 194, n. 4264, p. 535-536, 1976.

SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2169-2180, 2007.

SILVERTHORN, Dee Unglaub. Fisiologia humana: uma abordagem integrada. Artmed editora, 2017.

SILVA, J.H.; ESCANHOELA, C. A. F. Doença hepática gordurosa não alcoólica: patogênese e achados histológicos com ênfase nas alterações mitocondriais. **Revista de Ciências Médicas**, v. 18, n. 6, 2012.

SHUSTER, A.; PATLAS, M.; PINTHUS, J. H.; MOURTZAKIS, M. The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. **The British journal of radiology**, v. 85, n. 1009, p. 1-10, 2012.

SOARES, G. M.; C, K. R., BALBO, S. L.; RIBEIRO, R. A.; ALEGRE-MALLER, A. C. P.; BARBOSA-SAMPAIO, H. C.; BONFLEUR, M. L. Liver steatosis in hypothalamic obese rats improves after duodeno-jejunal bypass by reduction in de novo lipogenesis pathway. **Life sciences**, v. 188, p. 68-75, 2017.

STEARNS, A. T. BALAKRISHNAN, A., RADMANESH, A., ASHLEY, S. W., RHOADS, D. B., & TAVAKKOLIZADEH, A. Relative contributions of afferent vagal fibers to resistance to diet-induced obesity. **Digestive diseases and sciences**, v. 57, n. 5, p. 1281-1290, 2012.

TARANTINO, G.; SAVASTANO, S.; Capone, D.; Colao, A. Spleen: a new role for an old player? **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 17, n. 33, p. 3776, 2011.

TARGHER, G.; CHONCHOL, M.; BERTOLINI, L.; RODELLA, S.; ZENARI, L.; LIPPI, G.; MUGGEO, M. Increased risk of CKD among type 2 diabetics with nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 19, n. 8, p. 1564-1570, 2008.

TAVARES, F.L.; SEELAENDER, M. C. L. Hepatic denervation impairs the assembly and secretion of VLDL-TAG. *Cell Biochemistry and Function: **Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease***, v.26, n.5, p.557-565, 2008.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology**, v. 52, n. 5, p. 1836-1846, 2010.

TINIAKOS, D. G.; VOS, M. B.; BRUNT, E. M. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 5, pp. 145-171, 2010.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. Stuart. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **British Journal of Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 347-355, 2004.

VAN GREEVENBROEK, M. M.; SCHALKWIJK, C. G.; STEHOUWER, C. D. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. **Neth J Med**, v. 71, n. 4, p. 174-87, 2013.

VELLOSO, L. A.; SCHWARTZ, M. W. Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. **International journal of obesity**, v. 35, n. 12, p. 1455, 2011.

VERNON, G.; BARANOVA, A.; YOUNOSSI, Z. M. Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 34, n. 3, p. 274-285, 2011.

WEHRWEIN, E, A.; ORER, H, S.; BARMAN, S, M. Overview of the anatomy, physiology, and pharmacology of the autonomic nervous system. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 3, p. 1239-1278, 2011.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C. J.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1821-1830, 2003.

WANG, H.; YU, M.; OCHANI, M.; AMELLA, C. A.; TANOVIC, M.; SUSARLA, S.; AL-ABED, Y. Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 384, 2003.

WORLD GASTROENTEROLOGY (WGO). Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis Disponível em:  
<<http://www.worldgastroenterology.org/NAFLDNASH>> 2012.

WHO. World Health Organization. Disponível em:  
<<http://www.wgi,ubt/mediacentre/factsheets/fs311/en/>> 2014.

WHO. World Health Organization. Disponível em:  
<<http://www.wgi,ubt/mediacentre/factsheets/fs311/en/>> 2016.

YU, Z. J.; WELLER, R, A.; SANDIDGE, K.; WELLER, E, B. Vagus nerve stimulation: can it be used in adolescents or children with treatment-resistant depression? **Current Psychiatry Reports** v. 10, n. 2, p. 116-122, 2008.

YUDKIN, J. S. Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. **International Journal of Obesity**, v. 27, n. S3, p. S25, 2003.

**ARTIGO CIENTÍFICO**

**INFLUÊNCIA DO NERVO VAGO E DO BAÇO SOBRE A DOENÇA HEPÁTICA  
GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA EM RATOS OBEESO-MSG**

**EINSTEIN**

**NORMAS DA REVISTA: ANEXO 2**

**ARTIGO CIENTÍFICO****INFLUÊNCIA DO NERVO VAGO E DO BAÇO SOBRE A DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA EM RATOS OBEOSO-MSG****INFLUENCE OF VAGUS NERVE AND SPLEEN ON NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE IN OBESE-MSG RATS**

Ana Claudia Amaral<sup>1</sup>, Bruna Schumaker Siqueira<sup>1</sup>, Sabrina Grassioli<sup>1</sup>, Maria Lúcia Bonfleur<sup>1</sup>, João Paulo de Arruda Amorim<sup>1</sup>, Sandra Lucinei Balbo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, Brasil.

**Resumo**

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da vagotomia subdiafragmática associada ou não a esplenectomia sobre a morfologia hepática em ratos obesos induzidos pelo glutamato monossódico (MSG). Ratos machos recém-nascidos receberam durante os cinco primeiros dias de vida injeções de 4 g de MSG/Kg de peso corporal (grupo MSG) ou 1,25 g de solução salina/Kg de peso corporal - grupo controle (CTL). Aos 60 dias de vida os animais obesos MSG foram submetidos a vagotomia subdiafragmática (MSG VAG), ou a esplenectomia (MSG ESP), ou a vagotomia associada a esplenectomia (MSG VAG ESP), ou, a falsa operação (MSG FO). Com 150 dias os animais foram eutanasiados. Os estoques de gorduras perigonadal e retroperitoneal foram maiores nos animais MSG FO em relação ao CTL. O peso da gordura retroperitoneal foi menor nos MSG VAG, MSG ESP e MSG VAG ESP em relação aos grupos MSG FO. O grau de esteatose hepática foi menor nos animais MSG VAG quando comparado ao MSG FO. Assim a vagotomia exerceu um efeito protetor sobre a instalação da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) nos animais obesos MSG. Entretanto a esplenectomia exacerbou este parâmetro nos animais do grupo MSG ESP em relação ao grupo MSG FO. Interessantemente o grau de esteatose foi similar entre os animais MSG VAG ESP e o grupo MSG FO. Desta forma, conclui-se que o nervo vago e o baço tem participação importante, porém independentes, na instalação da DHGNA no modelo de obesidade induzida pelo MSG.

**Descritores:** Fígado, obesidade hipotalâmica, baço, nervo vago, DHGNA.

### **Abstract**

The objective of this study was to evaluate the effect of subdiaphragmatic vagotomy associated or not to splenectomy on the liver morphology in obese rats induced by glutamate monosodium (MSG). Newborn male rats received during the first five days of life injections of either 4 g MSG/body weight kg (MSG group) or 1.25 g saline/body weight kg - control group (CTL). At 60 days of age the MSG obese animals were subjected to subdiaphragmatic vagotomy (MSG VAG), or splenectomy (MSG ESP) or vagotomy associated with splenectomy (MSG VAG ESP), or false operation (MSG FO). At 150 days the animals were euthanized. The perigonadal and retroperitoneal fat stocks were higher in MSG FO animals compared to CTL. Retroperitoneal fat weight was lower in MSG VAG, MSG ESP and MSG VAG ESP compared to MSG FO groups. The degree of hepatic steatosis was lower in MSG VAG animals when compared to MSG FO. Thus, the vagotomy had a protective effect on the installation of the nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in obese animals MSG. However, splenectomy exacerbated this parameter in animals from the MSG ESP group compared to the MSG FO group. Interestingly the degree of steatosis was similar between the MSG VAG ESP animals and the MSG FO group. Thus, it is concluded that the vagus nerve and the spleen play an important but independent role in the installation of NAFLD in the MSG-induced obesity model.

