

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/ DOUTORADO

**MILARA BRUNA MOI**

**INFLUÊNCIA DO NERVO VAGO SUBDIAFRAGMÁTICO E DO NERVO VAGO  
CELÍACO PARA O PÂNCREAS SOBRE A MORFOLOGIA DO FÍGADO EM  
RATOS OBESOS-MSG**

CASCAVEL-PR

Junho/2023

**MILARA BRUNA MOI**

**INFLUÊNCIA DO NERVO VAGO SUBDIAFRAGMÁTICO E DO NERVO VAGO  
CELÍACO PARA O PÂNCREAS SOBRE A MORFOLOGIA DO FÍGADO EM  
RATOS OBESOS-MSG**

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

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

**ORIENTADOR:** DR<sup>a</sup> Sandra Lucinei Balbo

**COORIENTADOR:** DR. Jean Franciesco Vettorazzi

CASCADEL-PR

Junho/2023

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

Moi, Milara

INFLUÊNCIA DO NERVO VAGO SUBDIAFRAGMÁTICO E DO NERVO VAGO CELÍACO PARA O PÂNCREAS SOBRE A MORFOLOGIA DO FÍGADO EM RATOS OBESOS-MSG / Milara Moi; orientadora Sandra Balbo; coorientador Jean Vettorazzi. -- Cascavel, 2023. 60 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, 2023.

1. Obesidade . 2. Fígado . 3. Nervo Vago . 4. Glutamato Monossódico . I. Balbo, Sandra , orient. II. Vettorazzi, Jean, coorient. III. Título.



Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Reitoria

CNPJ 78.680.337/0001-84  
Rua Universitária, 1619, Jardim Universitário  
Tel.: (45) 3220-3000 - Fax: (45) 3225-4590 - www.unioeste.br  
CEP: 85819-110 - Cx. P.: 701  
Cascavel - PARANÁ



## MILARA BRUNA MOI

Influência do nervo vago subdiafragmático e do nervo vago celíaco para o pâncreas sobre a morfologia do fígado em ratos obesos-MSG

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biociências e Saúde, área de concentração Biologia, processo saúde-doença e políticas de saúde, linha de pesquisa Processo saúde-doença, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a) - Sandra Lucinei Balbo

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Sabrina Grassioli

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Dionizia Xavier Scomparin

Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Cascavel, 2 de março de 2023

## AGRADECIMENTOS

Queria agradecer primeiramente a Deus, por sempre estar me guiando e protegendo, e dando força nos momentos difíceis da vida.

Agradeço a minha mãe Silvana Moi, por todo amor e por sempre estar me apoiando em todas as minhas decisões durante a vida. Sinto muito orgulho de ter ela como mãe, por ter me criado sozinha e ser o meu exemplo de mulher, e mesmo com todas as dificuldades sempre me ensinou o que é certo durante toda a vida.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Lucinei Balbo, por toda sua ajuda e suporte durante o desenvolvimento do trabalho, por sua paciência e seu jeito divertido de levar a vida, e por todo o seu profissionalismo e amor à pesquisa. Ao meu co-orientador Dr<sup>o</sup> Jean Franciesco Vettorazzi por toda sua ajuda, por ter a paciência de me ensinar alguns procedimentos para os resultados do meu trabalho.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sara Cristina Sagae e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elaine Monoela Porto Amorim por terem aceitado participar da minha qualificação e por todas as sugestões que foram de extrema importância para melhorar minha dissertação.

Agradeço muito ao Dr<sup>o</sup> Fabio Negretti por toda ajuda e por todo o ensinamento durante os três anos que trabalhei no Laboratório Prevenção, sou muito grata por todo apoio que tive para fazer o mestrado e principalmente para realizar a parte histológica do meu trabalho no laboratório. Com certeza se não fosse a ajuda do Dr<sup>o</sup> Fabio, Claudia e de alguns colegas de trabalho nada disso teria dado certo.

Agradeço muito ao Bruno meu namorado, por sempre me apoiar e tentar me acalmar nos momentos de desespero. Obrigada pela parceria e por estar sempre disposto a me ajudar.

Aos meus colegas de mestrado, trabalho e da vida: Andressa, Luana, Maiara, Ana Paula, Mylena, Jakeline, Carolina, Adrieli, Thayane, Ana Caroline, Barbara, Ariadne, Aldair, Marlise, Gabriel, Gabriela, Fernanda, Tatiana, muito obrigada por todo o apoio durante todos esses anos de amizade e por todos os encontros com muitas conversas e risadas.

## RESUMO

MOI, M.B. **Influência do nervo vago subdiafragmático e do nervo vago celíaco para o pâncreas sobre a morfologia do fígado em ratos obesos-msg.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2023.

A hiperatividade vagal e as alterações da atividade imunológica esplênica são eventos comuns na obesidade, que se tornou uma epidemia em escala global e está associada a inúmeras comorbidades, incluindo a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Em vista disso, objetiva-se nesta pesquisa avaliar o metabolismo lipídico e os aspectos morfológicos do fígado associados à DHGNA em ratos obesos-MSG submetidos à esplenectomia e à vagotomia subdiafragmática total, associadas ou não, e à vagotomia seletiva celíaca. Para isso, foram utilizados 30 ratos machos *Wistar*, os quais, durante os cinco primeiros dias de vida, receberam 4 g/kg peso de glutamato monossódico (MSG) (Grupo MSG). Aos 60 dias de vida, os animais foram submetidos a diferentes procedimentos cirúrgicos e distribuídos em três grupos, com 10 animais em cada: MFO (Falso operado); MVAG (Vagotomizado); MVC (Vagotomizado o ramo celíaco). Aos 150 dias de vida, foram avaliados os parâmetros bioquímicos séricos, sendo retirados fragmentos do fígado para processamento histológico, dosagem de triglicerídeos e colesterol hepáticos, bem como para expressão gênica e proteica de enzimas e fatores de transcrição envolvidos no metabolismo lipídico. Observou-se que o peso corporal, o comprimento nasoanal (CNA) e o índice de Lee foram semelhantes nos três grupos estudados, entretanto, o peso da gordura retroperitoneal foi significativamente maior no grupo MFO, quando comparado aos grupos MVAG e MVC. Por meio da avaliação histológica do fígado, foi possível verificar que, no grupo MFO, 84% dos animais apresentaram esteatose grau 0 e 16% grau 1, ao passo que os 100% dos animais dos grupos MVAG e MVC não desenvolveram esteatose hepática. Constatou-se também que o número de hepatócitos por campo analisado foi menor no grupo MFO, em comparação aos grupos MVAG e MVC. O número de não hepatócitos por campo analisado foi semelhante entre os animais MVAG e MFO. Por outro lado, no grupo MVC, o número de não hepatócitos é maior em relação aos outros dois grupos. Na razão hepatócito/não hepatócito, o grupo MFO foi semelhante aos demais grupos estudados, enquanto o grupo vagotomizado (MVAG) foi significativamente maior quando comparado ao grupo MVC. A expressão da proteína TNF- $\alpha$  do fígado foi semelhante entre os grupos.

**Palavras-Chaves:** Obesidade; MSG; Baço; Nervo Vago; Fígado.

## ABSTRACT

MOI, M.B. **Influence of the subdiaphragmatic vagus nerve and the celiac vagus nerve to the pancreas on liver morphology in obese-msg rats.** Dissertation (Master's Degree). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2023.

Vagal hyperactivity and alterations in splenic immune activity are common events in obesity, which has become an epidemic on a global scale and is associated with numerous comorbidities, including nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Therefore, we aimed to evaluate lipid metabolism and morphological aspects of the liver associated with NAFLD in obese MSG rats submitted to splenectomy and total subdiaphragmatic vagotomy associated or not with selective celiac vagotomy. For this purpose, 30 male Wistar rats were used, which during the first five days of life received 4 g/kg weight of MSG (MSG Group). At 60 days of life the animals were submitted to different surgical procedures and distributed into 3 groups, with 10 animals in each group: MFO (False Operated); MVAG (Vagotomized); MVC (Vagotomized the celiac branch). At 150 days of age, serum biochemical parameters were evaluated, and liver fragments were removed for histological processing, triglyceride and hepatic cholesterol dosage, as well as for gene and protein expression of enzymes and transcription factors involved in lipid metabolism. It was observed that body weight, NAC and Lee index were similar in the three groups studied, however the weight of retroperitoneal fat was significantly higher in the MFO group when compared to the MVAG and MVC groups. Through histological evaluation of the liver, it was possible to observe that in the MFO group, 84% of the animals presented steatosis grade 0 and 16% grade 1, differently, 100% of the animals in the MVAG and MVC groups did not develop hepatic steatosis. It was also observed that the number of hepatocytes per field analyzed was lower in the MFO group compared to the MVAG, MVC groups. The number of non-hepatocytes per field analyzed, was similar between the MVAG and MFO animals. On the other hand in the MVC group, the number of nonhepatocytes is higher compared to the other two groups. In the hepatocyte/non-hepatocyte ratio the MFO group was similar to the other groups studied, while the vagotomized group (MVAG) was significantly higher when compared to the MVC group. The expression of TNF- $\alpha$  protein in the liver was similar between the groups.

**Keywords:** Obesity; MSG; Spleen; Vagus Nerve; Liver.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Fotomicrografias representativas do fígado dos ratos Wistar aos 150 dias de vida dos grupos MFO, MVAG e MVC. Coloração HE. Aumento de 40x. A flecha indica hepatócitos com esteatose microvesicular.....39
- Figura 2-** Morfologia do fígado, número de hepatócitos (A), não hepatócitos/ por campo analisado (B), relação hepatócito/ não hepatócito (C). Os valores são expressos com média  $\pm$  SEM. Letras diferentes nas barras indicam diferenças significativas. One-way ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey  $P < 0,05$ .....40
- Figura 3-** Expressão da proteína hepática de TNF- $\alpha$  de ratos Wistar a 150 dias de vida nos grupos MFO, MVAG e MVC. Os valores são expressos como média  $\pm$  SEM. As letras diferentes nas barras indicam diferenças significativas. ANOVA unidireccional seguida de pós-teste Tukey  $P < 0,05$ .....41



## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> – Efeitos da administração neonatal de MSG..... | 29 |
| <b>Tabela 2</b> – Parâmetros Corporais .....                    | 30 |
| <b>Tabela 3</b> – Classificação esteatose .....                 | 31 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AG** – Ácidos graxos  
**ATP** – Adenosina trifosfato  
**CNA** – Comprimento naso-anal  
**COL** – Colesterol  
**CTL** – Controle  
**DHGNA** – Doença hepática gordurosa não alcoólica  
**DM-2** – Diabetes Mellitus tipo 2  
**DNA** – Ácido desoxirribonucleico  
**EH** – Esteatose hepática  
**EHNA** – Esteato-hepatite não alcoólica  
**ESP** – Esplenectomia  
**FO** – Falso Operado  
**G1P** – Glicose-1-fosfato  
**GLU** – Ácido Glutâmico  
**GLUT2** – Receptor de glicose do tipo 2  
**IL-6** – Interleucina 6  
**IMC** – Índice de massa corporal  
**LDL** – Lipoproteína de densidade baixa  
**LDN** – Lipogênese de novo  
**MSG** – Glutamato Monossódico  
**MFO** – Glutamato Monossódico+ Falso Operado  
**MVAG** - Glutamato Monossódico+ Vagotomia  
**MVC** - Glutamato Monossódico+ Vagotomia do Ramo Celíaco  
**OH** – Obesidade Hipotalâmica  
**SNA** – Sistemas Nervoso Autônomo  
**SNC** – Sistema Nervoso Central  
**RI** – Resistência à insulina  
**TG** – Triglicerídeo  
**VAG** – Vagotomia  
**VLDL** – Lipoproteína de densidade muito baixa  
**WHO** – World Health Organization

