

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

GIOVANA FANHANI TESSARO

**IMPACTO DA AUSÊNCIA DO NERVO VAGO E BAÇO SOBRE O EIXO
HEPCIDINA-FERRO EM RATOS *WISTAR* MACHOS SUBMETIDOS À NATAÇÃO
REGULAR E SUA REPERCUSSÃO SOBRE A MASSA ADIPOSA**

CASCAVEL-PR

Fevereiro/2025

GIOVANA FANHANI TESSARO

**IMPACTO DA AUSÊNCIA DO NERVO VAGO E BAÇO SOBRE O EIXO
HEPCIDINA-FERRO EM RATOS *WISTAR* MACHOS SUBMETIDOS À NATAÇÃO
REGULAR E SUA REPERCUSSÃO SOBRE A MASSA ADIPOSITIVA**

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

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

ORIENTADORA: Profa. Dra. Sabrina
Grassioli

CASCADEL-PR

Fevereiro/2025

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Documento assinado digitalmente
 GIOVANA FANHANI TESSARO
Data: 05/05/2025 10:13:06-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Assinatura: _____ Data 05/ 05 / 2025

O presente estudo foi realizado com auxílio da CAPES através do Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP) pelo Auxílio Financeiro a Projeto Educacional ou de Pesquisa (AUXPE), com processo de número 88881.594204/2020-01, com auxílio número 1359/202.

Fanhani Tessaro, Giovana

IMPACTO DA AUSÊNCIA DO NERVO VAGO E BAÇO SOBRE O EIXO HEPCIDINA-FERRO EM RATOS WISTAR MACHOS SUBMETIDOS À NATAÇÃO REGULAR E SUA REPERCUSSÃO SOBRE A MASSA ADIPOSA / Giovana Fanhani Tessaro; orientadora Sabrina Grassioli. -- Cascavel, 2025.

81 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, 2025.

1. Atividade física. 2. Adipócitos. 3. Ferro. 4. Nervo vago. I. Grassioli, Sabrina, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Giovana Fanhani Tessaro

Título: Impacto da ausência do nervo vago e baço sobre o eixo hepcidina-ferro em ratos *Wistar* machos submetidos à natação regular e sua repercussão sobre a massa adiposa

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus Cascavel, PR para obtenção do título de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde.

Aprovado em: 25/ 02 / 2025

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Sabrina Grassioli

Instituição: Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE

Assinatura: _____

Membro: Profa. Dra. Arianne Rodrigues Silva Carvalho

Instituição: Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE

Assinatura: _____

Membro: Prof. Dra. Eloá Angélica Koehnlein

Instituição: Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço e dedico este trabalho a todos que contribuíram para que pudesse ser realizado, em especial ao meu marido, Gersino, por sua incansável paciência, amor e estímulo para que pudesse me tornar mestre. Aos meus pais, Reginaldo e Márcia, por sempre fazerem o melhor para que eu pudesse ter uma educação digna.

A todos os meus colegas e amigos, que ouviram, orientaram e estimularam para que eu pudesse passar por este caminho. Em especial à minha amiga Emmily, que desde a faculdade me apoia incansavelmente.

Agradeço aos colegas de laboratório pelos infinitos ensinamentos, não somente de práticas e técnicas, mas também de vivências. Em especial à minha colega Caroline, que dividiu comigo o peso de gerenciar um projeto tão desafiador e me ensinou e me ajudou em todos os momentos.

Não poderia deixar de agradecer à instituição que me tornou profissional e agora mestre, a Unioeste, uma universidade pública, gratuita e de qualidade que luta todos os dias para educar, instruir e transformar pessoas.

Por fim, à minha orientadora, Sabrina, que entendeu minhas angústias, me ensinou e me mostrou o mundo da pesquisa experimental. Muito obrigada por sua dedicação com seus alunos, pelo seu carinho e pelo seu zelo pela educação, saiba que isso faz diferença no mundo.

Findo estes agradecimentos com o coração alegre, certa de que fiz muitos colegas e aprendi muito neste tempo. Neste caminho, existiram muitas pessoas que me ajudaram, portanto, meu eterno obrigada!

EPÍGRAFE

“É justo que muito custe o que muito vale”.

Santa Teresa D'Ávila

RESUMO

TESSARO, G. F. **Impacto da ausência do nervo vago e baço sobre o eixo hepcidina-ferro em ratos *wistar* machos submetidos à natação regular e sua repercussão sobre a massa adiposa.** 81 páginas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2025.