## Introdução

Disfunções na atividade do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) estão fortemente associadas à obesidade e a síndrome metabólica (SM). Animais obesos apresentam redução da atividade simpática e aumento da atividade parassimpática que pode acarretar em aumento do armazenamento de gordura, afetando desta forma a homeostase energética corporal <sup>(1,2,3)</sup>. Estudos mostram que a vagotomia subdiafragmática reverte a obesidade induzida por lesões hipotalâmicas em ratos e melhora o metabolismo lipídico, diminuindo significativamente as concentrações plasmáticas de triglicerídeos (TG) <sup>(3,4)</sup>.

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é caracterizada pelo acúmulo de lipídios no interior dos hepatócitos <sup>(5)</sup>. Esta condição ativa respostas inflamatórias que culminam com o aumento na concentração de citocinas pró-inflamatórias <sup>(6,7)</sup>. O baço desempenha um papel importante no metabolismo lipídico. No entanto, a sua relação no desenvolvimento da esteatose permanece incerto. Inoue e colaboradores mostraram que ratos alimentados com dieta rica em gordura e submetidos à esplenectomia apresentam aumento no acúmulo de lipídios hepáticos e agravo na dislipidemia e na esteatose hepática <sup>(8)</sup>. O baço é necessário na regulação da resposta inflamatória, e com a influência do nervo vago, pode regular a resposta imune e as concentrações de citocinas <sup>(9,10)</sup>. No entanto, ainda não foi identificada uma inervação direta no baço pelo nervo vago <sup>(11)</sup>.

Roedores submetidos à administração de altas concentrações de glutamato monossódico (MSG) durante o período neonatal apresentam lesões hipotalâmicas que causam várias alterações neuroendócrinas. Os animais apresentam desbalanço do SNA, com aumento da atividade parassimpática e redução da atividade simpática, e são caracterizados por desenvolverem obesidade, hiperinsulinemia, resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemia e elevadas concentrações de ácidos graxos livres (AGL) e triglicerídeos (TG) no fígado <sup>(12)</sup>. A relação entre SNA e o sistema imune esplênico, e, sua influência sobre a instalação da obesidade e suas comorbidades é desconhecida. Desta forma o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da vagotomia associada ou não a esplenectomia sobre a morfologia hepática em ratos obesos – MSG.

## Metodologia

## **Animais e indução da obesidade**

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unioeste. Ratos Wistar machos recém-nascidos, receberam injeção subcutânea de MSG (4 g/Kg de peso corporal, grupo MSG) ou solução salina (12,5 %) equimolar (1,25 g/Kg de peso corporal, grupo CTL), do segundo ao sexto dia pós-natal. Aos 21 dias de idade os animais foram desmamados e tiveram acesso água e ração padrão para roedores. Os ratos foram alojados em caixas (3 ratos/caixa) e mantidos no biotério setorial do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo (LAFEM) da Unioeste, sob condições de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) controladas.

## **Vagotomia e esplenectomia**

Aos 60 dias de vida os animais do grupo MSG foram submetidos à vagotomia (VAG) e/ou a esplenectomia (ESP), distribuídos em quatro grupos: MSG falso operado (MSG FO), MSG vagotomizado (MSG VAG), MSG esplenectomizado (MSG ESP) e MSG esplenectomizado e vagotomizado (MSG VAG ESP), com 11 animais por grupo.

Para isso, os animais ficaram em jejum (12 horas) e posteriormente foram anestesiados com isoflurano (1%), sob oxigênio a 1mL/min em máscara e ventilação espontânea. Após anestesia, os animais do grupo MSG VAG foram submetidos à vagotomia. Com auxílio de uma lupa, os ramos anterior e posterior subdiafragmáticos do nervo vago foram identificados e posteriormente afastados da parede do esôfago e seccionados. Para a realização da esplenectomia, os animais foram anestesiados semelhantes ao procedimento feito para a VAG. O baço foi localizado e exteriorizado da cavidade abdominal e, com auxílio de uma pinça os vasos sanguíneos foram amarrados com fio de algodão (0,10) e seccionados para a retirada do órgão. Para os animais do grupo VAG e ESP, ambos os procedimentos foram realizados durante a cirurgia, sendo a VAG realizada antes da ESP, mantendo o procedimento individual descrito anteriormente para cada cirurgia. Nos animais selecionados para a falsa-operação (MSG FO), foi realizado a laparotomia exploratória, sendo o nervo vago apenas manuseado e afastado do esôfago, porém não seccionado e o baço

exteriorizado, porém não retirado. As incisões cirúrgicas musculares foram suturadas com fio de sutura absorvível, enquanto a incisão cutânea foi feita com sutura simples e fio de algodão não absorvível.

### **Eutanásia e coleta do material biológico**

Antes da eutanásia, os animais foram pesados e o comprimento naso-anal (CNA) foi medido para obtenção do índice de Lee (IL), que foi calculado por meio da raiz cúbica do peso corporal (g) dividido pelo CNA (cm). Aos 150 dias de vida, os animais foram eutanasiados e posteriormente foi coletado o sangue em tubos heparinizados e centrifugado para obtenção do plasma e posterior dosagem de colesterol (COL) e triglicerídeos (TG). O fígado, a gordura retroperitoneal e perigonadal foram coletadas, pesados e normalizadas para g/100g de peso corporal. No momento da eutanásia o estômago foi retirado, limpo e pesado, para confirmar efetividade da vagotomia subdiafragmática <sup>(13)</sup>.

### **Processamento histológico do fígado**

Foi retirado um fragmento do lobo esquerdo no sentido transversal do órgão, da periferia para o centro, de modo a obter melhor análise do tecido como um todo. Imediatamente após a coleta, o fragmento do fígado retirado foi fixado em formol de Carson por 24 horas. Após a fixação, o tecido foi armazenado em álcool 70% para posterior processamento histológico. As amostras do fígado armazenadas passaram pelo processo de desidratação em bateria ascendente de álcool, diafanizadas em xilol e em seguida, embebidas em paraplast histológico (SIGMA-ALDRICH, Brasil). Por meio de um micrótomo (Olympus) foram realizados cortes seriados 4 µm de espessura no tecido de para montagem das lâminas. A coloração foi realizada pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE), sendo analisado um corte por animal em microscopia de luz. Para a quantificação de EH, a avaliação foi feita com base em um escore adaptado para DHGNA, em que a esteatose é classificada por meio da porcentagem de hepatócitos que contém gotículas lipídicas, onde < 5 % (grau 0); 5 a 33 % (grau 1); > 33 a 66 % (grau 2) e > 66 % (grau 3) <sup>(14)</sup>. Imagens representativas dos grupos experimentais foram utilizadas para a confecção da prancha histológica.

## Análises plasmáticas

Amostras de sangue foram coletadas da cauda dos animais para serem utilizadas para mensurar a glicose em jejum, utilizando um glicosímetro Acucheck Performa II. A partir do sangue total coletado e centrifugado após a eutanásia, o soro obtido foi utilizado para dosagens de TG e COL plasmáticos, sendo que, o método utilizado foi o colorimétrico, conforme instruções do fabricante (Bioliqid).