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 12 |
| 2. OBJETIVOS.....   | 14 |
| 2.1 Objetivo Geral .....  | 14 |
| 2.2 Objetivos Específicos.....                                    | 14 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA.....                                     | 15 |
| 3.1 Etiologia multifatorial da obesidade.....                     | 15 |
| 3.2 Fígado: do fisiológico ao patológico .....                    | 16 |
| 3.3 Intervenções no Combate da Obesidade.....                     | 18 |
| 3.4 Modelo animal de indução à obesidade hipotalâmica (MSG) ..... | 20 |
| ARTIGO CIENTÍFICO .....   | 22 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS .....  | 42 |
| REFERÊNCIAS GERAIS .....  | 43 |
| ANEXO A.....  | 51 |
| ANEXO B.....  | 53 |
| Normas da revista Eistein .....                                   | 53 |

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença caracterizada por sua etiologia multifatorial, definida como o excesso de energia armazenada em forma de gordura, provinda do desequilíbrio entre a ingestão e o gasto energético (HILL; COMMERFORD, 1996). Essa doença assume caráter epidêmico, abrangendo países desenvolvidos e em desenvolvimento, como o Brasil, demonstrando que houve um aumento da obesidade de 11,8% para 20,3%, em 2019; considerando-se o excesso de peso, 55,4% dos brasileiros estão nessa situação (BRASIL, 2019). Outro aspecto relacionado à obesidade é o aumento significativo do risco de complicações, incluindo doenças cardiovasculares, dislipidemias, diabetes *mellitus* 2 (DM2), hipertensão arterial, hipercolesterolemia, doenças respiratórias, osteoarticulares e certos tipos de câncer (SOWERS, 1998; WALLEY; BLAKEMORE; FROGUEL, 2006).

Fatores genéticos, metabólicos, endócrinos, neurais, ambientais e outros estão relacionados à gênese da obesidade (MOLINATTI; LIMONE, 1992). A facilidade e os avanços no transporte e na tecnologia provocaram uma redução na atividade física que, quando se relacionam a comportamentos alimentares inadequados, contribuem para o desenvolvimento dessa doença (TAUBES, 1998).

Atualmente, entende-se que a liberação de citocinas inflamatórias produzidas pelo tecido adiposo aumentado na obesidade e altas concentrações circulantes de ácidos graxos não esterificados levam o organismo à resistência à insulina (RI) (STEVEN et al., 2006), que afeta principalmente o fígado, os músculos e os tecidos adiposos (YADAV et al., 2011). O acúmulo excessivo de lipídeos nos hepatócitos origina o espectro de doenças denominado doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (ÂNGULO, 2002). A origem do processo inflamatório crônico subclínico presente na obesidade é desconhecida, porém, estudos demonstram a participação do tecido adiposo branco (FERRANTE, 2007) e do baço (WU et al., 2013) como fontes de citocinas e componentes do sistema imune, respectivamente. Novas evidências têm constatado que a atividade esplênica poderia estar envolvida no processo

inflamatório observado na obesidade, pois o baço é um órgão responsável por atividades hematopoiéticas e imunológicas (BRONTE; PITTET, 2013). Para além disso, a sua função imune é diretamente modulada pela atividade do sistema nervoso autônomo (SNA) (NANCE; SANDERS, 2007).

Indiscutivelmente, o elo mais importante entre o trato gastrointestinal e o SNC é o nervo vago, principal ramo do SNA parassimpático. Evidências revelam que o nervo vago tem potentes efeitos anti-inflamatórios sobre o organismo, além de indiretamente modular a resposta imune esplênica (HUSTON et al., 2006). Todavia, os neurônios aferentes vagais expressam dois fenótipos neuroquímicos diferentes que podem inibir ou estimular o acúmulo de gordura. A ingestão crônica de dietas ricas em calorias reduz a sensibilidade do nervo vago aferente e culmina com a hiperfagia e a obesidade (LARTIGUE, 2016). Além do envolvimento direto do nervo, do acúmulo de gordura e da ingestão alimentar, ele também tem participação direta na potencialização da secreção de insulina, que é um hormônio altamente lipogênico. Destaca-se que a obesidade induzida pelo glutamato monossódico (MSG), modelo utilizado neste estudo, não é dependente do aumento na ingestão alimentar, mas sim da lesão hipotalâmica causada pelo MSG, responsável por danos neuroendócrinos que culminam com a hiperinsulinemia, com a RI e com a obesidade. Diante do exposto, questiona-se qual é a participação do nervo vago e do baço sobre o metabolismo lipídico hepático em ratos obesos-MSG.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o metabolismo lipídico e os aspectos morfológicos do fígado associados à DHGNA em ratos obesos-MSG submetidos à vagotomia subdiafragmática total associada e à vagotomia seletiva celíaca.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Verificar, no modelo experimental, a instalação e o desenvolvimento da obesidade induzida pelo glutamato monossódico (MSG);
- Analisar os efeitos da obesidade-MSG e das cirurgias sobre os parâmetros bioquímicos e biométricos;
- Avaliar os efeitos da obesidade-MSG e das cirurgias sobre os aspectos da morfologia do fígado relacionados à manifestação da DHGNA e à expressão proteica de enzimas ligadas ao metabolismo lipídico hepático.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Etiologia multifatorial da obesidade**

A obesidade é uma doença de causas multifatoriais, por isso, é considerada um importante problema de saúde pública e, atualmente, classificada como uma epidemia global. Do ponto de vista clínico, pode-se definir a obesidade como um acúmulo excessivo de gordura corporal, em um nível suficiente para produzir consequências adversas à saúde (KOPELMAN, 2000), comprometendo o bem-estar físico, psíquico e social do indivíduo, o que se constitui um fator de risco para outras enfermidades (WANDERLEY; FERREIRA, 2010; GATTA-CHERIFI, 2016; BOGLIOLO, 2011). A proporção de adultos obesos mais do que dobrou em 17 anos, uma elevação de 12,2%, entre 2002 e 2003, para 26,8%, em 2019. No mesmo período, o excesso de peso de pessoas adultas passou de 43,3% para 61,7%, correspondendo a quase dois terços dos brasileiros (PESQUISA NACIONAL DA SAUDE, 2019). A obesidade é de difícil enfrentamento devido à sua etiologia multifatorial composta por fatores genéticos, ambientais e socioculturais. O fator genético pode exercer papel expressivo no desequilíbrio energético. Os fatores ambientais, por sua vez, são caracterizados, na atualidade, pelo aumento do consumo de alimentos de baixo custo, processados e de alta concentração energética. Somam-se a esses fatores os hábitos culturais e sociais que influenciam no consumo de alimentos inadequados, bem como na inatividade física, resultando no excesso de peso (BRAGA et al., 2020).

A obesidade leva ao desenvolvimento de doenças metabólicas, tais como diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (JOHNSON; OLEFSKY 2013), doenças cardiovasculares, hipertensão (DEMARCO; AROOR; SOWERS, 2014), hiperlipidemia, doença renal crônica, apneia do sono, osteoartrite e alguns tipos de câncer (por exemplo, câncer de mama, de cólon e de próstata) e a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (NEUSCHWANDER-TETRI, 2005).

Para o diagnóstico de sobrepeso e obesidade em adultos, a medida mais

usada é o Índice de Massa Corporal (IMC), que é definido como o peso em quilogramas dividido pelo quadrado da estatura em metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Indivíduos com IMC entre 25 e  $30 \text{ kg}/\text{m}^2$  são classificados com sobrepeso e aqueles com IMC acima de  $30 \text{ kg}/\text{m}^2$  são classificados como obesos (FERNANDES; CLEMENTE; MANCINI, 2013).

### **3.2 Fígado: do fisiológico ao patológico**

O fígado é considerado um órgão essencial no controle do metabolismo lipídico, podendo direcionar as gorduras com base nas condições hormonais e metabólicas dos indivíduos, além de fornecer substrato energético necessário para os tecidos periféricos (SPASSIANI; KUK, 2008). Os lipídeos podem ser armazenados, oxidados para produzir adenosina trifosfato (ATP) ou transportados por lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) para os tecidos periféricos, sendo utilizados pelo músculo esquelético e armazenados pelo tecido adiposo (DURSTINE et al., 2002; NGUYEN et al., 2008).

O fígado desempenha um papel predominante na regulação da homeostase lipídica por meio das principais vias metabólicas lipídicas, incluindo a lipogênese de novo (LDN), que inclui a síntese de ácidos graxos (AG), a síntese e o armazenamento de triglicerídeos (TG), a síntese de lipídeos complexos, como colesterol, ceramida e fosfolípido, a síntese de lipoproteínas, a secreção e a lipólise (SIMHA; GARG, 2006; WANG; KAUFMAN, 2014).

Após a digestão alimentar, os produtos do metabolismo são transportados até o fígado por meio do sistema porta-hepático, e a glicose é transportada para o citoplasma do hepatócito pelo transportador de glicose tipo 2 (GLUT2). Em seguida, é fosforilada pela enzima glicoquinase (GCK) à glicose-6-fosfato, podendo então ser convertida em glicose-1-fosfato (G1P) pela enzima fosfoglicomutase. Pela ação das enzimas UDP-glicose pirofosforilase e glicogênio sintase, a G1P pode ser adicionada às cadeias de glicogênio. Quando a capacidade de armazenamento de glicogênio hepático é saturada, a glicose



será redirecionada à síntese de ácidos graxos (AG), processo denominado lipogênese *de novo* hepática (RUI, 2014).

Na lipogênese de novo, a glicose entra no fluxo glicolítico e desencadeia uma reação de cascata metabólica, o que proporciona a formação do ácido palmítico e dos ácidos graxos insaturados. Esses compostos são esterificados com o gliceraldeído-3-fosfato para formação de triglicerídeos (TG). Em condições normais, as VLDL podem redirecionar o TG do fígado para o tecido adiposo (HUSSAIN; NIJSTAD; FRANCESCHINI, 2011; KAWANO; COHEN, 2013). A insulina pode inibir a glicogenólise e a gliconeogênese no fígado, dificultando a produção e a liberação de glicose hepática e estimulando o acúmulo de glicogênio (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Esse hormônio também tem o papel de alterar a quantidade de ácidos graxos livres liberados pelo tecido adiposo (BERGMAN, 1997). O fluxo desses compostos na veia porta modula a sensibilidade à insulina no fígado e regula, assim, a produção de glicose (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

A elevação do fluxo desses ácidos graxos livres derivados do tecido adiposo, visceral ou intra-abdominal para o fígado (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005) e/ou os defeitos nas vias de sinalização intracelular da insulina (PATTI; KAHN 1998) são importantes fatores para o desenvolvimento da RI. Ao mesmo tempo, a gordura subcutânea abdominal libera produtos de lipólise na circulação sistêmica, contribuindo para a diminuição desses efeitos no metabolismo hepático. O fígado aumenta a síntese hepática e o acúmulo de TG no citoplasma do hepatócito para que ocorra um reajuste no quadro de RI (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005). O acúmulo de TG pode ocorrer devido ao aumento da absorção de ácidos graxos da circulação, provenientes da lipólise do tecido adiposo ou de uma dieta altamente calórica, à síntese *de novo* de ácidos graxos pela ativação da via lipogênica, à diminuição da beta-oxidação de ácidos graxos e/ou à diminuição da secreção hepática de VLDL (BERLANGA et al., 2014).