Introdução: O Tecido Adiposo Branco (TAB) é um território especializado em armazenar calorias na forma de triglicerídeos e produzir um conjunto de substâncias de ação parácrina e endócrina, denominadas adipocinas, as quais regulam a fome, a saciedade e o metabolismo de carboidratos e lipídios. Mais recentemente, foi demonstrado que o TAB participa da homeostase do ferro, um mineral essencial para a saúde, importante para a função mitocondrial e transporte do oxigênio aos tecidos. O principal regulador do ferro sistêmico é o hormônio peptídico hepcidina, o qual modula captação intestinal e biodisponibilidade endógena deste mineral, sendo sua secreção influenciada pela Interleucina 6 (IL6). O ferro nos adipócitos regula a adipogênese e sensibilidade à insulina, em íntima relação com o sistema imunológico. Nesse contexto, o nervo vago (NV) participa do reflexo anti-inflamatório, para o qual a presença do baço é essencial e cuja repercussão sobre a homeostase férrica é desconhecida, em especial durante o exercício físico. **Objetivo:** Avaliar o impacto da ausência do NV e do baço sobre o eixo hepcidina-ferro e sua repercussão na massa adiposa em ratos *Wistar* machos. **Métodos:** Aos 60 dias de vidas, ratos *Wistar* machos foram aleatoriamente distribuídos nos grupos conforme técnica cirúrgica: retirada do baço (esplenectomia [SPL]), secção total do NV (vagotomia subdiafragmática bilateral [SV]), associação de SPL+SV ou falsa operação (SHAM). Com 80 dias, os grupos foram subdivididos em sedentário (SD) e exercitado (EX). Exercitados nadaram 5 vezes por semana/30 minutos durante 8 semanas. Assim, formaram-se 5 grupos: SHAM-SD; SHAM-EX; SPL-EX; SV-EX; SV+SPL-EX (n=6/grupo). Aos 120 dias, os animais foram eutanasiados, o sangue total foi coletado para análise de glicose, triglicerídeos, colesterol e dosagem de ferro e hepcidina. O índice de triglicerídeos e glicose (TyG) foi calculado. Foram coletados o TAB inguinal (TAB-I) e retroperitoneal (TAB-R) para análise histológica de número e área de adipócitos. **Resultados:** O exercício não alterou o ganho de peso (p=0,1677), o crescimento (p=0,0967), as concentrações plasmáticas de glicose (p=0,7363) ou triglicerídeos (p=0,9218). Entretanto, os grupos EX apresentavam níveis elevados de colesterol total (Sham-Ex: p=0,0002; Spl-Ex: p=0,0057; Sv-Ex: p=0,0012; Sv+Spl-Ex: p=0,0082). As concentrações plasmáticas de ferro e hepcidina não foram alteradas pelo exercício (p=0,2089; p=0,0951), bem como não houve efeitos sobre o conteúdo do TAB-I. Porém, nos grupos Sv-Ex (p=0,0394; p=0,0008; p=0,0013; p=0,0001) e Sv+Spl-Ex (p=0,0497; p<0,0001; p=0,0003; p=0,0001), notou-se redução no tamanho e aumento do número de adipócitos nos depósitos de TAB-I e TAB-R em relação ao SHAM-SD. Ratos SHAM-SD apresentaram correlação positiva entre os níveis de ferro e peso do tecido (p=0,0177) e número de adipócitos (p=0,0044) do TAB-I. **Conclusão:**

Os dados indicam que a ausência de NV, especialmente com esplenectomia, favorece a redução da massa do TAB subcutâneo e visceral, diminuindo o tamanho dos adipócitos em ratos exercitados. Esses efeitos são independentes da oscilação nos níveis circulantes de ferro ou hepcidina.

Palavras-Chave: Exercício físico; adipócitos; ferro; nervo vago; esplenectomia.

ABSTRACT

TESSARO, G. F. **Vagus nerve and spleen modulates hepcidin plasma levels and white tissue mass in male Wistar rats submitted to swimming training.** 81 pages. Dissertation (Master's). Postgraduate Program in Biosciences and Health, Center for Biological and Health Sciences, Cascavel Campus, Unioeste, 2025.