## Análise estatística

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão, a significância estatística entre as médias foi avaliada utilizando o teste da análise de variância (ANOVA) fator duplo, seguido pelo pós-teste de Tukey. O teste t de Student também foi usado. O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

## Resultados

### Efeitos da aplicação neonatal de MSG sobre os parâmetros biométricos e bioquímicos

Para caracterização do modelo MSG, foram analisadas as variáveis da tabela 1. O peso corporal, o CNA e o peso do fígado foram 29%, 17% e 17%, respectivamente menores no grupo MSG FO em relação ao grupo CTL. No entanto, animais MSG FO apresentaram aumento de 6% no IL, 79% no depósito de tecido adiposo retroperitoneal e 101% na gordura perigonadal em comparação ao grupo CTL. A concentração de TG plasmática foi 69% maior nos animais MSG em relação aos animais dos grupos CTL. Os valores de COL plasmáticos foram semelhantes entre os grupos MSG e CTL (Tabela 1).

**Tabela 1** – Efeitos da administração neonatal de MSG sobre os parâmetros biométricos e bioquímicos.

	CTL	MSG FO	p-valor
<hr/>			

<b>Peso corporal (g)</b>	423,45 ± 11	301,64 ± 10	<b>&lt; 0,01</b>
<b>Comprimento naso-anal (cm)</b>	23,14 ± 0,12	19,59 ± 0,21	<b>&lt; 0,01</b>
<b>Índice de Lee</b>	324,24 ± 2,32	341,91 ± 2,21	<b>&lt; 0,01</b>
<b>Gordura retroperitoneal (g/100g)</b>	0,95 ± 0,19	1,71 ± 0,24	<b>&lt; 0,05</b>
<b>Gordura perigonadal (g/100g)</b>	1,24 ± 0,15	2,49 ± 0,10	<b>&lt; 0,01</b>
<b>Fígado (g/100g)</b>	2,68 ± 0,48	2,22 ± 0,13	<b>&lt; 0,01</b>
<b>Colesterol (mg/ dL fígado)</b>	173 ± 22,00	201 ± 15,70	0,32
<b>Triglicerídeos (mg/ dL fígado)</b>	128 ± 10,95	217 ± 35,63	<b>&lt;0,05</b>

Representação dos parâmetros corporais de ratos *Wistar*. Dados expressos como média ± erro padrão da média, n= 8-11. CTL: Controle; MSG FO: MSG Falso Operado. Teste T de Student ( $p < 0,05$ ).

### **Efeitos da vagotomia ou esplenectomia, associadas ou não, sobre os parâmetros biométricos e plasmáticos em animais obesos-MSG**

O peso corporal e comprimento naso-anal foram semelhantes entre os grupos MSG FO, MSG VAG, MSG ESP e MSG VAG ESP, sem influência do fator VAG ( $F = 1,42$ ,  $p = 0,24$ ;  $F = 0,98$ ,  $p = 0,33$  respectivamente), do fator ESP ( $F = 0,92$ ,  $p = 0,34$ ;  $F = 0,02$ ,  $p = 0,90$  respectivamente) e sem interação entre fatores VAG e ESP ( $F = 0,84$ ;  $p = 0,37$ ;  $F = 1,17$ ,  $p = 0,29$  respectivamente). Apesar da vagotomia no grupo MSG-VAG ter influenciado o Índice de Lee ( $F = 5,98$ ;  $p < 0,05$ ), não foi observado diferença estatística no pós-teste. Não houve influência da esplenectomia no grupo VAG ESP ( $F = 0,42$ ;  $p = 0,52$ ) e nem interação significativa entre os dois fatores VAG e ESP ( $F = 0,51$ ;  $p = 0,82$ ) no grupo MSG VAG ESP (Tabela 2).

Em relação ao peso da gordura retroperitoneal houve redução de 60%, 47% e 58% nos grupos MSG VAG, MSG ESP e MSG VAG ESP respectivamente, quando comparados ao grupo MSG FO. Assim, houve interação significativa entre os fatores VAG e ESP ( $F = 7,66$ ;  $p < 0,01$ ), sendo observado o efeito isolado da VAG ( $F = 15,84$ ;  $p < 0,01$ ) e também da ESP ( $F = 6,16$ ;  $p < 0,01$ ). No depósito de gordura perigonadal

foi observado somente o efeito isolado da vagotomia ( $F= 7,90$ ;  $p < 0,01$ ), apresentando redução de 42% no grupo MSG VAG em comparação ao grupo MSG FO, o fator ESP não alterou este parâmetro ( $F= 0,17$ ;  $p= 0,69$ ) e não houve interação entre os dois fatores VAG ESP ( $F= 0,61$ ;  $p= 0,44$ ), conforme dados apresentados na tabela 2.

O peso do estômago foi 71% e 118% maior nos grupos MSG VAG e MSG VAG ESP, respectivamente, em relação ao grupo MSG FO. Houve interação significativa entre os fatores entre VAG e ESP ( $F= 6,66$ ;  $p < 0,05$ ), também foi observado o efeito isolado da VAG ( $F= 89,19$ ;  $p < 0,01$ ), entretanto o fator ESP não alterou este parâmetro ( $F= 3,42$ ;  $p= 0,07$ ). O peso do fígado foi semelhante entre os grupos, não foi observada influência da VAG ( $F= 2,50$ ;  $p= 0,12$ ), da ESP ( $F= 3,76$ ;  $p= 0,06$ ) ou interação significativa entre os dois fatores ( $F= 0,26$ ;  $p= 0,62$ ). (Tabela 2).

**Tabela 2** - Representação dos parâmetros corporais de ratos obesos – MSG

	Grupos				p-valor		
	MSG FO	MSG VAG	MSG ESP	MSG VAG ESP	VAG	ESP	Interação
<b>Peso Corporal (g)</b>	301,64 ± 10	298,18 ± 12	301,00 ± 10	275,64 ± 9	0,24	0,34	0,37
<b>CNA (cm)</b>	19,59 ± 0,20	20,09 ± 0,33	19,73 ± 0,30	19,73 ± 0,33	0,33	0,90	0,29
<b>Índice de Lee</b>	341,91 ± 2,21	332,47 ± 4,70	339,87 ± 5,07	329,95 ± 3,03	<b>&lt;0,05</b>	0,52	0,82
<b>Gordura Retroperitoneal (g/100g)</b>	1,71 ± 0,24 <sup>b,c,d</sup>	0,69 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,4 <sup>a</sup>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>
<b>Gordura Perigonadal (g/100g)</b>	2,48 ± 0,10 <sup>b</sup>	1,45 ± 0,25 <sup>a</sup>	2,14 ± 0,22	1,55 ± 0,15	<b>&lt;0,01</b>	0,69	0,44
<b>Fígado (g/100g)</b>	2,22 ± 0,07	2,30 ± 0,09	2,05 ± 0,06	2,19 ± 0,06	0,12	0,06	0,62

	0,49 ±	0,84 ±	0,46 ±	1,07 ±	<0,01	0,07	<0,05
<b>Estomago (g/100g)</b>	0,02 <sup>b,d</sup>	0,01 <sup>a</sup> , c,d	0,06 <sup>b,d</sup>	0,09 <sup>a, b, c</sup>			

Dados expressos como média ± erro padrão da média. n= 8-11 por grupo. MSG FO: MSG falso operado; MSG ESP: MSG esplenectomizado; MSG VAG: MSG vagotomizado; MSG VAG ESP: MSG vagotomizado e esplenectomizado. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos. ANOVA Two-way, pós teste Tukey (p<0.05). <sup>a</sup> MSG FO, <sup>b</sup> MSG VAG, <sup>c</sup> MSG ESP, <sup>d</sup> MSG VAG ESP.