Portanto, em função do aumento da adiposidade e da RI, esse quadro clínico está fortemente associado ao desenvolvimento de doenças hepáticas sem relação com o alcoolismo, pois promove o acúmulo de TG no fígado. As

comorbidades variam de uma esteatose hepática até um grave processo não inflamatório, chamado de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (DIEHL et al., 1999; MARCHESIN et al., 2003; BRUNT, 2001; ÂNGULO, 2002; ALBA; LINDOR, 2003; NEUSCHWANDER-TETRI, 2005; LIU; BENGMARK; QU, 2010).

A DHGNA inclui um espectro de doenças hepáticas crônicas variando de uma simples esteatose hepática (EH), em que o indivíduo tem apenas acúmulo de lipídeos, até uma esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). Nesse caso, além da concentração de lipídeos, há a presença de inflamação e de degeneração hepatocelular, podendo estar acompanhadas do aparecimento de fibrose e até mesmo evoluir para a cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (CHALASANI et al., 2012; WILLEBRORDS et al., 2015). A DHGNA é a doença hepática mais comum no mundo ocidental e afeta todos os grupos raciais e étnicos, sem predileção por sexo ou idade, além de ser a causa de elevação assintomática de aminotransferases de 45 a 90% dos casos. A prevalência dessa doença aumenta significativamente em obesos, podendo chegar de 50 a 75% (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Estima-se que um bilhão de pessoas atualmente sofrem de alguma forma de DHGNA (LOOMBA; SANYAL, 2013).

O mecanismo molecular subjacente à progressão da DHGNA não é completamente compreendido, mas a sua patogênese pode ser explicada pela hipótese de “duplo-*hit*”. O “primeiro *hit*” inclui o acúmulo de gordura no hepatócito, decorrente de certos mecanismos que levam a maior síntese ou importação de ácidos graxos quando comparado com a degradação ou com a sua exportação. O “segundo *hit*” é caracterizado pela possível ocorrência de inflamação e de fibrose no fígado, já sensibilizado pela esteatose, devido a diversos estímulos que envolvem a ação de citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo e outros mecanismos responsáveis pelo acúmulo de gorduras nesse órgão (DAY; JAMES, 1998).

### **3.3 Intervenções no Combate da Obesidade**

Com o intuito de reduzir a gordura corporal, podem-se identificar, na literatura, diversos métodos de prevenção, entre os quais se destacam: a dieta (WAJCHENBERG, 1992; COUTINHO, 1999; McARDLE, 2000; FRANCHISCH et al., 2000; CABRAL, 2002); a atividade física (COUTINHO, 1999; McARDLE, 2000; WHO, 2001; CABRAL, 2002; MOLINA JUNIOR; ZANELLA, 2005); o tratamento medicamentoso (CABRAL, 2002; SOUTO, 2005) e as cirurgias bariátricas (SEGAL, FANDIÑO, 2002; ARASAKI et al., 2005; SANTOS et al., 2006).

Como muitos mecanismos biológicos estão por trás da regulação da homeostase energética, o tratamento da obesidade e a subsequente manutenção do peso corporal perdido têm se mostrado desafiadores. Modificações comportamentais que promovem hábitos alimentares saudáveis e incentivam mais exercícios são recomendadas como terapia de primeira linha, mas, muitas vezes, não produzem a perda de peso sustentada de dois dígitos (ou seja, > 10%) devido aos processos adaptativos que ocorrem para prevenir um estado de fome como uma diminuição no gasto de energia e um aumento no apetite. A farmacoterapia é usada como um complemento às mudanças comportamentais, especialmente quando as alterações no estilo de vida não produzem a perda de peso desejada (SCHNEIDE; MUN, 2005)

A atividade física por si só não é um método eficaz para alcançar a perda de peso inicial, embora a maioria das pessoas com sobrepeso ou obesas tenda a escolher o exercício como a primeira opção de intervenção. Sem restrição calórica, a perda de peso apenas por meio de exercícios é bem pequena, cerca de 0,1 kg / semana (BERALDO; VAZ; NAVES, 2004). Uma meta-análise revelou que o exercício por si só não resultou em tentativas significativas de perda de peso, embora nenhum ganho de peso adicional tenha sido observado após 12 meses (CHAPMAN, 1995).

Há anos, estuda-se a participação do nervo vago na instalação e no desenvolvimento da obesidade (BALBO, S.L. et al., 2007; BALBO, S.L. et al., 2016; BRAY, G. A.; YORK, 1979; SCOMPARIN et al., 2009; BEREKET, A. et al., 2012; LARTIGUE, 2016). Várias evidências experimentais sugerem que uma

disfunção do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), com o aumento da atividade parassimpática (vagal) e com a redução da atividade simpática, contribui para o acúmulo do tecido adiposo e para a manutenção da obesidade (BRAY; YORK, 1979, 1998; BALBO et al., 2007; MITRANI et al., 2007; SCOMPARIN et al., 2009; STEARNS et al., 2012; BARELLA et al., 2015). Em pacientes obesos mórbidos (KRAL, 1980) e em modelos experimentais de roedores com obesidade hipotalâmica (BALBO et al., 2007; LUBACZEUSKI et al., 2015) e genética (ROHNER-JEANRENAUD et al., 1983), a vagotomia subdiafragmática normaliza a concentração plasmática de insulina e a RI, além de reduzir significativamente o acúmulo de gordura. Stearns et al. (2012) demonstraram, por meio de imagens obtidas por ressonância magnética, que ratos obesos por dieta de cafeteria tiveram uma redução nos estoques de gordura abdominal e visceral após a vagotomia (STEARNS et al., 2012). Resultados similares foram demonstrados por Balbo et al. (2016), sugerindo fortemente que o desbalanço autonômico contribui para a instalação e para a manutenção da obesidade. A vagotomia do ramo celíaco (VCE), outra técnica cirúrgica menos invasiva e localizada, reduziu drasticamente a secreção de insulina adiante da glicose e da potencialização dessa secreção estimulada por carbacol em ratos não obesos. Desse modo, a hiperinsulinemia e a RI estão diretamente associadas à obesidade.

### **3.4 Modelo animal de indução à obesidade hipotalâmica (MSG)**

A indução da obesidade pela administração neonatal do glutamato monossódico (MSG) causa efeitos neurotóxicos no hipotálamo, atingindo principalmente neurônios do núcleo arqueado. Os danos ao hipotálamo causados pela invasão do tumor ou pelo tratamento resultam na incapacidade de integrar os vários hormônios aferentes e os sinais de neuropeptídeos. Vários núcleos no hipotálamo medial são os principais reguladores da saciedade e do gasto de energia. Os núcleos mais comuns implicados na obesidade hipotalâmica são o núcleo arqueado, o núcleo paraventricular, o núcleo ventromedial, o núcleo dorsomedial e a área hipotalâmica dorsal. Danos a alguns

ou a todos esses núcleos no hipotálamo medial resultam em desregulação da saciedade e do gasto de energia, causam alterações neuroendócrinas e metabólicas e provocam a obesidade hipotalâmica (ABUZZAHAB; ROTH; SHOEMAKER, 2019)

Pacientes obesos hipotalâmicos (OH) apresentam deficiência na secreção de hormônios hipofisários (KARAVITAKI et al., 2006), perturbação nos sinais orexigênicos e anorexigênicos no hipotálamo, adiposidade excessiva, hiperleptinemia, redução do tônus simpático e aumento do tônus parassimpático (HOCHBERG; HOCHBERG, 2010). hiperinsulinemia, RI, dislipidemias e DHGNA (ADAMS et al., 2004).

Estudos demonstram que a administração pós-natal precoce de MSG em roedores produz necrose neuronal nos núcleos arqueados do hipotálamo e na eminência mediana, o que leva ao desenvolvimento de obesidade na idade adulta. A obesidade induzida por MSG é caracterizada por hipo ou normofagia, por maior deposição de gordura, por intolerância à glicose, por hiperinsulinemia e por RI. Sabe-se que ilhotas pancreáticas de roedores obesos com MSG secretam mais insulina em resposta à glicose.

Além disso, estudos evidenciaram que a administração de MSG causa alterações no eixo hipotálamo-hipófise, resultando na redução da secreção do hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) e, conseqüentemente, de GH, assim como a diminuição do hormônio luteinizante (LH) e da testosterona (NEMEROFF et al., 1978; TERRY; EPELBAUM; MARTIN, 1981). Esses achados explicam a redução do crescimento corporal desses animais e o mal desenvolvimento de ossos e de músculos (SVIDNICKI et al., 2015).

## **ARTIGO CIENTÍFICO**

**Influence of the subdiaphragmatic vagus nerve and the celiac vagus nerve to the pancreas on liver morphology in obese-msg rats.**

**Title:** Influence of the subdiaphragmatic vagus nerve and the celiac vagus nerve to the pancreas on liver morphology in obese-msg rats.

## **ABSTRACT**

**Objective:** to evaluate the effect of subdiaphragmatic vagotomy and splenectomy, associated or not, and the celiac vagotomy on liver morphology in monosodium glutamate (MSG)-obese rats. **Methods:** Male newborn Wistar rats received a subcutaneous injection of MSG [4 g/kg body weight (BW); MSG group], or saline (1.25 g/kg BW; CTL group) during the first 5 days of life. At 60 days of life MSG animals were randomly distributed in three groups: sham-vagotomized rats (MFO group), vagotomized rats (MVAG group), Vagotomy celiac branch innervating the pancreas (MVC group). Non-surgical procedure was used to CTL rats; this group was used only to verify obesity installation. At 150 days of life the animals were euthanized and the liver and retroperitoneal fat were removed. The liver was weighted and a fragment extracted to verify the histological morphology. **Results:** MSG animal presented an increase of 5% on Lee-index and 80% on retroperitoneal fat pads compared to CTL. The retroperitoneal fat pads were higher in MFO group when compared to MVAG and MVC. MFO group presents 84% of animals with 0 grade steatosis and 16% on grade 1. In animals submitted to surgery procedure, 100% of animals from groups MVAG and MVC did not developed hepatic steatosis. Interestingly the number of hepatocytes observed is increased in MVAG and MVC groups when compared to MFO. The liver TNF- $\alpha$  protein expression were similar between the groups. **Conclusion:** total subdiaphragmatic vagotomy or selective vagotomy for the

pancreas in the MSG-obesity model improve liver function by increasing the number of hepatocytes.

**Keywords:** Hypothalamic obesity, Vagus nerve, Spleen, Liver, Splenectomy.

## INTRODUCTION

Obesity is characterized by an excessive fat accumulation that can induce the development of type 2 diabetes (T2D), arterial hypertension, lipid profile alteration and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) <sup>(1,2)</sup>. NAFLD is a clinical condition with histologic and metabolic alterations due to increased fat pads in hepatocytes without association with alcohol consumption <sup>(3)</sup>. Lipids accumulation is associated with several factors such as increased dietary fat intake or insulin resistance (RI) <sup>(3)</sup>.