Introduction: White adipose tissue (WAT) is a specialized territory for storing calories in the form of triglycerides and producing a set of paracrine and endocrine substances, called adipokines, which regulate hunger, satiety and the metabolism of carbohydrates and lipids. More recently, it has been demonstrated that WAT participates in the homeostasis of iron, a mineral essential to health, important for mitochondrial function and oxygen transport to tissues. The main regulator of systemic iron is the peptide hormone hepcidin, which modulates intestinal uptake and endogenous bioavailability of this mineral, and its secretion is influenced by Interleukin 6 (IL6). Iron in adipocytes regulates adipogenesis and insulin sensitivity, in close relationship with the immune system. In this context, the Vagus Nerve (VN) participates in the anti-inflammatory reflex, for which the presence of the spleen is essential and whose impact on iron homeostasis is unknown, especially during physical exercise. **Objective:** To evaluate the impact of the absence of the NV and spleen on the hepcidin-iron axis and its repercussions on adipose mass in male Wistar rats. **Methods:** At 60 days of age, male Wistar rats were randomly distributed into groups according to the surgical technique: spleen removal (splenectomy [SPL]), total NV section (bilateral subdiaphragmatic vagotomy [SV]), combination of SPL+SV or sham operation (SHAM). At 80 days, the groups were subdivided into sedentary (SD) and exercised (EX). Exercised rats swam 5 times a week/30 minutes for 8 weeks. Thus, 5 groups were formed: SHAM-SD; SHAM-EX; SPL-EX; SV-EX; SV+SPL-EX (n=6/group). At 120 days, the animals were euthanized, and whole blood was collected for analysis of glucose, triglycerides, cholesterol, and iron and hepcidin levels. The triglyceride and glucose index (TyG) was calculated. Inguinal (I-TAB) and retroperitoneal (R-TAB) WAT were collected for histological analysis of adipocyte number and area. **Results:** Exercise did not alter weight gain ($p=0.1677$), growth ($p=0.0967$), plasma glucose ($p=0.7363$) or triglyceride ($p=0.9218$) concentrations. However, the EX groups presented high levels of total cholesterol (Sham-Ex: $p=0.0002$; Spl-Ex: $p=0.0057$; Sv-Ex: $p=0.0012$; Sv+Spl-Ex: $p=0.0082$). Plasma concentrations of iron and hepcidin were not altered by exercise ($p=0.2089$; $p=0.0951$), and there were no effects on the content of WAT-I. However, in the Sv-Ex ($p=0.0394$; $p=0.0008$; $p=0.0013$; $p=0.0001$) and Sv+Spl-Ex ($p=0.0497$; $p<0.0001$; $p=0.0003$; $p=0.0001$) groups, a reduction in the size and an increase in the number of adipocytes in the WAT-I depots were noted. TAB-R in relation to SHAM-SD. SHAM-SD rats showed a positive correlation between iron levels and tissue weight ($p=0.0177$) and adipocyte number ($p=0.0044$) of TAB-I. **Conclusion:** The data indicate that the absence of NV, especially with splenectomy, favors the reduction of subcutaneous and visceral WAT mass, decreasing the size of adipocytes in

exercised rats. These effects are independent of the oscillation in circulating iron or hepcidin levels.

Key words: Physical exercise; adipocytes; iron; vagus nerve; splenectomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ação da hepcidina no metabolismo do ferro	26
Figura 2 – Estrutura e funções do baço	32
Figura 3 – Delineamento experimental	42
Figura 4 – Fotomicrografia representativa dos adipócitos do TAB indicando como foi realizada a mensuração de área (linha amarela) e núcleos (seta vermelha) software ImageJ	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2Fe-TF	Complexo Ferro Ligado à Transferrina
ALK2	<i>Activin Receptor-Like Kinase-2</i>
ALK3	<i>Activin Receptor-Like Kinase-3</i>
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
BPM2	Proteína Morfogenética Óssea 2
BPM6	Proteína Morfogenética Óssea 6
CCL2	Ligante de Quimiocina CC 2
CD4	<i>Cluster Of Differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster Of Differentiation 8</i>
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CNA	Comprimento naso-anal
ÇIF	Fator Inibidor de Leucemia
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CXCL5	Ligante de Quimiocina 5
DCYTB	Redutase Férrica
DMT1	Transportador De Íons Metálicos Bivalentes 1
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EPO	Eritropoietina
ERFE	Eritroferrona

ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
Fe ²⁺	Ferro Ferroso
Fe ³⁺	Ferro Férrico
FGF21	Fator de Crescimento Fibroblasto 21
FPT	Ferroportina
gp 130	Glicoproteína 130
HAMP	Peptídeo Antimicrobiano Hepcidina
Hb	Hemoglobina
HCP1	Proteína Transportadora Do Heme-1
HFE	Proteína de Hemocromatose Humana
HIF	Fator de Transcrição Hipóxia-Induzível
HIF1 α	Fator de Transcrição Induzível Por Hipóxia 1 Alfa
HIF2 α	Fator de Transcrição Induzível Por Hipóxia 2 Alfa
HIF3 α	Fator de Transcrição Induzível Por Hipóxia 3 Alfa
HMOX1	Heme-Oxigenase 1
HRG1	Proteína do Gene Responsivo ao Heme
IL	Índice de Lee
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-15	Interleucina-15
IL-18	Interleucina-18