### Parâmetros bioquímicos plasmáticos

Observa-se na tabela 3 que apesar da vagotomia no grupo MSG VAG ter influenciado a concentração plasmática de triglicerídeos (F= 18,83; p<0,01), não foi observado diferença estatística no pós-teste. Não houve efeito do fator ESP (F= 0,04; p= 0,85), bem como da interação entre os fatores VAG e ESP (F= 0,46; p= 0,50), indicando somente o efeito da vagotomia sobre a trigliceridemia. A concentração de colesterol plasmático (tabela 3) foi semelhante entre os grupos MSG FO, MSG VAG, MSG ESP e MSG VAG ESP. Não houve efeito da VAG (F= 0,001; p= 0,97) ou da ESP (F= 0,001; p= 0,97) isoladas, bem como da interação entre os fatores VAG e ESP (F= 0,07; p= 0,79).

A glicemia de jejum (tabela 3) foi influenciada pela VAG (F= 6,52; p < 0,05), no entanto não foi observada diferença estatística no pós-teste. Não foi constatada influência da ESP (F= 0,56; p= 0,46) ou interação significativa entre os fatores VAG e ESP (F= 0,36; p= 0,55).

**Tabela 3** - Parâmetros plasmáticos de ratos obesos – MSG

	Grupos				p-valor		
	MSG FO	MSG VAG	MSG ESP	MSG VAG ESP	VAG	ESP	interação
<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	217,2± 18,61 <sup>d</sup>	145,99 ± 12,72 <sup>c</sup>	238,12± 13,72 <sup>b,d</sup>	134,41 ± 11,94 <sup>a,c</sup>	<0,01	0,85	0,50
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	200,7± 14,20	207,97 ± 20,95	206,36± 20,79	200,71 ± 28,85	0,97	0,97	0,79

<b>Glicemia em</b>	69 ±	76 ±	64 ±	75 ±	<b>&lt;0,05</b>	0,46	0,55
<b>jejum</b>	3,99	2,63	2,89	4,47			

Dados expressos como média ± erro padrão da média. n= 8-11 por grupo. MSG FO: MSG falso operado; MSG ESP: MSG esplenectomizado; MSG VAG: MSG vagotomizado; MSG VAG ESP: MSG vagotomizado e esplenectomizado. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos. ANOVA Two-way, pós-teste Tukey (p<0.05). <sup>a</sup>MSG FO, <sup>b</sup>MSG VAG, <sup>c</sup>MSG ESP, <sup>d</sup>MSG VAG ESP.

### Morfologia hepática

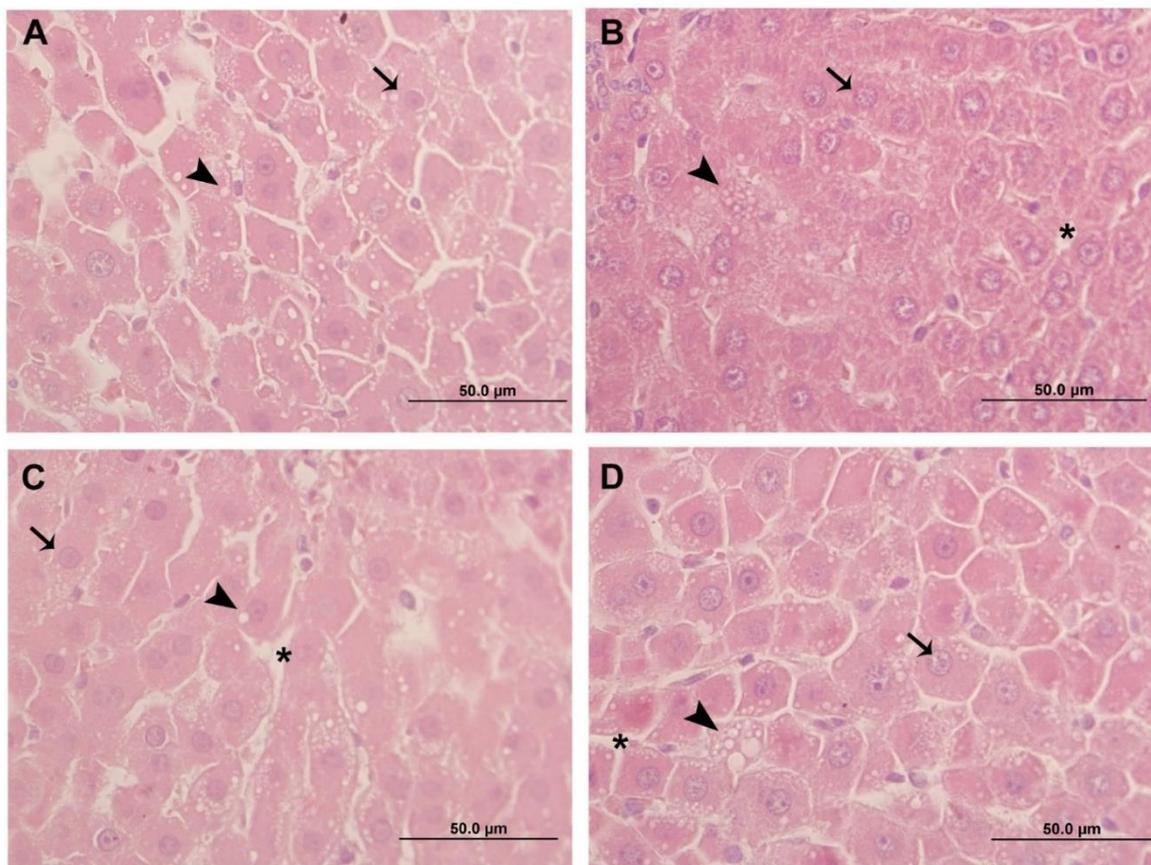
Na tabela 4 e na figura 1 é possível observar que o citoplasma dos hepatócitos dos animais dos grupos MSG FO, MSG VAG, MSG ESP e MSG VAG ESP apresentaram inúmeros vacúolos lipídicos, predominantemente microvesicular, característico de esteatose hepática microvesicular. Assim, 50% dos animais do grupo MSG FO e MSG VAG ESP não apresentaram esteatose, 12,5% apresentaram esteatose grau 1 e 37,5% grau 2. Nos animais do grupo MSG ESP observou-se que 75% não apresentaram esteatose hepática e 25% apresentaram grau 2. Destaca-se que 75% dos animais dos grupos MSG VAG não apresentaram esteatose e somente 25% apresentaram grau 1, indicando que a vagotomia, exerce efeito protetor sobre a instalação da esteatose nos animais obesos MSG.

**Tabela 4** - Representação do grau de esteatose no fígado de animais MSG.

<b>Grupos</b>	<b>Grau 0</b>	<b>Grau 1</b>	<b>Grau 2</b>	<b>Grau 3</b>
<b>MSG FO</b>	50%	12,5%	37,5%	0%
<b>MSG VAG</b>	75%	25%	0%	0%
<b>MSG ESP</b>	75%	0%	25%	0%
<b>MSG VAG ESP</b>	50%	12,5%	37,5%	0%

MSG FO: MSG Falso Operado; MSG VAG: MSG Vagotomia; MSG ESP: MSG Esplenectomia e MSG VAG ESP: MSG Vagotomia Esplenectomia. n= 8.

**Figura 1** - Fotomicrografias do fígado de ratos obesos-MSG



**Figura 1** - Fotomicrografias do fígado de ratos obesos-MSG, submetidos a vagotomia e/ou esplenectomia. **A:** MSG FO; **B:** MSG VAG; **C:** MSG ESP e **D:** MSG VAG ESP. Núcleo (seta); Sinusoide (asterisco) e gotícula lipídica (cabeça de seta). Coloração Hematoxilina e Eosina (HE). n=8 animais/grupo.