Parasympathetic nervous system (PNS) dysfunction is also associated with obesity, metabolic syndrome and inflammatory response. Obese animals have reduced sympathetic and increased parasympathetic activity that can induce fat accumulation, impairing energetic homeostasis <sup>(7,8,9)</sup>. Subdiaphragmatic vagotomy reduces insulin levels, improves lipid metabolism, and reduces fat pads in monosodium-glutamate (MSG) obese model <sup>(10)</sup>.

The exposition of rodents to elevated concentrations of MSG during neonatal period induces hypothalamic lesions that impair neuroendocrine system and metabolic homeostasis, effect like that seen in obesity. This model shows an imbalance in autonomic nervous system (ANS), with increased parasympathetic and reduced sympathetic activity, obesity, hyperinsulinemia,



insulin resistance, glucose intolerance and dyslipidemias<sup>(11)</sup>. In this sense, this study aims to evaluate the effect of subdiaphragmatic vagotomy and the celiac vagotomy on liver morphology in MSG obese rats.

## **METHODS**

### **Induction of experimental obesity in rats**

All procedures were previously approved by Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the UNIOESTE on March 16, 2017. Male newborn Wistar rats received a subcutaneous injection of MSG [4 g/kg body weight (BW); MSG group], or saline (1.25 g/kg BW; CTL group) during the first 5 days of life. Pups were weaned on the 21st day of life and had free access to standard rodent chow (Biobase, Brazil) and water. The rats were housed in standard cages and maintained on a 12:12-h light-dark cycle (lights on from 7:00 a.m. to 7:00 p.m.) under controlled temperature (22±2C).

### **Surgical Procedures**

At 60 days of age, MSG rats, after 12 hours of fasting, were anesthetized with isoflurane (1%), under spontaneous oxygen ventilation (1mL/min) and were submitted to subdiaphragmatic truncal vagotomy. The stomach and esophagus were exteriorized from the peritoneal cavity and humidified with saline. The common hepatic branch of the ventral vagal trunk, the accessory celiac and gastric branches of the ventral vagal trunk, and the dorsal vagal trunk were cut (MVAG group). The vagotomy procedures were performed according to protocols

<sup>(10)</sup>. In sham-vagotomized rats (MFO group), the vagus nerve was separated from the esophagus, but was not cut. In MVC group of the celiac branch innervating the pancreas were isolated and cut <sup>(12)</sup>. During the surgeries the animals were given analgesia with Tramadol and antibiotics. After the surgical procedure another dose of Tramadol was applied and all animals were housed in individual cages, with free access to rodent food and water, for 1 week to ensure adequate recovery. Posteriorly, animals were reallocated in groups (3-4 rats/cages) according subgroups. Thus, considering MSG treatment and surgical procedures were performed two experimental groups: MVAG and MVC. Non-surgical procedure was used to CTL rats; this group was used only to verify obesity installation.

### **Euthanasia and Adiposity**

At 150 days of life and after 12 hours of fasting the animals from all groups were weighted, briefly desensitized with CO<sub>2</sub> being immediately registered the naso-anal length (NAL; cm) and then decapitated. The obesity was estimated by Lee index (LI) formulae [ $\sqrt[3]{\text{BW (g)}/\text{NAL (cm)}}$ ] <sup>(13)</sup>. The abdominal cavity was laparotomized and the liver and retroperitoneal fat were removed and weighed.

### **Liver histology Analysis**

Approximately 500 mg of the liver was removed from the left side in the transverse direction of the organ, from periphery to center, in order to obtain a better analysis of the tissue as a whole. Immediately after collection, the liver fragment was fixed in 10% formalin for 24 hours. After fixation, it was dehydrated

in alcohol, diaphanized in xylol and then embedded in histological paraffin (SIGMA-ALDRICH, Brazil). A microtome (Olympus) was used to make 3  $\mu\text{m}$  cuts in the tissue for mounting the slides. The staining was performed by the Hematoxylin and Eosin technique. The liver slides were examined and classified according to the magnitude of steatosis, based on Brunt's classification with modifications for rodents <sup>(14)</sup>. Steatosis was classified (0 to 3), as follows: 0, none to 5% of hepatocytes affected; 1, > 5% to 33% of hepatocytes affected; 2, > 33% to 66% of hepatocytes affected; and 3, > 66% of hepatocytes affected. Manual counting of the number of hepatocytes and non-hepatocytes (endothelial cells, macrophages, Kupffer cells, and inflammatory infiltrates) per image field was also performed with the aid of Image J software. Subsequently, the number of hepatocytes was divided by the number of nonhepatocytes to obtain the ratio of hepatocytes/non-hepatocytes per histological field analyzed <sup>(15)</sup>.

### **Western Blot analysis**

For protein expression analysis, a fragment of the left lobe of the liver was mechanically homogenized in extraction buffer containing: Urea (7M), Thiourea (2M), EDTA (5mM), Sodium Fluoride (1mM), Orthovanadate (1mM), Pyrophosphate (1mM), PMSF (1mM) and Aprotinin (2mM). After the addition of 10% Triton, the homogenate was centrifuged at 12,000 rpm for 30 minutes and the supernatant collected. After protein quantification by Bradford, using BSA for standard curve and the Bradford reagent (Bio-Agency Lab, Brazil), 80  $\mu\text{g}$  of the samples were incubated at 97°C for 5 minutes in 40% volume of 5X Laemmli Buffer (0.1% bromophenol blue, 1M sodium phosphate, 50% glycerol, 10% SDS).

For high molecular weight proteins 5  $\mu$ l of Spectra™ marker (BioRad®, USA) was used and for low molecular weight proteins 5  $\mu$ l of Kaleidoscope™ marker (ThermoFisher Scientific, Lithuania) was used. The proteins were then separated by biphasic polyacrylamide gel electrophoresis (6.5 or 10% SDS-PAGE) in a horizontal gel box (Enduro™, USA) containing running buffer (200mM Trisma base, 1.52M glycine, 7.18mM EDTA, 4% SDS, MilliQ water) at room temperature at 90. Samples were transferred to a nitrocellulose membrane (BioRad®, USA). Transfer was performed for 90 minutes at 120 V on ice, bathed with transfer buffer (Trisma base 25 mM, glycine 192 mM). After transfer, the membrane was blocked with 5% skim milk in Tris-buffered saline (TBS) for 2 hours at room temperature. The study-related proteins were detected on Nitrocellulose membrane by overnight incubation at 4°C with a primary antibody specific for Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ),  $\alpha$ -Tubulin was used as an internal control (1:1,000, Sigma-Aldrich Chemicals, USA). Then, the membranes were incubated with anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (1:10,000; Cell Signaling Technology, USA) in TBS with 2% skim milk for 2 hours at room temperature. The development was performed in the image capture system L-Pix Chemi Express (Loccus Biotechnology ®, Brazil) by exposure with luminol solution in a darkroom. Quantification was performed with the aid of free image analysis software (<http://rsbweb.nih.gov/ij>).

### **Statistical analyses**

The results were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. Analysis of variance (ANOVA) was used for statistical evaluation. When P was

significant, the differences between the means will be evaluated with Tukey corrected P value.  $P < 0.05$  was adopted as the significance criterion. For the statistical analyses we used GraphPad Prism Software© version 5.00 for Windows (San Diego, USA).

## RESULTS

The characterization of obese model with MSG treatment is show in table 1. Body weight and naso-anal length (NAL) were 29% and 15%, respectively, reduced in MSG group compared to CTL. MSG animal also show an increase of 5% on Lee-index and 80% on retroperitoneal fat pads. The body weight, NAL, Lee-index and liver weight were similar between MVAG and MVC (Table 2). However, the retroperitoneal fat pads were higher in MFO group when compared to MVAG and MVC (Table 2).

**Table 1** – Effects of neonatal MSG administration on body parameter.

|                               | CTL           | MSG            |
|-------------------------------|---------------|----------------|
| Body weight (g)               | 423,45 ± 11   | 301,64 ± 108*  |
| naso-anal length (NAL)        | 23,14 ± 0,12  | 19,59 ± 0,21*  |
| Lee-index                     | 324,24 ± 2,32 | 341,91 ± 2,21* |
| Retroperitoneal fat (g/100 g) | 0,95 ± 0,19   | 1,71 ± 0,24*   |

\*Values are expressed as the mean ± standard error of the mean (n= 7 to 10 animals). \*  $P < 0,05$ .

CTL: Control Group, MSG: Monosodium Glutamate Group.

**Table 2:** Body Parameters of the MFO, MVAG and MVC groups.

|                                      | <b>MFO</b>             | <b>MVAG</b>             | <b>MVC</b>            |
|--------------------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|
| <b>Body weight (g)</b>               | 301,6 ± 10             | 298,2 ± 12              | 286,1±13,52           |
| <b>naso-anal length (NAL) (cm)</b>   | 19,6 ± 0,2             | 20,1 ± 0,3              | 18,44±0,30            |
| <b>Lee index</b>                     | 341,9 ± 2,2            | 332,5 ± 4,7             | 350,0±0,01            |
| <b>Retroperitoneal fat (g/100 g)</b> | 1,7 ± 0,2 <sup>b</sup> | 0,7 ± 0,05 <sup>a</sup> | 0,7±0,04 <sup>a</sup> |
| <b>Liver (g/100 g)</b>               | 2,22 ± 0,07            | 2,30 ±0,09              | 2,01 ± 0,05           |

\*Values are expressed as the mean ± standard error of the mean. Analysis of variance ANOVA test. Different letters refer to statistical differences between groups. P<0,05. MFO: Monosodium Glutamate + False Operative; MVAG: Monosodium Glutamate + Vagotomy; MVC: Monosodium Glutamate + Vagotomy of the celiac branch.

By the liver histologic evaluation and the Brunt criteria, MFO group presents 84% of animals with 0 grade steatosis and 16% on grade 1 (Table 3). MFO also presents hepatocyte cytoplasmatic alterations with small lipid droplets and nucleus located in the center of the cell with a predominance of microvesicular steatosis (Figure 1A). In animals submitted to surgery procedure, 100% of animals from groups MVAG and MVC did not developed hepatic steatosis (Table 2). In this sense, the histologic pattern of the liver in these

animals is characterized by hepatocytes arranged in rows, bounded by connective tissue. They have typical morphology, abundant cytoplasm, homogeneous appearance, nucleus in a central position in the cytoplasm and absence of steatosis (Figure 1B, 1C).

**Tabela 3:** Classification of microvesicular hepatic steatosis in grades from 0 to 3 with Brunt's NAFLD score in adult Wistar rats.

| <b>Classification Microvesicular</b> | <b>Grade 0</b> | <b>Grade 1</b> | <b>Grade 2</b> | <b>Grade 3</b> |
|--------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>MFO</b>                           | 84%            | 16%            | 0%             | 0%             |
| <b>MVAG</b>                          | 100%           | 0%             | 0%             | 0%             |
| <b>MVE</b>                           | 100%           | 0%             | 0%             | 0%             |

MFO: Monosodium Glutamate + False Operative; MVAG: Monosodium Glutamate + Vagotomy;

MVC: Monosodium Glutamate + Vagotomy of the celiac branch.