IL-4	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IP-10	Proteína Induzível por Interferon-Gama 10
IRE	Elemento Responsivo ao Ferro
IRP	Proteína Reguladora do Ferro
LAFEM	Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
<i>MCP-1</i>	Monocyte Chemoattractant Protein-1
mg	Miligramas
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
Mtor	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NAmPT	Nicotinamida Fosfo-Robosiltransferase
Nrf2	Fator Nuclear Eritroide 2
NV	Nervo Vago
PALS	Bainha Linfoide Periarteriolar
PB	Polpa Branca
PGC1-- α	Coativador Gama 1-Alfa
pH	Potencial Hidrogeniônico
PV	Polpa Vermelha
Ras/RAF	<i>Rat Sarcoma Virus</i>

RbP4	Proteína de Ligação ao Retinol 4
RPM	Macrófagos Da Polpa Vermelha
SD	Sedentário
sFRP5	Proteína 5 Secretada Relacionada ao Frizzled
SHAM	Falsa Operação
SMAD	<i>S-Mothers Against Decapentaplegic</i>
SMAD 1	<i>S-Mothers Against Decapentaplegic 1</i>
SMAD 5	<i>S-Mothers Against Decapentaplegic 5</i>
SMAD 8	<i>S-Mothers Against Decapentaplegic 8</i>
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SPL	Esplenectomia
STAT3	Proteína Transdutora de Sinal e Ativadora de Transcrição 3
STEAP3	Antígeno Epitelial Transmembranar de Próstata 3
SV	Vagotomia Subdiafragmática Bilateral
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAB-I	Tecido Adiposo Branco Inguinal
TAB-R	Tecido Adiposo Branco Retroperitoneal
TAM	Tecido Adiposo Marrom
TfR1	Receptor De Transferrina 1
TGC	Triglicerídeos

TGF- β	Fator de Crescimento Transformador Beta
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRF2	Receptor de Transferrina 2
UNIOESTE	Universidade Estadual do Oeste do Paraná

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	23
3.1 Ferro: metabolismo e regulação no organismo	24
3.2 A relação entre baço, metabolismo do ferro e o sistema nervoso autônomo	31
3.3 Exercício físico e sua relação com a homeostasia do ferro	34
3.4 Tecido adiposo branco e ferro	36
4. MÉTODO.....	39
4.1. Animais	39
4.2. Procedimentos cirúrgicos	40
4.3. Protocolo de treinamento	41
4.4. Grupo amostral	41
4.5. Eutanásia e coleta de materiais	42
4.6. Preparo dos tecidos e processamento de dados.....	43
4.6.1. Histologia do TAB:.....	43
4.6.2. Parâmetros Bioquímicos Plasmáticos e sanguíneos	44
4.7. Análise de dados	45
5. ARTIGO.....	46
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	63
7. REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICE.....	77
ANEXO.....	80

1. INTRODUÇÃO

O ferro é um elemento abundante no corpo humano e essencial à vida (Hilton *et al.*, 2023). Sua capacidade de variar entre as formas férrica (Fe^{3+}) e ferrosa (Fe^{2+}) contribui para sua ampla utilidade no sistema biológico humano, porém, tanto seu excesso quanto deficiência são prejudiciais à saúde humana (Dutt; Hamza; Bartnikas, 2022).

A deficiência de ferro é a deficiência nutricional mais prevalente do mundo, afetando cerca de dois bilhões de pessoas, mas principalmente crianças e gestantes (WHO, 2023). Sua ocorrência e prevalência depende, em grande parte, do ambiente socioeconômico em que o indivíduo está inserido, no entanto, é uma das poucas carências nutricionais que está presente em todas as categorias sociais e em todas as faixas etárias, sendo caracterizada como um problema de saúde pública global (Nogueira-De-Almeida *et al.*, 2021; Pinto, 2008). Ingestão insuficiente de ferro, más condições de higiene e sanitárias, doenças parasitárias e processos inflamatórios frequentes, dietas ricas em cereais que contenham fitatos, polifenóis e outros ligantes que prejudicam a absorção intestinal de ferro são fatores de risco para a ocorrência de deficiência de ferro (Hunt, 2003; WHO, 2017).

A interrupção da homeostase do ferro está envolvida em uma variedade de situações patológicas. Baixas concentrações de ferro levam a funções biológicas prejudicadas, resultando em defeitos do desenvolvimento cognitivo, decaimento do estado imunológico e anemia (Ma *et al.*, 2021). Por outro lado, o excesso de ferro pode dar origem a disfunções de múltiplos órgãos, por ser redox-ativo e gerar Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) capazes de causar danos às células e órgãos, como ocorre em cardiomiopatia por sobrecarga de ferro, em diversas doenças neurodegenerativas, além de agravar o curso da doença hepática gordurosa não alcoólica (Bogdan *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2021; Zeidan *et al.*, 2021). De modo geral, as complicações que afetam e alteram o metabolismo do ferro são multifatoriais e requerem um cuidado e um olhar interdisciplinar, para estruturar medidas de controle

e iniciativas para a diminuição da prevalência de tais complicações (Nogueira-De-Almeida *et al.*, 2021).