## Discussão

Roedores com obesidade hipotalâmica, decorrente da administração neonatal de MSG, são muito utilizados para estudar diferentes comorbidades associadas a essa doença<sup>(13,15,16,17,18)</sup>. Corroborando com os dados da literatura, o presente estudo demonstrou que os animais MSG apresentaram redução no peso corporal e no peso do fígado, aumento no Índice de Lee, maior acúmulo de gordura nos depósitos de tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal e hipertrigliceridemia<sup>(13,19,20,21,22)</sup>. A redução do peso corporal, do comprimento naso-anal e do peso de órgãos nos animais obesos-MSG é decorrente da lesão no núcleo arqueado, induzida pelo MSG em alta concentração no período neonatal. Esse núcleo é responsável pela produção do hormônio liberador do hormônio de crescimento. Animais obesos-MSG apresentam baixa concentração de hormônio de crescimento plasmático<sup>(23)</sup>.

Como demonstrado nesse estudo e de acordo com relatos de outros autores, tanto a vagotomia como a esplenectomia em ratos obesos-MSG não alteraram o peso corporal, comprimento naso-anal e o Índice de Lee. Embora não tenha alterado o peso corporal, animais submetidos à vagotomia apresentaram grande distensão do estômago, confirmando a eficácia da cirurgia <sup>(13,24,25)</sup>.

A vagotomia foi eficaz na redução do acúmulo de gordura no tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal. Embora a fisiopatologia da obesidade seja complexa e não foi totalmente esclarecida, evidências sugerem que disfunções no SNA, com aumento na atividade parassimpática e redução na atividade simpática, estão relacionadas à hiperinsulinemia e ao início da obesidade <sup>(26,27,28)</sup>.

O fígado também está envolvido na obesidade e distúrbios metabólicos. Vários estudos relatam que o acúmulo de gordura no fígado é característico da distribuição de gordura, devido a relação entre os níveis elevados de ácido graxo livre (AGL) e o metabolismo lipídico <sup>(30,31)</sup>. Foi demonstrado que a vagotomia reduz os depósitos de gordura visceral e o acúmulo de gordura no fígado <sup>(1)</sup>. Martin e colaboradores mostraram que a vagotomia hepática reduz a atividade lipogênica, diminuindo os estoques de gordura devido a alterações na sensibilidade hepática à insulina <sup>(32)</sup>. A redução dos depósitos de gordura e melhora na dislipidemia em animais MSG VAG indica que a comunicação adequada do nervo vago com o fígado é importante para manutenção da atividade lipogênica.

O nervo vago é bem conhecido por desempenhar um papel essencial na manutenção da homeostase metabólica e na regulação das respostas imunes inatas <sup>(9,33,34)</sup>. A ruptura na homeostase metabólica e imune está associada à hiperglicemia, resistência à insulina, dislipidemia <sup>(9)</sup>. Atualmente, é bem aceito que existe uma estreita relação entre o sistema imunológico e o desenvolvimento da obesidade. No presente estudo a esplenectomia reduziu os depósitos de gordura retroperitoneal e aumentou a concentração plasmática de TG. Estudos demonstram que a esplenectomia prejudica o metabolismo lipídico tanto em animais obesos-MSG quanto nos obesos por dieta rica em gordura <sup>(98,25)</sup>. Em um estudo semelhante, Gotoh e colaboradores mostraram que a esplenectomia reduziu os depósitos de gordura e aumentou a concentração plasmática de TG em animais alimentados com dieta padrão. No mesmo estudo, porém com animais alimentados com dieta rica em gordura, houve aumento no conteúdo de TG hepático após a esplenectomia <sup>(35)</sup>. A

dislipidemia induzida pela esplenectomia pode ser causada pela falta de macrófagos esplênicos <sup>(36)</sup>. A produção de IL-10 pelos macrófagos é fundamental na manutenção do metabolismo lipídico <sup>(8, 25)</sup>. Sugere-se que animais obesos MSG ESP tenham redução de IL-10 com conseqüente aumento na lipólise e na concentração plasmática TG. Animais obesos-MSG, sem qualquer intervenção, já apresentam redução na concentração de IL-10 <sup>(37)</sup>.

No presente estudo os animais MSG apresentaram alterações histológicas nos hepatócitos, compatíveis com a DHGNA. Observou-se que animais do grupo MSG FO, MSG ESP e MSG VAG ESP apresentaram aumento de gotículas lipídicas no interior dos hepatócitos com agravamento na esteatose hepática microvesicular. Destaca-se que os animais MSG VAG também apresentaram esteatose, porém em menor grau que os demais grupos. Stearns e colaboradores também demonstraram que a vagotomia reduz a esteatose hepática <sup>(1)</sup>. Curiosamente animais dos grupos MSG VAG ESP apresentaram grau mais elevado de esteatose hepática quando comparados aos grupos MSG VAG e MSG ESP. Desta forma sugere-se que o nervo vago e o baço têm participação importante, porém independentes, na instalação da DHGNA no modelo de obesidade induzida pelo MSG.

## Referências

1. Stearns AT, Balakrishnan A, Radmanesh A, Ashley SW, Rhoads DB, Tavakkolizadeh A. Relative contributions of afferent vagal fibers to resistance to diet-induced obesity. *Dig Dis Sci.* 2012;57(5):1281-1290.
2. Licht CMM, Vreeburg AS, Van Reedt Dortland AK, Giltay EJ, Hoogendijk, WJ, Derijk RH, Penninx BW. Increased sympathetic and decreased parasympathetic activity rather than changes in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity is associated with metabolic abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(5):2458-2466.
3. Inoue S, Bray GA. The effects of subdiaphragmatic vagotomy in rats with ventromedial hypothalamic obesity. *Endocrinology.* 1977;100(1):108-114.
4. Gao X, Van Der Veen J N, Zhu L, Chaba T, Ordoñez M, Lingrell S, Jacobs RL. Vagus nerve contributes to the development of steatohepatitis and obesity in phosphatidylethanolamine N-methyltransferase deficient mice. *J Hepatol.* 2015; 62(4):913-920.
5. Brunt EM, Wong VWS, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15080.
6. Wree A, Eguchi A, McGeough MD, Pena CA, Johnson CD, Canbay A, Feldstein AE. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology.* 2014;59(3):898-910.
7. Baffy G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *J Hepatol.* 2009;51(1):212-223.
8. Inoue M, Gotoh K, Seike M, Masaki T, Oribe J, Honda K, Yoshimatsu H. Involvement of remnant spleen volume on the progression of steatohepatitis in diet-induced obese rats after a splenectomy. *Hepatol Res.* 2012;42(2):203-212.
9. Pavlov VA, Tracey KJ. The vagus nerve and the inflammatory reflex—linking immunity and metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8(12):743.
10. Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M, Liao H, Ochani K, Pavlov VA, Tracey KJ. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J Exp Med.* 2006;203(7):1623-1628.
11. Rosas-Ballina M, Ochani M, Parrish WR, Ochani K, Harris YT, Huston JM, Tracey KJ. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(31):11008-11013.
12. Soares GM, Cantelli KR, Balbo SL, Ribeiro RA, Alegre-Maller ACP, Barbosa-Sampaio HC, Bonfleur ML. Liver steatosis in hypothalamic obese rats improves after duodeno-jejunal bypass by reduction in de novo lipogenesis pathway. *Life Sci.* 2017;188:68-75.