In liver morphologic analyses, the number of hepatocytes observed is reduced in MFO group when compared to MVAG and MVC (Figure 2A). In Figure 2B, the non-hepatocyte number were similar in MVAG and MFO. However, this number is elevated in MVC. The ratio hepatocyte/non-hepatocyte is elevated in MVAG compared to MVC (Figure 2C). When analyzed liver TNF- $\alpha$  protein expression, no differences were observed between the groups (Figure 3).

## **DISCUSSION**

MSG obese rodents are extensively used in studies about obesity and its comorbidities <sup>(10,16)</sup>. In this study, MSG animals presents reduced body weight and NAL, increased Lee-index and retroperitoneal fat pads. The body weight and

NAL reduction is due to, at least in part, the lesion on arched nucleus, where growth hormone (GH) is synthesized <sup>(17)</sup>. To evaluate the efficacy of vagotomy in our model, stomach was weighed and presents elevated in vagotomy group (data not shown).

In this study, total subdiaphragmatic vagotomy and as well as celiac vagotomy did not change body weight in obese MSG rats. However, retroperitoneal fat pads were 50% reduced in MVAG and MVC compared with MFO. Besides obesity physiopathology is complex, data from many studies show that dysfunction on ANS, with increased parasympathetic activity and reduced sympathetic activity are related to hyperinsulinemia and obesity development <sup>(7,18,19)</sup>. In accordance with this data, we show that vagotomy reduces retroperitoneal fat pads in MVAG and MVC groups.

Vagus nerve is fundamental in the maintenance of metabolic homeostasis and modulates immune system by spleen. Data show a relation between immune system and obesity development, and disruption in metabolic and immune homeostasis is associated with insulin resistance and dyslipidemias. The discovery of signal from PNS, as an unusual pathway, in the anti-inflammatory cytokines production reveals spleen as an important organ in autonomic dysfunction diseases and immune system. The inflammatory reflex is a physiologic mechanism where ANS detects inflammatory stimulus and modulates the cytokine production in immune organs, where vagus nerve and spleen have a pivotal role <sup>(4,20,6)</sup>.

The liver is also involved in obesity and metabolic alterations. Many studies show that fat accumulation in liver is characteristic of fat distribution due to the



relation between elevated free fatty acid (FFA) and lipidic metabolism <sup>(21)</sup>. Vagotomy reduces visceral and liver fat pads <sup>(7)</sup>. Martin et al. <sup>(22)</sup> show that hepatic vagotomy reduce lipogenic activity and fat pads due to alterations on hepatic insulin sensitivity <sup>(22)</sup>. MFO animals show hepatocyte histologic alterations compatible with mild steatosis. However, animals from MVAG and MVC did not develop hepatic steatosis. High fat diet animals show aggravation of dyslipidemia and hepatic steatosis after splenectomy <sup>(5)</sup>, effect that was different from this study with MSG obese mice. In this sense, seems that obesity genesis is important when evaluates splenectomy effects on liver.

Hepatocytes are the most important cells of the liver and essential cells for the body's homeostasis producing bile, degrading endogenous and exogenous substances, and acting in the metabolism of proteins, carbohydrates, and lipids <sup>(23)</sup>. It is observed in the present study that animals submitted to subdiaphragmatic vagotomy, as well as celiac, presented a greater number of hepatocyte in relation to the falsely operated obese animals. These results indicate that these vagal interventions in the MSG-obesity model improve liver function by increasing the number of hepatocytes. As the animals in the MVC group had a high number of non-hepatocytes compared to the MFO and MVAG groups, the presence of cells related to inflammation was suspected, therefore the protein expression of TNF- $\alpha$  in the liver of the animals was investigated. There was no significant difference between the three groups. The MSG-obesity model does not seem to present low-grade chronic inflammation like other obesity models <sup>(24)</sup>, which could justify our result. It is suggested that this differential feature is probably due to hypercorticosterolemia present in the MSG model <sup>(25)</sup>.

## **CONCLUSION**

The results reinforce the importance of the vagus nerve in the development of MSG-obesity. Here, we demonstrated for the first time that total subdiaphragmatic vagotomy or selective vagotomy for the pancreas improves liver function by increasing the number of hepatocytes.

## REFERENCES

1. Morales-Villegas E. Dyslipidemia, hypertension and diabetes metaflammation: a unique mechanism for 3 risk factors. *Current hypertension reviews*. 2013;9(4):278-296.
2. Milić S, Lulić D, Štimac D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2014;20(28):9330.
3. 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.
4. Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M, Liao H, Ochani K, Pavlov VA, Ulloa L. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J. Exp. Med*. 2006; 203(7):1623-1628.
5. 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.
6. 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.
7. 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.

8. Inoue S, Bray GA. The effects of subdiaphragmatic vagotomy in rats with ventromedial hypothalamic obesity. *Endocrinology*. 1977;100(1):108-114.
9. 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.
10. 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
11. 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.
12. Waataja J, Nihalani R, Honda CN, Billington CJ. Use of a bio-electronic device comprising of targeted dual neuromodulation of the hepatic and celiac vagal branches demonstrated enhanced glycemic control in a type 2 diabetic rat model as well as in an Alloxan treated swine model. *Frontiers in Neuroscience*. 2022;1752.
13. Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *Journal of endocrinology*. 1968;40(4):527-528.

14. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Rede de pesquisa clínica de esteatohepatite não alcoólica. Projeto e validação de um sistema de pontuação histológica para doença hepática gordurosa não alcoólica. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-1321.
15. De Oliveira CAR, dos Reis Araujo T, de Souza Aguiar G, da Silva Junior J A, Vettorazzi JF, Freitas IN, Ribeiro RA. Combined oral contraceptive in female mice causes hyperinsulinemia due to  $\beta$ -cell hypersecretion and reduction in insulin clearance. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2019;190, 54-63.
16. Gaspar RS, Benevides RO, Fontelles JL, Vale CC, França LM, Barros Pde T, Paes AM. Reproductive alterations in hyperinsulinemic but normoandrogenic MSG obese female rats. *J Endocrinol*. 2016;229(2):61-72.
17. 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.
18. 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.
19. 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.

20. McKinley MJ, Martelli D, Trevizan-Baú P, McAllen RM. Divergent splanchnic sympathetic efferent nerve pathways regulate interleukin-10 and tumour necrosis factor- $\alpha$  responses to endotoxaemia. *The Journal of Physiology.* 2022;600(20):4521–4536.

21. 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.

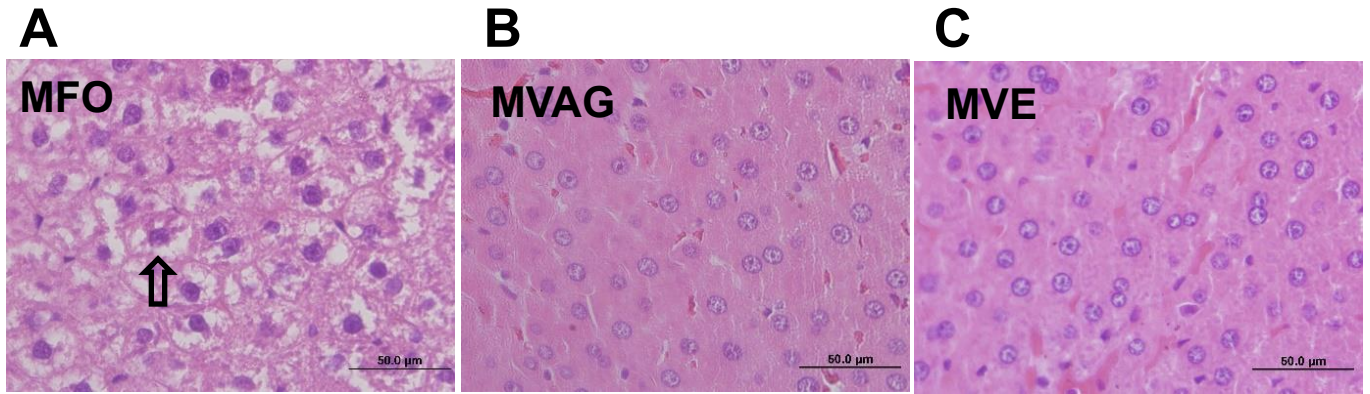
22. Martin DD, Cincotta AH, Meier AH. Hepatic vagotomy abolishes the circadian rhythm of lipogenic responsiveness to insulin and reduces fat stores in hamsters. *Neuroendocrinology.* 1990;52(1):9-14.

23. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol.* 2017;27(21):1147-1151.

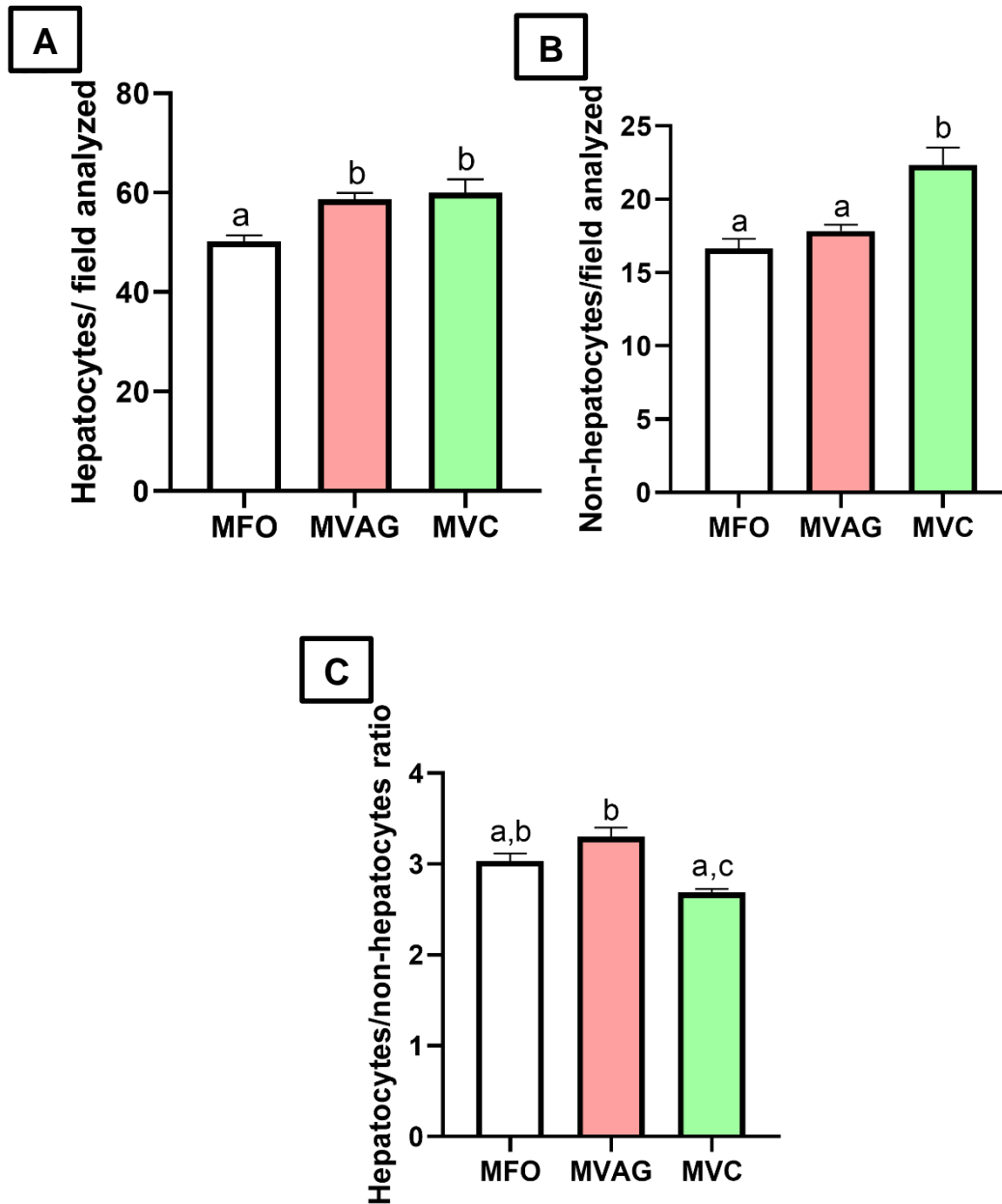
24. Caetano LC, Bonfleur ML, Ribeiro RA, Nardelli TR, Lubaczeuski C, Da Silva JDN, Balbo SL. Taurine supplementation regulates I $\kappa$ -B $\alpha$  protein expression in adipose tissue and serum IL-4 and TNF- $\alpha$  concentrations in MSG obesity. *European J Nutrition.* 2017;56(2):705-713.