A absorção do ferro acontece no duodeno, por meio dos enterócitos, e envolve várias etapas, mas sua liberação na circulação é estreitamente regulada pela hepcidina (Dutt; Hamza; Bartnikas, 2022; Hilton *et al.*, 2023). Apesar de importante, a absorção duodenal no ferro não é suficiente para suprir as necessidades biológicas do corpo humano. Um indivíduo adulto saudável tem entre 3 e 4mg de ferro no organismo e entre 1 e 2 mg são absorvidos no duodeno (Hsu *et al.*, 2020). A maior parte da necessidade de ferro advém da reciclagem de ferro de hemácias senescentes por meio de macrófagos da Polpa Vermelha (PV) do baço e das células de Kupffer do fígado. Essas células são capazes de reconhecer e fagocitar as hemácias senescentes e liberar o ferro, permitindo sua reutilização, caracterizando o processo de eritrofagocitose (Dutt; Hamza; Bartnikas, 2022).

A hepcidina é um hormônio peptídico, produzido principalmente pelos hepatócitos, e é o principal regulador sistêmico da homeostase do ferro, devido à sua capacidade de gerar degradação de ferroportina (FPT) e consequente redução da captação de ferro pelos enterócitos e inibição da liberação de ferro dos macrófagos do sistema reticuloendotelial e lojas esplênicas (Lewis; Williams; Eisenbarth, 2019). Alguns estudos já demonstraram que esse hormônio pode ser expresso em outros locais, como no tecido adiposo branco (TAB) e em células beta pancreáticas (Bekri *et al.*, 2006; Kulaksiz *et al.*, 2008).

O baço exerce importante papel na homeostasia do ferro, uma vez que possui os macrófagos capazes de gerar a reciclagem de hemácias senescentes (Dutt; Hamza; Bartnikas, 2022). Esse órgão é innervado pelo Sistema Nervoso Autônomo (SNA) pelas fibras simpáticas do plexo celíaco por meio dos nervos esplênicos (Moore; Dalley; Agur, 2019). Apesar de não haver inervação parassimpática direta para o baço, o Nervo Vago (NV) parece ser capaz de, indiretamente, modular a função esplênica. Segundo esses estudos, neurônios pré-ganglionares do NV são capazes de modular neurônios pós-ganglionares simpáticos do gânglio celíaco (Rosas-Ballina *et al.*, 2008; Pohanka, 2021). Em 2018, um primeiro estudo demonstrou que a estimulação α -adrenérgica no baço é capaz de aumentar a expressão de hepcidina,

gerando maior armazenamento de ferro nesse tecido (Kong *et al.*, 2018). Entretanto, se o NV pode estar envolvido nesta resposta, ainda não é conhecido.

O exercício físico é conhecido pelos seus diversos benefícios à saúde e por gerar alteração na atividade neuronal no organismo, isso devido à sua capacidade de promover redução da atividade parassimpática e aumento da atividade simpática no organismo (Kong; Gao; Chang, 2014; Azevêdo *et al.*, 2019). Interessantemente, parece haver uma conexão entre exercício físico, NV e baço, como relatado no estudo de Shimojo *et al.* (2019). Esses autores evidenciaram que o controle da inflamação pelo exercício físico é modulado pelo NV. Aditivamente, o exercício físico modula a homeostase do ferro, uma vez que pode aumentar a expressão de hepcidina, Interleucina-6 (IL-6) e alterar a absorção, armazenamento, liberação e utilização celular do ferro (Kong; Gao; Chang, 2014).

Kong *et al.* (2018) demonstraram, em seu estudo, os efeitos da estimulação α -adrenérgica no baço, no entanto, ainda não existem evidências que correlacionam à redução da atividade parassimpática gerada pelo exercício físico, menor estimulação α -adrenérgica no baço e seu possível papel na homeostasia do ferro.

O exercício físico é também capaz de modular o TAB, o principal reservatório energético corporal e produtor de mais de 600 peptídeos sinalizadores. De forma aguda e a longo prazo, o exercício físico é capaz de estimular o fluxo sanguíneo no TAB, efeitos que são primariamente mediados pela atividade simpática, e a mobilização de gordura por meio de sinais adrenérgicos e outros fatores circulantes (Thompson *et al.*, 2012).