13. Balbo SL, Grassioli S, Ribeiro RA, Bonfleur ML, Gravena C, Do Brito NM, Torrezan R. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. *Endocrine*. 2007;31(2):142-148.
14. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313–21.
15. Leão VF, Ferreira LL, Melo CM, Bonfleur ML, Da Silva LL, Carneiro EM, Ribeiro RA. Taurine supplementation prevents endothelial dysfunction and attenuates structural changes in aortas from hypothalamic obese rats. *Eur. J. Nutr.* 2019;58(2): 551-563.
16. Benevides ROA, Vale CC, Fontelles JLL, França LM, Teófilo TS, Silva SN, Gaspar RS. *Syzygium cumini* (L.) Skeels improves metabolic and ovarian parameters in female obese rats with malfunctioning hypothalamus-pituitary-gonadal axis. *J. Ovarian Res.* 2019;12(1):13.
17. Macho L, Fickova M, Zorad, S. Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. *Physiol Res.* 2000;49(1):79-85.
18. Olney JW, Sharpe L. G. Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Sci.* 1969;166(3903):386-388.
19. Bonfleur ML, Borck PC, Ribeiro RA, Caetano LC, Soares GM, Carneiro EM, Balbo SL. Improvement in the expression of hepatic genes involved in fatty acid metabolism in obese rats supplemented with taurine. *Life Sci.* 2015;135:15-21.
20. Nardelli TR, Ribeiro RA, Balbo SL, Vanzela EC, Carneiro EM, Boschero AC, Bonfleur ML. Taurine prevents fat deposition and ameliorates plasma lipid profile in monosodium glutamate-obese rats. *Amino acids.* 2011;41(4): 901-908.
21. Cunha NV, De Abreu SB, Panis C, Grassioli S, Guarnier FA, Cecchini R, Martins-Pinge M. COX-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats. *Life Sci.* 2010;87(11-12): 375-381.
22. Hirata AE, Andrade ISD, Vaskevicius P, Dolnikoff MS. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. *Braz J Med Biol Res.* 1997;30:671-67.
23. Maiter D, Underwood LE, Martin JB, Koenig JI. Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. *Endocrinol.* 1991;128:1100-1106.
24. Barella LF, Miranda RA, Franco CC, Alves VS, Malta A, Ribeiro TA, De Oliveira JC. Vagus nerve contributes to metabolic syndrome in high-fat diet-fed young and adult rats. *Exp Physiol.* 2015;100(1):57-68.

25. De Carvalho Leite N, Montes EG, Fisher SV, Cancian CRC, De Oliveira JC, Martins-Pinge MC, Grassioli S. Splenectomy attenuates obesity and decreases insulin hypersecretion in hypothalamic obese rats. *Metabolism*. 2015;64(9):1122-1133.
26. Balbo SL, Ribeiro RA, Mendes MC, Lubaczeuski C, Maller ACPA, Carneiro EM, Bonfleur ML. Vagotomy diminishes obesity in cafeteria rats by decreasing cholinergic potentiation of insulin release. *J Physiol Biochem*. 2016;72(4):625-633.
27. Lubaczeuski C, Balbo SL, Ribeiro RA, Vettorazzi, JF, Santos-Silva JC, Carneiro EM, Bonfleur ML. Vagotomy ameliorates islet morphofunction and body metabolic homeostasis in MSG-obese rats. *Braz J Med Biol Res*. 2015;48(5):447-457.
28. Andreazzi AE, Grassioli S, Marangon PB, Martins AG, De Oliveira JC, Torrezan R, De Freitas Mathias PC. Impaired sympathoadrenal axis function contributes to enhanced insulin secretion in prediabetic obese rats. *Exp Diabetes res*. 2011;2011.
29. Scomparin DX, Gomes RM, Grassioli S, Rinaldi W, Martins AG, De Oliveira JC, Mathias PC. Autonomic activity and glycemic homeostasis are maintained by precocious and low intensity training exercises in MSG-programmed obese mice. *Endocrine*. 2009;36(3):510-517.
30. Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung SN, Kral JG. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(5):1513-1517.
31. Lewis GF. Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Cur Opin Lipidol*. 1997;8(3):146-153.
32. Martin DD, Cincotta AH, Meier AH. Hepatic vagotomy abolishes the circadian rhythm of lipogenic responsiveness to insulin and reduces fat stores in hamsters. *Neuroendocrinology*. 1990;52(1):9-14.
33. Yi CX, La Fleur SE, Fliers E, Kalsbeek A. The role of the autonomic nervous liver innervation in the control of energy metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802(4):416–31.
34. Uno K, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Ishihara H. Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Sci*. 2006;312(5780):1656-1659.
35. Gotoh K, Inoue M, Masaki T, Chiba S, Shimasaki T, Ando H, Sakata T. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced inflammation in white adipose tissue and liver. *Diabetes*. 2012;61(8):1994-2003.
36. Schmidt HH, Wagner S, Manns M. The spleen as a storage pool in lipid metabolism. *The Am J Gastroenterol*. 1997;92(6):1072-1072.
37. Caetano LC, Bonfleur ML, Ribeiro RA, Nardelli TR, Lubaczeuski C, Da Silva JDN, Balbo SL. Taurine supplementation regulates I $\kappa$ -B $\alpha$  protein expression in adipose tissue and serum IL-4 and TNF- $\alpha$  concentrations in MSG obesity. *European J Nutrition*. 2017;56(2):705-713.

## **ANEXOS**

### **ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ETICA**

### 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

## Preparing for Submission

### PAGE CONTENTS

1. General Principles
2. Reporting Guidelines
3. Manuscript Sections
  1. Title Page
  2. Abstract
  3. Introduction
  4. Methods
  5. Results
  6. Discussion
  7. References
  8. Tables
  9. Illustrations (Figures)
  10. Units of Measurement
  11. Abbreviations and Symbols

#### *1. General Principles*

The text of articles reporting original research is usually divided into Introduction, Methods, Results, and Discussion sections. This so-called “IMRAD” structure is not an arbitrary publication format but a reflection of the process of scientific discovery. Articles often need subheadings within these sections to further organize their content. Other types of articles, such as meta-analyses, may require different formats, while case reports, narrative reviews, and editorials may have less structured or unstructured formats.

Electronic formats have created opportunities for adding details or sections, layering information, cross-linking, or extracting portions of articles in electronic versions. Supplementary electronic-only material should be submitted and sent for peer review simultaneously with the primary manuscript.

#### *2. Reporting Guidelines*

Reporting guidelines have been developed for different study designs; examples include CONSORT for randomized trials, STROBE for observational studies, PRISMA for systematic reviews and meta-analyses, and STARD for studies of diagnostic accuracy. Journals are encouraged to ask authors to follow these guidelines because they help authors describe the study in enough detail for it to be evaluated by editors, reviewers, readers, and other researchers evaluating the medical literature. Authors of review manuscripts are encouraged to describe the methods used for locating, selecting, extracting, and synthesizing data; this is mandatory for systematic reviews. Good sources for reporting guidelines are the EQUATOR Network and the NLM's Research Reporting Guidelines and Initiatives.

### *3. Manuscript Sections*

The following are general requirements for reporting within sections of all study designs and manuscript formats.

#### **a. Title Page**

General information about an article and its authors is presented on a manuscript title page and usually includes the article title, author information, any disclaimers, sources of support, word count, and sometimes the number of tables and figures.

*Article title.* The title provides a distilled description of the complete article and should include information that, along with the Abstract, will make electronic retrieval of the article sensitive and specific. Reporting guidelines recommend and some journals require that information about the study design be a part of the title (particularly important for randomized trials and systematic reviews and meta-analyses). Some journals require a short title, usually no more than 40 characters (including letters and spaces) on the title page or as a separate entry in an electronic submission system. Electronic submission systems may restrict the number of characters in the title.

*Author information:* Each author's highest academic degrees should be listed, although some journals do not publish these. The name of the department(s) and institution(s) or organizations where the work should be attributed should be specified. Most electronic submission systems require that authors provide full contact

information, including land mail and e-mail addresses, but the title page should list the corresponding authors' telephone and fax numbers and e-mail address. ICMJE encourages the listing of authors' Open Researcher and Contributor Identification (ORCID).