25. Castrogiovanni D, Gaillard RC, Giovambattista A, Spinedi E. Neuroendocrine, metabolic, and immune functions during the acute phase response of inflammatory stress in monosodium L-glutamate-damaged, hyperadipose male rat. *Neuroendocrinology.* 2008;88:227-234

**Figure 1-** Representative photomicrographs of the liver of Wistar rats at 150 days of life in the MFO (A), MVAG (B) and MVC (D) groups. HE stains. 40x magnification. The arrow indicates hepatocytes with microvesicular steatosis.

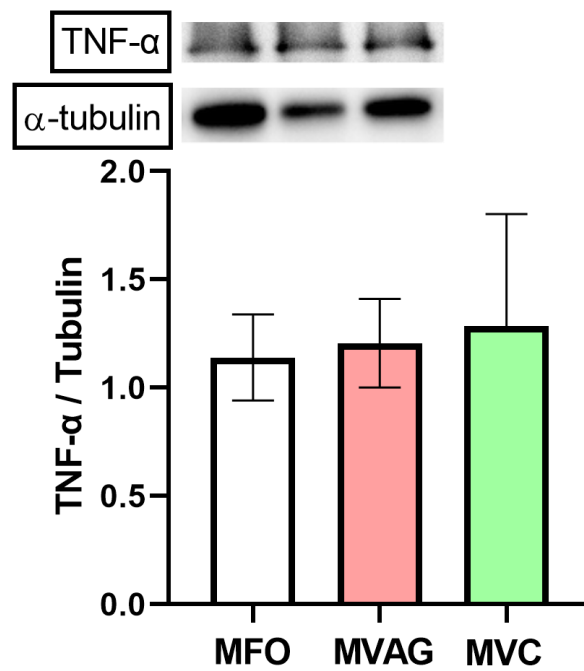


**Figure 2-** Liver morphology. Number of hepatocytes (A), non-hepatocytes/ per analyzed field (B), hepatocyte/non-hepatocyte ratio (C). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Different letters on the bars indicate significant differences. One-way ANOVA followed by Tukey P < 0.05 post-test.





**Figure 3** – Liver protein expression of TNF- $\alpha$  of Wistar rats at 150 days of life in the MFO, MVAG, and MVC groups. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Different letters on the bars indicate significant differences. One-way ANOVA followed by Tukey P < 0.05 post-test.



## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados deste estudo reforçam a importância do nervo vago no desenvolvimento da obesidade-MSG. Aqui, demonstramos pela primeira vez que a vagotomia subdiafragmática total ou a vagotomia seletiva para o pâncreas melhora a função hepática ao aumentar o número de hepatócitos.

## REFERÊNCIAS GERAIS

ABUZZAHAB, M. J.; ROTH, C. L.; SHOEMAKER, A. H. Hypothalamic obesity: prologue and promise. **Hormone research in paediatrics**, v. 91, n. 2, p. 128-136, 2019.

ALBA, L. M.; LINDOR, K. Review Article: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 17, n. 8, p. 977-986, 2003.

ANGULO, P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 1221-1231, 2002.

ARASAKI, C. H.; CLAUDINO, A. M.; ZANELLA. Cirurgia Bariátrica para tratamento da obesidade. **Guia de Transtornos Alimentares e Obesidade**, p. 287- 296, 2005.

BALBO, S. L., GRASSIOLLI, S., RIBEIRO, R. A., BONFLEUR, M. L., GRAVENA, C., DO NASCIMENTO BRITO, M., ... & TORREZAN, R. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. **Endocrine**, v. 3, 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.

BARELLA, L. F., MIRANDA, R. A., FRANCO, C. C., ALVES, V. S., MALTA, A., RIBEIRO, T. A., DE OLIVEIRA, J. C. Vagus nerve contributes to metabolic syndrome in high-fat diet-fed young and adult rats. **Experimental physiology**, v. 100, n. 1, p. 57-68, 2015.

BERALDO, F. C.; NAVES, M. M. V.; VAZ, Inaiana M. F. Nutrição, atividade física e obesidade em adultos: aspectos atuais e recomendações para prevenção e tratamento. 2004.

BEREKET, A., KIESS, W., LUSTIG, RH, MULLER, HL, GOLDSTONE, AP, WEISS, R., ... & HOCHBERG, ZE. Obesidade hipotalâmica em crianças. **Obesity Reviews**, v. 13, n. 9, p. 780-798, 2012.

BERGMAN, R. N. New Concepts in Extracellular Signaling for Insulin Action: the Single Gateway Hypothesis. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 52, p. 359-385, 1997.

BERLANGA, A.; GUIU-JURADO, E.; PORRAS, J. A.; AUQUET, T. Molecular Pathways in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 7, p. 221-239, 2014.

BOGLIOLO, L. **Patologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilatel Brasil 2019: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. **Brasília: Ministério da Saúde**, 2019.

BRAY, G. A., & YORK, D. A. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. **Physiological reviews**, v. 59, n. 3, p. 719-809, 1979.

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

BRUNT, E. M. Nonalcoholic Steatohepatitis: Definition and Pathology. **Seminars in Liver Disease**, v. 21, n. 1, p. 3-16, 2001.

CABRAL, M. D.; GARRIDO J.; ARTHUR, B. Tratamento clínico na obesidade mórbida. **Cirurgia da obesidade**, p. 35-44, 2002.

CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CHALASANI, N. et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. **Hepatology**, v. 55, n. 6, p. 2005-2023, 2012.

COUTINHO, W. Consenso Latino-Americano de Obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.**, 1999.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. Steatohepatitis: A Tale of Two "Hits"? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842-845, 1998.

DE LARTIGUE, G. Role of the vagus nerve in the development and treatment of diet-induced obesity. **The Journal of physiology**, v. 594, n. 20, p. 5791-5815, 2016.

DEMARCO, V.G.; AROOR, A.R.; SOWERS, J.R. The pathophysiology of hypertension in patients with obesity. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 6, p. 364-376, 2014.

DIEHL, A. M. Nonalcoholic Steatohepatitis. **Seminars in Liver Disease**, v. 19, p. 221-229, 1999.

DOLNIKOFF, M. S.; KATER, C.E.; EGAMI, M.; DE ANDRADE I.S.; MARMO M.R. Neonatal treatment with monosodium glutamate increases plasma corticosterone in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 48, n. 6, p. 645-649, 1988.

DURSTINE, J. L.; GRANDJEAN, P. W.; COX, C. A.; THOMPSON, P. D. Lipids, lipoproteins, and exercise. **Journal of Cardiopulm Rehabil**, v. 6, n. 22, p. 385-398, 2002.

ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The Metabolic Syndrome. **Lancet**, v. 365, p. 1415-1428, 2005.

FERNANDES, A. T.; CLEMENTE, A. P. G.; MANCINI, M. C. Obesidade: estado de má nutrição. In: SAWAYA, A. L.; LEANDRO, C. G.; WAITZBERG, D. L. **Fisiologia da nutrição na saúde e na doença: da biologia molecular ao tratamento**, p. 415-424, 2013.

FERRANTE, A. W. Obesity-induced inflammation: A metabolic dialogue in the language of inflammation. **Journal of Internal Medicine**, v. 262, n. 4, p. 408–

FRANCHISCH, R. P. P. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. **Revista de Nutrição**, v. 13, n. 1, p. 17-28, 2000.

FRIEDMAN SL, NEUSCHWANDER-TETRI BA, RINELLAM, SANYAL A. Mecanismos de desenvolvimento de NAFLD e estratégias terapêuticas. **Nature Medicine**, v. 24, p. 908 – 22, 2018.

GATTA-CHERIFI, B. Obesity: what's new in 2016? **Annales d'Endocrinologie**, v. 77, p. 29-36, 2016.

GOTOH, K., INOUE, M., SHIRAISHI, K., MASAKI, T., CHIBA, S., MITSUTOMI, K., KAKUMA, T. Spleen-Derived Interleukin-10 Downregulates the Severity of High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1–13, 2012

HILL, J. O.; COMMERFORD, R. Exercise, fat balance and energy balance. **International Journal of Sport Nutrition**, v. 6, n.1, p. 80-92, 1996.

HOCHBERG, I.; Z. HOCHBERG. Expanding the definition of hypothalamic obesity. **Obesity Reviews**, v. 11, p. 709-721, 2010.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1993.

HUSSAIN, M. M.; NIJSTAD, N.; FRANCESCHINI, L. Regulation of microsomal triglyceride transfer protein. **Journal Clin Lipidol**, v. 6, n. 3, p. 293-303, 2011.

HUSTON, J. 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. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 7, p. 1623–1628, 2006.

JI, H., RABBI, M. F., LABIS, B., PAVLOV, V. A., TRACEY, K. J., & GHIA, J. E. Central cholinergic activation of a vagus nerve - to spleen circuit alleviates experimental colitis. **HHS Public Access**, v. 7, n. 2, p. 335–347, 2014.

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

KARAVITAKI, N.; CUDLIP, S.; CHRISTOPHER B. T.; JOHN A. H. WASS Craniopharyngiomas. **Endocrine Reviews**, v. 27, n. 4, p. 371-397, 2006.

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

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548–2556, 2004.

KLEIN, R. L.; WILSON, S.P.; DZIELAK, D.J.; YANG, W.H.; VIVEROS, O.H. Opioid peptides and noradrenaline co-exist in large dense-cored vesicles from sympathetic nerve. **Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 2255–2261, 1982.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635-643, 2000.

LAMAS, O.; MARTI, A.; MARTÍNEZ, J. Obesity and immunocompetence. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. 42–45, 2002.

LEE, M.; KORNER, J. Review of physiology, clinical manifestations, and management of hypothalamic obesity in humans. **Pituitary**, v. 12, n. 2, p. 87-95, 2009.

LEITE, N. D. C. Splenectomy attenuates obesity and decreases insulin hypersecretion in hypothalamic obese rats. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 64, n. 9, p. 1122–1133, 2015.