Mais recentemente, tem-se correlacionado a homeostasia do ferro com o TAB, uma vez que este parece expressar hepcidina (Bekri *et al.*, 2006). Em contraste, Tussing-Humphreys *et al.* (2011) evidenciaram que o TAB em indivíduos obesos e magros não é capaz de liberar hepcidina *in vivo*. Interessantemente, parece haver uma correlação entre os níveis de leptina (um hormônio produzido no adipócito) e a hepcidina (Perakakis; Farr; Mantzoros, 2021; Wozniak *et al.*, 2009; Zhang; Chua, 2017). Auxiliariamente, estudos têm demonstrado que os estoques de ferro no TAB seriam capazes de modular a adipogênese e a resposta à insulina (Siqueira *et al.*, 2021; Queiroz *et al.*, 2009).

Em estudo anterior realizado pelo mesmo grupo deste estudo, foi possível demonstrar que, embora as terminações vagais não inervem diretamente os adipócitos, as interações vagais e esplênicas modulam a massa adiposa e o metabolismo, em roedores obesos e não obesos (Kuchler *et al.*, 2021). Entretanto, se esse mecanismo altera as concentrações de ferro, ainda é desconhecido.

Desse modo, estariam o NV e o baço influenciando os efeitos do exercício físico sobre a homeostase do ferro e a massa adiposa? A hipótese deste trabalho é de que as interações vagais e esplênicas são importantes para os efeitos do exercício e impactam sobre o TAB e o controle do eixo hepcidina-ferro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o impacto da ausência do nervo vago e baço sobre o eixo hepcidina-ferro e sua repercussão na massa adiposa em ratos *Wistar* machos.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar os efeitos do exercício físico sobre o metabolismo e o teor de TAB visceral e subcutâneo;
- Analisar o número e área dos adipócitos nos depósitos de TAB visceral e subcutâneo em roedores exercitados;
- Caracterizar a influência do NV e baço sobre o teor e histologia do TAB visceral e subcutâneo em ratos exercitados;
- Estabelecer se a ausência do NV e baço modifica as concentrações séricas de hepcidina e ferro;
- Avaliar se há correlação entre concentrações séricas de ferro e hepcidina e a massa adiposa.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ferro: metabolismo e regulação no organismo

O ferro é um metal essencial ao organismo, por exercer papel fundamental na homeostasia celular (Cheng *et al.*, 2022). Dentre as diferentes funções do ferro, destaca-se seu papel para a adequada oxigenação dos tecidos, uma ação que envolve o transporte de oxigênio por meio da hemoglobina e mioglobina (Guyton; Hall, 2011). Além disso, o ferro exerce controle sobre o metabolismo celular, por atuar na regulação de enzimas de cadeia fosforilativa, e, tal como a citocromo C, participa da síntese de importantes moléculas, como DNA, neurotransmissores (catecolaminas), e compõe importantes enzimas de desintoxicação, como a citocromo P450 e a catalase (Larsuphrom; Latunde-Dada, 2021; Reeder; Wilson, 2005).

Um indivíduo adulto saudável tem de 4 a 5 gramas de ferro no organismo e, destes, cerca de 65% complexados no grupo heme da proteína carreadora de oxigênio, a Hemoglobina (Hb) (Grotto, 2008; Guyton; Hall, 2011). A quantidade média necessária diariamente para homens adultos e mulheres a partir de 51 anos é de 8mg/dia e para mulheres adultas até 50 anos é de 18 mg/dia (Institute of Medicine, 2001). O ferro, por meio da alimentação, é encontrado em duas formas: orgânica (ferro heme) e inorgânica (ferro não-heme) (Roughead; Zito; Hunt, 2002). A forma orgânica é proveniente de origem animal, é mais bem absorvida, encontrada na hemoglobina e mioglobina na forma ferrosa (Fe^{2+}), e o ferro de origem inorgânica é encontrado fundamentalmente em alimentos de origem vegetal, principalmente na forma férrica (Fe^{3+}) (Carvalho *et al.*, 2006; Grotto, 2008; Roughead; Zito; Hunt, 2002).

Os mecanismos de absorção do ferro heme e não-heme são diferentes. Para ser absorvido, no intestino delgado proximal, o ferro não-heme precisa que o estômago secrete ácido clorídrico, para solubilizá-lo e então torná-lo disponível para a redução pelo ácido ascórbico e ferrireductases. O ferro não-heme é reduzido de Fe^{3+} a Fe^{2+} pelo citocromo b duodenal (DCYTB) e transportado pelo transportador de Íons metálicos bivalentes 1 (DMT1) para dentro da superfície apical dos enterócitos. Já nos enterócitos, o Fe^{2+} pode ser transportado diretamente para o plasma, pela FPT, ou ser armazenado na forma de ferritina (Dutt; Hamza; Bartnikas, 2022; Grotto, 2010).