*Disclaimers.* An example of a disclaimer is an author's statement that the views expressed in the submitted article are his or her own and not an official position of the institution or funder.

*Source(s) of support.* These include grants, equipment, drugs, and/or other support that facilitated conduct of the work described in the article or the writing of the article itself.

*Word count.* A word count for the paper's text, excluding its abstract, acknowledgments, tables, figure legends, and references, allows editors and reviewers to assess whether the information contained in the paper warrants the paper's length, and whether the submitted manuscript fits within the journal's formats and word limits. A separate word count for the Abstract is useful for the same reason.

*Number of figures and tables.* Some submission systems require specification of the number of Figures and Tables before uploading the relevant files. These numbers allow editorial staff and reviewers to confirm that all figures and tables were actually included with the manuscript and, because Tables and Figures occupy space, to assess if the information provided by the figures and tables warrants the paper's length and if the manuscript fits within the journal's space limits.

*Conflict of Interest declaration.* Conflict of interest information for each author needs to be part of the manuscript; each journal should develop standards with regard to the form the information should take and where it will be posted. The ICMJE has developed a uniform conflict of interest disclosure form for use by ICMJE member journals and the ICMJE encourages other journals to adopt it. Despite availability of the form, editors may require conflict of interest declarations on the manuscript title page to save the work of collecting forms from each author prior to making an editorial decision or to save reviewers and readers the work of reading each author's form.

**b. Abstract**

Original research, systematic reviews, and meta-analyses require structured abstracts. The abstract should provide the context or background for the study and should state the study's purpose, basic procedures (selection of study participants, settings, measurements, analytical methods), main findings (giving specific effect sizes and their statistical and clinical significance, if possible), and principal conclusions. It should emphasize new and important aspects of the study or observations, note important limitations, and not overinterpret findings. Clinical trial abstracts should include items that the CONSORT group has identified as essential. Funding sources should be listed separately after the Abstract to facilitate proper display and indexing for search retrieval by MEDLINE.

Because abstracts are the only substantive portion of the article indexed in many electronic databases, and the only portion many readers read, authors need to ensure that they accurately reflect the content of the article. Unfortunately, information in abstracts often differs from that in the text. Authors and editors should work in the process of revision and review to ensure that information is consistent in both places. The format required for structured abstracts differs from journal to journal, and some journals use more than one format; authors need to prepare their abstracts in the format specified by the journal they have chosen.

The ICMJE recommends that journals publish the clinical trial registration number at the end of the abstract. The ICMJE also recommends that, when a registration number is available, authors list that number the first time they use a trial acronym to refer to the trial they are reporting or to other trials that they mention in the manuscript. If the data have been deposited in a public repository and/or are being used in a secondary analysis, authors should state at the end of the abstract the unique, persistent data set identifier, repository name and number.

**c. Introduction**

Provide a context or background for the study (that is, the nature of the problem and its significance). State the specific purpose or research objective of, or hypothesis

tested by, the study or observation. Cite only directly pertinent references, and do not include data or conclusions from the work being reported.

#### **d. Methods**

The guiding principle of the Methods section should be clarity about how and why a study was done in a particular way. Methods section should aim to be sufficiently detailed such that others with access to the data would be able to reproduce the results. In general, the section should include only information that was available at the time the plan or protocol for the study was being written; all information obtained during the study belongs in the Results section. If an organization was paid or otherwise contracted to help conduct the research (examples include data collection and management), then this should be detailed in the methods.

The Methods section should include a statement indicating that the research was approved by an independent local, regional or national review body (e.g., ethics committee, institutional review board). If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the Helsinki Declaration, the authors must explain the rationale for their approach and demonstrate that the local, regional or national review body explicitly approved the doubtful aspects of the study. (See section II.E.)

#### ***i. Selection and Description of Participants***

Clearly describe the selection of observational or experimental participants (healthy individuals or patients, including controls), including eligibility and exclusion criteria and a description of the source population. Because the relevance of such variables as age, sex, or ethnicity is not always known at the time of study design, researchers should aim for inclusion of representative populations into all study types and at a minimum provide descriptive data for these and other relevant demographic variables. Ensure correct use of the terms sex (when reporting biological factors) and gender (identity, psychosocial or cultural factors), and, unless inappropriate, report the sex and/or gender of study participants, the sex of animals or cells, and describe the methods used to determine sex and gender. If the study was done involving an exclusive population, for example in only one sex, authors should justify why, except in obvious cases, (e.g., prostate cancer)." Authors should define how they determined

race or ethnicity and justify their relevance. Authors should use neutral, precise, and respectful language to describe study participants and avoid the use of terminology that might stigmatize participants.

### ***ii. Technical Information***

Specify the study's main and secondary objectives—usually identified as primary and secondary outcomes. Identify methods, equipment (give the manufacturer's name and address in parentheses), and procedures in sufficient detail to allow others to reproduce the results. Give references to established methods, including statistical methods (see below); provide references and brief descriptions for methods that have been published but are not well-known; describe new or substantially modified methods, give the reasons for using them, and evaluate their limitations. Identify precisely all drugs and chemicals used, including generic name(s), dose(s), and route(s) of administration. Identify appropriate scientific names and gene names.

### ***iii. Statistics***

Describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to judge its appropriateness for the study and to verify the reported results. When possible, quantify findings and present them with appropriate indicators of measurement error or uncertainty (such as confidence intervals). Avoid relying solely on statistical hypothesis testing, such as P values, which fail to convey important information about effect size and precision of estimates. References for the design of the study and statistical methods should be to standard works when possible (with pages stated). Define statistical terms, abbreviations, and most symbols. Specify the statistical software package(s) and versions used. Distinguish prespecified from exploratory analyses, including subgroup analyses.

## **e. Results**

Present your results in logical sequence in the text, tables, and figures, giving the main or most important findings first. Do not repeat all the data in the tables or figures in the text; emphasize or summarize only the most important observations. Provide data on all primary and secondary outcomes identified in the Methods Section. Extra or

supplementary materials and technical details can be placed in an appendix where they will be accessible but will not interrupt the flow of the text, or they can be published solely in the electronic version of the journal.

Give numeric results not only as derivatives (for example, percentages) but also as the absolute numbers from which the derivatives were calculated, and specify the statistical significance attached to them, if any. Restrict tables and figures to those needed to explain the argument of the paper and to assess supporting data. Use graphs as an alternative to tables with many entries; do not duplicate data in graphs and tables. Avoid nontechnical uses of technical terms in statistics, such as “random” (which implies a randomizing device), “normal,” “significant,” “correlations,” and “sample.”

Separate reporting of data by demographic variables, such as age and sex, facilitate pooling of data for subgroups across studies and should be routine, unless there are compelling reasons not to stratify reporting, which should be explained.

#### **f. Discussion**

It is useful to begin the discussion by briefly summarizing the main findings, and explore possible mechanisms or explanations for these findings. Emphasize the new and important aspects of your study and put your findings in the context of the totality of the relevant evidence. State the limitations of your study, and explore the implications of your findings for future research and for clinical practice or policy. Discuss the influence or association of variables, such as sex and/or gender, on your findings, where appropriate, and the limitations of the data. Do not repeat in detail data or other information given in other parts of the manuscript, such as in the Introduction or the Results section.

Link the conclusions with the goals of the study but avoid unqualified statements and conclusions not adequately supported by the data. In particular, distinguish between clinical and statistical significance, and avoid making statements on economic benefits and costs unless the manuscript includes the appropriate economic data and analyses. Avoid claiming priority or alluding to work that has not been completed. State new hypotheses when warranted, but label them clearly.