LIU, Q.; BENGMARK, S.; QU, S. The Role of Hepatic Fat Accumulation in Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). **Lipids in Health and Disease**, v. 9, n. 42, 2010.

LOOMBA, R.; SANYAL, A. J. The global NAFLD epidemic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, n. 11, p. 686-690, 2013.

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, p. 447-457, 2015.

MARCHESINI, G.; BUGIANESI, E.; FORLANI, G.; CERRELLI, F.; LENZI, M.; MANINI, R.; NATALE, S.; VANNI, E.; VILLANOVA, N.; MELCHIONDA, N.; RIZZETTO, M. Nonalcoholic Fatty Liver, Steatohepatitis and the Metabolic Syndrome. **Hepatology**, v. 37, n. 4, p. 917-923, 2003.

MARIĆ G, GAZIBARA T, ZALETEL I, LABUDOVIĆ BOROVIĆ M, TOMANOVIĆ N, ĆIRIĆ M, PUŠKAŠ N. The role of gut hormones in appetite regulation (review), **Acta Physiol Hung.** n. 4, p. 395-407, 2014.

McARDLE, W. M.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Fundamentos da fisiologia do exercício**. 2. ed. Rio de Janeiro, RJ. Guanabara Koogan, 2000.

MESSINA, G. et al. Review Article Autonomic Nervous System in the Control of Energy Balance and Body Weight: Personal Contributions. **Neurology Research International**, v. 2013, p. 1–5, 2013.

MITRANI, P., SRINIVASAN, M., DODDS, C., & PATEL, M. S. Autonomic involvement in the permanent metabolic programming of hyperinsulinemia in the high-carbohydrate rat model. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 292, n. 5, p. 1364-1377, 2007.

MOLINA JUNIOR, SILVIO; ZANELLA, MARIA TEREZA. Atividade física no tratamento da obesidade. In: CLAUDINO, Angélica de Medeiros; ZANELLA, Maria Teresa (Coord.). **Guia de transtornos alimentares e obesidade**, p. 253-258, 2005.

MOLINATTI, G. M.; LIMONE, P. Obesity: a challenge for the clinician. **Frontiers in Diabetes**, n. 11, p. 7-15, 1992.

MULLER, H. L. Childhood craniopharyngioma. Recent advances in diagnosis, treatment and follow-up. **Hormone Research**, v. 69, n. 4, p. 193-202, 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.

NEMEROFF, C. B.; LIPTON, M. A.; KIZER, J. S. Models of neuroendocrine regulation: use of monosodium glutamate as an investigational tool. **Developmental neuroscience**, v. 1, n. 2, p. 102-109, 1978.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. Nonalcoholic Steatohepatitis and the Metabolic Syndrome. **American Journal of Medicine and Science**, n. 330, p. 326-335, 2005.

NGUYEN, P.; LERAY, V.; DIEZ, M.; SERISIER, S.; BLOC'H, J. L.; SILIART, B.; DUMON, H. Liver lipid metabolism. **Journal of Anim Physiol and Anim Nutrit**, v. 92, n. 3, p. 272-283, 2008.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Rev.Immunol.**, v. 11, n. 2, p. 85–97, 2011.

PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The Insulin Receptor – A Critical Link in Glucose Homeostasis and Insulin Action. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 89-110, 1998.

ROHNER-JEANRENAUD, F., BOBBIONI, E., IONESCU, E., SAUTER, J. F., & JEANRENAUD, B. Central nervous system regulation of insulin secretion. **Advances in metabolic disorders**, v. 10, p. 193-220, 1983.

RUI, L. Energy metabolism in the liver. **Compreh Physiol**, v. 4, n. 1, p. 177-197, 2014.

SANTOS, COUTO, E. M.; BURGOS, ARAÚJO. P. M. G.; SILVA, S. A. Perda ponderal após a Cirurgia Bariátrica de Fobi-Capella: realidade de um hospital universitário do Nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 21, n. 3. p. 188-192, 2006.

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

SCHNEIDER, B.E.; MUN, E.C. Surgical Mcincigement of Morbid Obesity. **Diabetes care**, v. 28, p. 2, 2005.

SCOMPARIN, D. X., GOMES, R. M., GRASSIOLLI, S., RINALDI, W., MARTINS, A. G., DE OLIVEIRA, J. C., ... & DE FREITAS MATHIAS, P. C. Autonomic activity and glycemic homeostasis are maintained by precocious and low intensity training exercises in MSG-programmed obese mice. **Endocrine**, v. 36, n. 3, p. 510-517, 2009.

SEGAL, ADRIANO; FANDINO, JULIA. Bariatric surgery indications and contraindications. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 2008.

SIMHA V, & GARG A. Lipodystrophy: lessons in lipid and energy metabolism. **Curr Opin Lipidol**, v. 17, p. 162–169, 2006.

SOMM, E. et al. Decreased Fat Mass in Interleukin-1 Receptor Antagonist–Deficient Mice. **Diabetes**, v. 54, n. 12, p. 3503–3509, 2005.

SOUTO, K. E. P. Tratamento clínico da obesidade mórbida: uso de fármacos antiobesidade.. **Cuidados pré e pós-operatórios na cirurgia da obesidade**, 2005, p. 46-49.



SOWERS, J. R. Obesity and cardiovascular disease. **Clin Chem**, v. 44, n. 8, p. 1821-1825, 1998.

SPASSIANI, N. A.; KUK, J. L. Exercise and the fatty liver. **Appl Physiol, Nutr, and Metab**, v. 33, n. 4, p. 802-807, 2008.

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**, v. 57, p. 1281-1290, 2012.

STEVEN E. KAHN , REBECCA L. HULL & KRISTINA M. UTZSCHNEIDER. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**. v. 444, n. 14, 2006.

SVIDNICKI, P. V., LEITE, N. C., VICARI, M. R., ALMEIDA, M. C. D., ARTONI, R. F., FAVERO, G. M., NOGAROTO, V. Swim training and the genetic expression of adipokines in monosodium glutamate-treated obese rats. **Archives of endocrinology and metabolism**, v. 59, p. 210-214, 2015.

TAUBES, G. As obesity rates rise, experts struggle to explain why. **Science**, v. 280, n. 5368, p. 1367-1368, 1998.

TERRY, L. C.; EPELBAUM, J.; MARTIN, J. B. Monosodium glutamate: acute and chronic effects on rhythmic growth hormone and prolactin secretion, and somatostatin in the undisturbed male rat. **Brain research**, v. 217, n. 1, p. 129-142, 1981.

TRZECIAK-RYCZEK, A. et al. Adipose tissue - Component of the immune system. **Central-European Journal of Immunology**, v. 36, n. 2, p. 95-99, 2011.

WAJCHENBERG, Bernardo Leo (Org.). **Tratado de Endocrinologia Clínica**. São Paulo: Roca, 1992.

WALLEY, A. J.; BLAKEMORE, A. I. F.; FROGUEL, P. Genetics of obesity and the prediction of risk for health. **Hum Mol Gen**, v. 15, n. 2, p. 124-130, 2006.

WANDERLEY, E. N.; FERREIRA, V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 1, p. 185-194, 2010.

WANG S, & KAUFMAN R. J. How does protein misfolding in the endoplasmic reticulum affect lipid metabolism in the liver? **Curr Opin Lipidol**, v. 25, p. 125-132, 2014.

WILLEBRORDS, J., PEREIRA, I. V. A., MAES, M., YANGUAS, S. C., COLLE, I., VAN DEN BOSSCHE, B., VINKEN, M. Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research. **Progress in lipid research**, v. 59, p. 106-125, 2015.

WHO. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. **Report of WHO Consultation on Obesity**. Geneva: World Health Organization, 1998.

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

YADAV, A. Correlation of Adiponectin and Leptin with Insulin Resistance: A Pilot Study in Healthy North Indian Population. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 26, n. 2, p. 193–196, 2011.

YAMAGUCHI, S. O gosto umami. 33-51. 1979.

## ANEXO A



### Autorização

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

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

Cascavel, 20/06/2017

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

## ANEXO B

### Normas da Revista Einstein

einstein (São Paulo) é uma publicação oficial de divulgação científica do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, ISSN 1679-4508, com periodicidade trimestral, e cujo objetivo é registrar a produção e as contribuições da comunidade científica na área da saúde. Serão aceitos artigos originais, em português e/ou inglês. Todos os artigos, após aprovação dos editores, serão encaminhados para análise e avaliação de no mínimo dois revisores, sendo o anonimato garantido em todo o processo de submissão. Os comentários serão devolvidos aos autores, para modificações no texto ou justificativas de sua conservação. Após as correções sugeridas pelos revisores, a forma definitiva do trabalho deve ser reencaminhada para a revista einstein (São Paulo), por meio do Sistema Gerenciador da Revista, no endereço eletrônico <http://apps.einstein.br/revista>. Somente após as aprovações finais dos revisores e editores, os artigos serão encaminhados para publicação. A responsabilidade pelos conceitos emitidos nos artigos é exclusiva dos autores. Os artigos aceitos para a publicação se tornam propriedade da revista. Somente o editor da einstein (São Paulo) pode autorizar a reprodução dos artigos em outro periódico. O conteúdo da einstein (São Paulo) está sob licença da Creative Commons (CC BY) Atribuição 4.0 Internacional (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.pt>).

A revista adota o sistema Turnitin para identificação de plágio. Os casos de má conduta na publicação serão avaliados conforme critérios e recomendações do Committee on Publication Ethics (COPE; <http://publicationethics.org>).

A einstein (São Paulo) é uma revista de acesso aberto e não cobra nenhuma taxa para submissão, revisão, tradução e publicação de artigo. Todos os processos são executados eletronicamente e podem ser acessados no endereço eletrônico <http://apps.einstein.br/revista>.

### SEÇÕES

A einstein (São Paulo) possui as seguintes seções: Artigo Original, Gestão e Economia em Saúde, Relato de Caso, Revisão, Revendo Ciências Básicas, 73 Aprendendo por Imagem, Avanços Médicos e Cartas ao Editor. A revista publica também uma subseção de revisões temáticas.

#### Artigo original

Destinado à divulgação de resultados da pesquisa científica. Os trabalhos devem ser originais e inéditos, e sua estrutura deve conter os seguintes itens: resumo estruturado (em português e inglês para artigos submetidos em português, e em

inglês para artigos submetidos em inglês), introdução, objetivo, métodos, resultados, discussão, conclusão e referências. O Artigo Original deve ter, no máximo, 3.000 palavras e até 30 referências.

### **Gestão e Economia em Saúde**

Artigos destinados à divulgação de conhecimento, que expressem conceitos e reflitam as práticas vigentes em gerenciamento, administração e economia em saúde. Devem conter os seguintes itens: resumo estruturado (em português e inglês para artigos submetidos em português, e em inglês para artigos submetidos em inglês), introdução, objetivo, métodos, resultados, discussão, conclusão e referências. Devem ter, no máximo, 3.000 palavras e até 30 referências.

### **Relato de caso**

Relata casos de uma determinada situação médica, especialmente rara e com dados novos para o leitor, descrevendo seus aspectos, história, condutas etc., incluindo breve revisão da literatura, descrição do caso e discussão pertinente. Deve ter, no máximo, 1.000 palavras e até 10 referências.