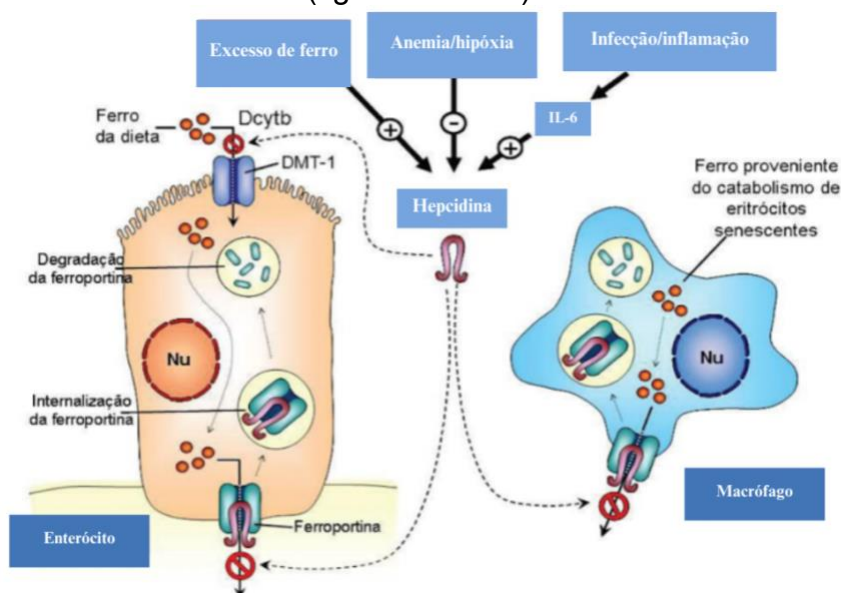
O ferro heme é uma forma prontamente biodisponível, e o pH alcalino do lúmen do intestino delgado o torna ainda mais biodisponível, além de impedir sua polimerização. No entanto, seu mecanismo de absorção no intestino ainda permanece pouco elucidado. Ao que se sabe até o momento, a proteína transportadora do heme-1 (HCP1) pode ser responsável por internalizar o ferro heme para dentro dos enterócitos na membrana apical do duodeno (Tian *et al.*, 2022). No entanto, demonstrou-se que a HCP1 transporta o folato de maneira mais eficiente que o ferro heme e questiona-se se a proteína seria um transportador (Qiu *et al.*, 2006; Shayeghi *et al.*, 2005). A proteína do gene 1 responsivo ao heme (HRG1) tem demonstrado ser um transportador para a absorção intestinal de heme (White *et al.*, 2013). Esse transportador é expresso no intestino delgado humano e poderia funcionar como internalizador de heme por meio de compartimentos endocíticos (Rajagopal *et al.*, 2008).

Uma vez que o ferro é internalizado nos enterócitos, este pode ser transportado diretamente para o plasma, pela FPT, ou ser armazenado na forma de ferritina, uma proteína capaz de potencializar o armazenamento e regulação do ferro no organismo (Ems; St Lucia; Huecker, 2023; Koleini *et al.*, 2021; Sukhbaatar; Weichhart, 2018; Tian *et al.*, 2022). No plasma, o Fe^{2+} sofre uma oxidação pela enzima hefaestina, voltando a Fe^{3+} para melhor ser transportado pela transferrina, uma proteína sérica de ligação ao ferro produzida em grande parte pelo fígado (Sukhbaatar; Weichhart, 2018). O Fe^{3+} , ao se ligar à transferrina, que possui uma estrutura com dois lóbulos (N- e C-Terminal), podendo transportar dois íons de ferro sérico por sua alta afinidade, forma um complexo que pode ser transportado e distribuído nos tecidos por meio da circulação (Haschka; Hoffmann; Weiss, 2021).

As células captam o ferro da transferrina e o internalizam por meio de endocitose mediada por receptores de transferrina (TfR1) em sua membrana (Haschka; Hoffmann; Weiss, 2021). Ao se ligar ao TfR1, a transferrina é endocitada em endossomas acidificados, gerando a dissociação do ferro do complexo TfR1-transferrina, por gerar mudança conformacional, permitindo sua liberação. O Fe^{3+} livre é reduzido a Fe^{2+} pelo antígeno epitelial transmembranar de próstata 3 (STEAP3) e pode então ser liberado do endossomo para o citoplasma pela DMT1 e ser utilizado na célula (Nemeth; Ganz, 2021; Tian *et al.*, 2022).