## **g. References**

### ***i. General Considerations Related to References***

Authors should provide direct references to original research sources whenever possible. References should not be used by authors, editors, or peer reviewers to promote self-interests. Although references to review articles can be an efficient way to guide readers to a body of literature, review articles do not always reflect original work accurately. On the other hand, extensive lists of references to original work on a topic can use excessive space. Fewer references to key original papers often serve as well as more exhaustive lists, particularly since references can now be added to the electronic version of published papers, and since electronic literature searching allows readers to retrieve published literature efficiently.

Do not use conference abstracts as references: they can be cited in the text, in parentheses, but not as page footnotes. References to papers accepted but not yet published should be designated as “in press” or “forthcoming.” Information from manuscripts submitted but not accepted should be cited in the text as “unpublished observations” with written permission from the source.

Published articles should reference the unique, persistent identifiers of the datasets employed.

Avoid citing a “personal communication” unless it provides essential information not available from a public source, in which case the name of the person and date of communication should be cited in parentheses in the text. For scientific articles, obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication.

Some but not all journals check the accuracy of all reference citations; thus, citation errors sometimes appear in the published version of articles. To minimize such errors, references should be verified using either an electronic bibliographic source, such as PubMed, or print copies from original sources. Authors are responsible for checking that none of the references cite retracted articles except in the context of referring to the retraction. For articles published in journals indexed in MEDLINE, the ICMJE

considers PubMed the authoritative source for information about retractions. Authors can identify retracted articles in MEDLINE by searching PubMed for "Retracted publication [pt]", where the term "pt" in square brackets stands for publication type, or by going directly to the PubMed's list of retracted publications.

References should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals in parentheses.

References cited only in tables or figure legends should be numbered in accordance with the sequence established by the first identification in the text of the particular table or figure. The titles of journals should be abbreviated according to the style used for MEDLINE ([www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals)). Journals vary on whether they ask authors to cite electronic references within parentheses in the text or in numbered references following the text. Authors should consult with the journal to which they plan to submit their work.

## ***ii. Reference Style and Format***

References should follow the standards summarized in the NLM's International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals: Sample References webpage and detailed in the NLM's Citing Medicine, 2nd edition. These resources are regularly updated as new media develop, and currently include guidance for print documents; unpublished material; audio and visual media; material on CD-ROM, DVD, or disk; and material on the Internet.

## **h. Tables**

Tables capture information concisely and display it efficiently; they also provide information at any desired level of detail and precision. Including data in tables rather than text frequently makes it possible to reduce the length of the text.

Prepare tables according to the specific journal's requirements; to avoid errors it is best if tables can be directly imported into the journal's publication software. Number tables consecutively in the order of their first citation in the text and supply a title for

each. Titles in tables should be short but self-explanatory, containing information that allows readers to understand the table's content without having to go back to the text. Be sure that each table is cited in the text.

Give each column a short or an abbreviated heading. Authors should place explanatory matter in footnotes, not in the heading. Explain all nonstandard abbreviations in footnotes, and use symbols to explain information if needed. Symbols may vary from journal to journal (alphabet letter or such symbols as \*, †, ‡, §), so check each journal's instructions for authors for required practice. Identify statistical measures of variations, such as standard deviation and standard error of the mean.

If you use data from another published or unpublished source, obtain permission and acknowledge that source fully.

Additional tables containing backup data too extensive to publish in print may be appropriate for publication in the electronic version of the journal, deposited with an archival service, or made available to readers directly by the authors. An appropriate statement should be added to the text to inform readers that this additional information is available and where it is located. Submit such tables for consideration with the paper so that they will be available to the peer reviewers.

### **i. Illustrations (Figures)**

Digital images of manuscript illustrations should be submitted in a suitable format for print publication. Most submission systems have detailed instructions on the quality of images and check them after manuscript upload. For print submissions, figures should be either professionally drawn and photographed, or submitted as photographic-quality digital prints.

For radiological and other clinical and diagnostic images, as well as pictures of pathology specimens or photomicrographs, send high-resolution photographic image files. Before-and-after images should be taken with the same intensity, direction, and color of light. Since blots are used as primary evidence in many scientific articles, editors may require deposition of the original photographs of blots on the journal's website.

Although some journals redraw figures, many do not. Letters, numbers, and symbols on figures should therefore be clear and consistent throughout, and large enough to remain legible when the figure is reduced for publication. Figures should be made as self-explanatory as possible, since many will be used directly in slide presentations. Titles and detailed explanations belong in the legends—not on the illustrations themselves.

Photomicrographs should have internal scale markers. Symbols, arrows, or letters used in photomicrographs should contrast with the background. Explain the internal scale and identify the method of staining in photomicrographs.

Figures should be numbered consecutively according to the order in which they have been cited in the text. If a figure has been published previously, acknowledge the original source and submit written permission from the copyright holder to reproduce it. Permission is required irrespective of authorship or publisher except for documents in the public domain.

In the manuscript, legends for illustrations should be on a separate page, with Arabic numerals corresponding to the illustrations. When symbols, arrows, numbers, or letters are used to identify parts of the illustrations, identify and explain each one clearly in the legend.

#### **j. Units of Measurement**

Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units (meter, kilogram, or liter) or their decimal multiples.

Temperatures should be in degrees Celsius. Blood pressures should be in millimeters of mercury, unless other units are specifically required by the journal.

Journals vary in the units they use for reporting hematologic, clinical chemistry, and other measurements. Authors must consult the Information for Authors of the particular journal and should report laboratory information in both local and International System of Units (SI).

Editors may request that authors add alternative or non-SI units, since SI units are not universally used. Drug concentrations may be reported in either SI or mass units, but the alternative should be provided in parentheses where appropriate.

#### **k. Abbreviations and Symbols**

Use only standard abbreviations; use of nonstandard abbreviations can be confusing to readers. Avoid abbreviations in the title of the manuscript. The spelled-out abbreviation followed by the abbreviation in parenthesis should be used on first mention unless the abbreviation is a standard unit of measurement.

#### **Sending the Submission**

Manuscripts should be accompanied by a cover letter or a completed journal submission form, which should include the following information:

A full statement to the editor about all submissions and previous reports that might be regarded as redundant publication of the same or very similar work. Any such work should be referred to specifically and referenced in the new paper. Copies of such material should be included with the submitted paper to help the editor address the situation. See also Section III.D.2.

A statement of financial or other relationships that might lead to a conflict of interest, if that information is not included in the manuscript itself or in an authors' form. See also Section II.B.

A statement on authorship. Journals that do not use contribution declarations for all authors may require that the submission letter includes a statement that the manuscript has been read and approved by all the authors, that the requirements for authorship as stated earlier in this document have been met, and that each author believes that the manuscript represents honest work if that information is not provided in another form See also Section II.A.

Contact information for the author responsible for communicating with other authors about revisions and final approval of the proofs, if that information is not included in the manuscript itself.

The letter or form should inform editors if concerns have been raised (e.g., via institutional and/or regulatory bodies) regarding the conduct of the research or if corrective action has been recommended. The letter or form should give any additional information that may be helpful to the editor, such as the type or format of article in the particular journal that the manuscript represents. If the manuscript has been submitted previously to another journal, it is helpful to include the previous editors' and reviewers' comments with the submitted manuscript, along with the authors' responses to those comments. Editors encourage authors to submit these previous communications. Doing so may expedite the review process and encourages transparency and sharing of expertise.

Many journals provide a presubmission checklist to help the author ensure that all the components of the submission have been included. Some journals also require that authors complete checklists for reports of certain study types (for example, the CONSORT checklist for reports of randomized controlled trials). Authors should look to see if the journal uses such checklists, and send them with the manuscript if they are requested.

The manuscript must be accompanied by permission to reproduce previously published material, use previously published illustrations, report information about identifiable persons, or to acknowledge people for their contributions.