### **Revisão**

Artigos de revisão podem ser narrativas e/ou sistemáticas, incluindo avaliação crítica da literatura sobre determinado assunto, devendo descrever os procedimentos adotados bem como a delimitação e os limites do tema, além de apresentar conclusões e referências. O texto deve ter, no máximo, 3.000 palavras e até 40 referências. Todas as revisões devem ser encaminhadas somente a convite do editor.

### **Revisão de ciências básicas**

Artigos de revisão sobre temas de ciência básica cujo conhecimento tem repercussão clínica relevante. Deve ter, no máximo, 2.000 palavras e 30 referências.

### **Aprendendo por imagem**

Uma imagem patognomônica típica de ultrassonografia, tomografia computadorizada, raio X, ressonância magnética, foto de cirurgia, microscopia ou 74 sinal clínico, seguida de um texto explicativo, de, no máximo, 300 palavras e com até 10 referências.

### **Avanços médicos**

Seção destinada à publicação, nas diferentes áreas da saúde, de novidades diagnósticas e/ou terapêuticas de aplicação corrente. Discutem-se progressos já incorporados. O texto é livre e deve conter, no máximo, 1.000 palavras e 10 referências.

### **Cartas ao Editor**

Tem por objetivo comentar ou discutir trabalhos publicados na revista ou relatar pesquisas originais em andamento, achados científicos etc. Deve ter, no máximo, 150 palavras e 5 referências. As cartas ao Editor não passarão por revisão de pares e serão publicadas de acordo com a avaliação dos Editores. As normas que se seguem devem ser obedecidas para todos os tipos de trabalhos e foram baseadas no formato proposto pelo International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), publicado no artigo Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals, disponível no endereço eletrônico <http://www.icmje.org/recommendations/browse/manuscript-preparation>.

### **Requisitos técnicos**

Os autores devem submeter os artigos contendo:

- Texto digitado em espaço duplo, fonte Arial, tamanho 12, margem 2,5cm de cada lado, destacando cada seção do artigo.
- Permissão para reprodução do material e carta de transferência dos direitos autorais (disponível no sistema de submissão eletrônica).
- Declaração dos autores de que o manuscrito não está sendo avaliado e nem será submetido à publicação em outro periódico (disponível no sistema de submissão eletrônica).
- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos ou Animais da instituição onde o trabalho foi realizado, indicando número do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE; [www.saude.gov.br/plataformabrasil](http://www.saude.gov.br/plataformabrasil)).
- Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE), quando referente a artigos de pesquisa envolvendo seres humanos.
- Declaração de inexistência de conflitos de interesse de cada autor (disponível no sistema de submissão eletrônica).

Preparo do manuscrito

- Título: título do artigo, em português e inglês, que deve ser conciso, porém informativo.

- **Resumo:** resumo, em português e inglês, de não mais que 250 palavras. Para os artigos originais, devem ser estruturados (Objetivo, Métodos, Resultados, Conclusão), contendo as principais partes do trabalho e ressaltando os dados mais significativos. Para os artigos das demais seções, o resumo não deve ser estruturado.
- **Descritores:** especificar, no mínimo, cinco e, no máximo, dez descritores, em português e inglês, que definam o assunto do trabalho. Os descritores devem ser baseados nos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) publicado pela Bireme, que é uma tradução do Medical Subject Headings (MeSH), da National Library of Medicine, e está disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br>.
- **Registro na base de Ensaio Clínicos:** indicar, para os Ensaio Clínicos, o número de registro em uma base de Ensaio Clínicos, como por exemplo, <https://clinicaltrials.gov>.\*
- **Texto:** deve obedecer a estrutura exigida para cada categoria de artigo. Em todas as categorias de artigos, a citação dos autores no texto deve ser numérica e sequencial, utilizando algarismos arábicos entre parênteses e sobrescritos. As abreviaturas e siglas devem ser precedidas dos termos por extenso, quando citadas pela primeira vez no texto, e não devem ser usadas no título e no resumo. As abreviaturas nas legendas das tabelas e figuras devem ser acompanhadas de seu significado.
- **Agradecimentos:** inclui colaborações de pessoas que merecem reconhecimento, mas que não justificam sua inclusão como autor. Inserir agradecimentos por apoio financeiro, auxílio técnico etc.
- **Referências:** devem ser numeradas consecutivamente, na mesma ordem em que foram citadas no texto, e identificadas com números arábicos. A apresentação deve estar baseada no formato denominado Vancouver Style, e os títulos de periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo apresentado pela List of Journals Indexed in Index Medicus, da National Library of Medicine, disponibilizados no endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>. \* Nota importante: a Einstein (São Paulo), em apoio às políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do ICMJE, 76 reconhece a importância destas iniciativas para o registro e a divulgação internacional de informação sobre estudos clínicos e somente aceita para publicação artigos de pesquisas clínicas que tenham recebido um número de identificação em um dos Registros de Ensaio Clínicos validados pelos critérios estabelecidos pela OMS e pelo ICMJE, disponíveis no endereço <https://clinicaltrials.gov> ou no site do PubMed, no item . O número de identificação deve ser apresentado ao final do resumo.

Para todas as referências, citar todos os autores, até o sexto. Acima de seis, citar os seis primeiros, seguidos da expressão et al., conforme exemplos a seguir:

### **Artigos de periódicos impressos**

Bor-Seng-Shu E, Pedroso JL, Andrade DC, Barsottini OG, Andrade LA, Barbosa ER, et al. Transcranial sonography in Parkinson's disease. *einstein* (São Paulo). 2012;10(2):242-6. Review.

### **Artigos de periódicos eletrônicos**

Lo WC, Li W, Jones EF, Newitt DC, Kornak J, Wilmes LJ, et al. Effect of imaging parameter thresholds on MRI prediction of neoadjuvant chemotherapy response in breast cancer subtypes. *PLoS One*. 2016;11(2):e0142047.

### **Livros**

Tollesfsboll TO, editor. *Biological aging. Methods and protocols*. New Jersey: Humana Press; 2007.

### **Capítulo de livros**

Lui I, Keefe DL. Nuclear transfer methods to study aging. In: Tollesfsboll TO, editor. *Biological aging. Methods and protocols*. New Jersey: Humana Press; 2007. p.191-207.

### **Trabalhos apresentados em congressos**

Salvalaggio PR, Coelho MP, Hidalgo R, Afonso RC, Ferraz-Neto BH. Keep your eyes on the enzymes. Grading early allograft dysfunction in liver transplantation. *Liver Transpl*. 2011;17(6):S294-S294. [Presented at Joint International Congress of ILTS, ELITA, and LICAGE; 2011 Jun 22-25; Valencia, Spain].

### **Teses**

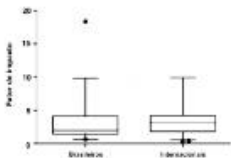
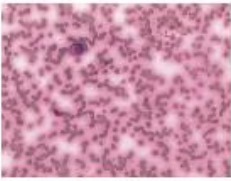
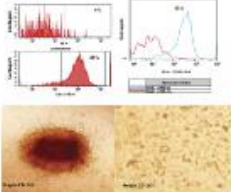
Silva RP. Aspectos genético-moleculares do sono e da privação de sono em humanos e roedores [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2013.

- Tabelas: todas as tabelas (no máximo quatro) devem ter título e cabeçalho para suas colunas e estar citadas no texto. A numeração das tabelas deve ser sequencial, em algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. No rodapé da tabela, deve constar legenda para abreviaturas e testes estatísticos utilizados.
- Figuras: todas as figuras (imagens, gráficos, fotografias e ilustrações) devem estar citadas no texto e ser submetidas no tamanho exato ou acima do



pretendido para a publicação. Serão aceitas no máximo quatro figuras por artigo. A numeração deve ser sequencial, em algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. Se as figuras já tiverem sido publicadas, deverão vir acompanhadas de autorização por escrito do autor/editor, constando, na legenda da ilustração, a fonte original de publicação. Quando gravadas em arquivos digitais, a resolução deverá seguir as seguintes instruções:

Guidelines for formatting figures

| Image Type | Description  | Example   | Recommended Format | Color mode                 | Resolution         |
|------------|--|---|--------------------|----------------------------|--------------------|
| Line art   | An image composed of lines and text, which contains no tonal or shaded areas |    | tif or eps         | Monochrome<br>1 bit or RGB | 900 to 1200<br>dpi |
| Halftone   | A continuous tone photograph containing no text                              |   | tif                | RGB or<br>Grayscale        | 300 dpi            |
| Combo      | Image contains halftone plus text or line art elements                       |  | tif or eps         | RGB or<br>Grayscale        | 500 to 900 dpi     |

Exemplo da linha de arte foi retirado de: Loureiro LV, Callegaro Filho D, Rocha Ade A, Prado BL, Mutão TS, Donnarumma Cdel C, et al. Is there publication bias towards Brazilian articles on cancer. *einstein* (São Paulo). 2013;11(1):15-22; exemplo de tonalidade média foi retirado de: Pavon LF, Marti LC, Sibov TT, Miyaki LA, Malheiros SM, Mamani JB, et al. Isolation, cultivation and characterization of CD133+ stem cells from human glioblastoma. *einstein* (São Paulo). 2012;10(2):197-202; exemplo de combo foi retirado de: Souza CL, Perini GF, Hamerschlak N, Silveira PA. Plasmacell leukemia. *einstein* (São Paulo). 2013;11(1):132. Fonte: Traduzido e adaptado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/pub/filespecimages/#fig-format>.

## **Submissão do manuscrito**

Os artigos deverão ser enviados para a revista einstein (São Paulo) pelo endereço eletrônico <http://apps.einstein.br/revista>. Todos os autores deverão, obrigatoriamente, fazer seu registro na plataforma ORCID pelo endereço <https://orcid.org/signin>.

### Instruções para submissão eletrônica

1. Prepare o artigo em formato Word (arquivo.doc), sem a identificação dos autores, que devem ser inseridos no campo do sistema. O arquivo deverá conter apenas:

- texto;
- referências;
- tabelas.

As figuras (imagens, gráficos, fotografias e ilustrações) deverão ser anexadas em campo designado no sistema.

2. Prepare a carta de submissão (cover letter), contendo:

- título completo do trabalho em português e inglês;
- nome completo dos autores e afiliação institucional;
- nome do departamento e instituição ao qual o trabalho deve ser atribuído;
- nome, endereço, fax e e-mail do autor correspondente;
- fontes de auxílio à pesquisa (se houver);
- justificativa da importância para a publicação.

3. Preencha a carta de conflitos de interesse (modelo disponível no sistema de submissão eletrônica) que deverá ser assinada por todos os autores.

4. Obtenha a carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) contendo o número CAAE.

5. Finalize, anexando:

- arquivo (.doc), contendo apenas o corpo do artigo, as referências e as tabelas, sem a identificação dos autores e da instituição, inclusive na seção Métodos;
- figuras;

- carta de submissão (cover letter);

- carta de conflitos de interesse;

- carta de aprovação no CEP.

6. Selecione no sistema:

- Declaração antiplagiarismo e das boas práticas em animais ou seres humanos, de acordo com o trabalho;

- Transferência dos direitos autorais e permissão para publicação;

7. Revise sua submissão e clique em <Salvar e prepara para envio>. Neste momento, o autor será redirecionado para o <Menu artigos> e deverá clicar na opção <Aprovar/Enviar> para finalizar a submissão do artigo.