Apesar de essencial à vida, a absorção intestinal não excede 1 a 2 mg de ferro por dia e a necessidade diária de um organismo adulto é cerca de 25 mg (Koleini *et al.*, 2021; Wang; Babitt, 2019). A maior parte do ferro no organismo se encontra na forma de Hb e, devido à constante fagocitose e degradação de hemácias senescentes, elas se tornam uma importante fonte de ferro para o organismo (Grotto, 2010). O tempo de vida médio das hemácias é de 120 dias e, com a senescência da hemácia, ocorrem pequenas modificações em sua membrana celular, que são detectadas por macrófagos eritrofagocíticos que fagocitam essas hemácias por fagossomos que se fundem com vesículas lisossomais e as digerem, liberando heme e o exportando para o citosol pela HRG1. O acúmulo de heme no citoplasma gera a expressão da heme oxigenase 1 (HMOX1), capaz de degradar e liberar o ferro para ser armazenado pela ferritina ou exportação pela FPT (Figura 1) (Ganz, 2013; Muckenthaler *et al.*, 2017; Nemeth; Ganz, 2023; Soares; Hamza, 2016).

Figura 1 – Ação da hepcidina no metabolismo do ferro. Ao formar o complexo com a ferroportina, leva à sua degradação. No enterócito, o ferro não é transportado para o exterior da célula, e a absorção é inibida (figura à esquerda). No macrófago, o ferro fica acumulado no seu interior, diminuindo o ferro disponível para a eritropoiese (figura à direita).



Fonte: Adaptada de Grotto (2008)

Na homeostasia do ferro, percebe-se que os mecanismos que regulam a absorção e distribuição são muito bem desenvolvidos, refinados e eficazes, e os mecanismos de excreção, uma vez que esta última ocorre por meio de vias passíveis

não reguladas pelos níveis de ferro ou outros parâmetros relevantes à sua homeostase, por meio de descamação de células epiteliais intestinais, perda fisiológica de sangue ou esfoliação das células da pele. Para manter a homeostasia, pode-se controlar a absorção, importação, utilização, síntese, degradação e exportação do ferro por meio de um sistema rigoroso de regulação (Dutt; Hamza; Bartnikas, 2022; Grotto, 2010; Haschka; Hoffmann; Weiss, 2021).

O ferro é passível de regulação em dois níveis: sistêmico e celular. Existe um grupo de proteínas, chamadas proteínas reguladoras do ferro (IRE/IRP), sensíveis ao ferro, que regulam a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo da ferritina e receptores de transferrina. As IRE/IRPs regulam a expressão gênica pós-transcricional. As IREs, localizadas no mRNA, detêm uma capacidade refinada de detectar a concentração de ferro citosólico, e servem como sítios de ligação para as IRPs, localizadas na região não traduzida dos transcritos de mRNA, e são responsáveis por codificar as subunidades H e L da ferritina e do TRF1, permitindo que as células estoquem com agilidade o ferro citosólico (Vogt *et al.*, 2021).

A FPT pode também ser regulada por outras condições intracelulares, além do sistema IRE/IRP, como a regulação por ferro via fator 2 relacionado ao fator nuclear eritroide 2 (Nrf2), que aumenta ferro celular e expressão de FPT. O sistema HIF dos enterócitos em baixos níveis de hepcidina ativam o HIF2 α e aumentam ainda mais a transcrição de FPT, dentre outros mecanismos independentes de hepcidina (Nemeth; Ganz, 2021).

A regulação sistêmica do ferro é regulada por meio do eixo hepcidina/FPT. A FPT é composta por 12 domínios transmembranas, dividida em dois lóbulos conectados por uma grande alça citoplasmática, que desempenha função essencial na liberação do ferro por enterócitos, hepatócitos e macrófagos (Vogt *et al.*, 2021). Como a FPT é composta por 2 lóbulos, pode haver mudança conformacional para dois estados diferentes: no primeiro estado, a sua cavidade central fica voltada para o meio intracelular, de modo que fique inacessível para fora, e, no segundo estado conformacional, a cavidade central fica voltada para o espaço extracelular e não mais acessível ao meio intracelular (Vogt *et al.*, 2021; Wang; Babitt, 2019).

Para manter a homeostasia do ferro, a expressão de FPT é rigidamente controlada pela hepcidina circulante (Wang; Babitt, 2019). A hepcidina é um hormônio

peptídico de 25 aminoácidos produzida e secretada pelos hepatócitos no fígado e foi isolada a primeira vez na urina e no plasma baseada em sua semelhança estrutural com peptídeos antimicrobianos (Krause *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001; Sangkhae; Nemeth, 2017). Seu papel na regulação do ferro foi sugerido por Pigeon *et al.* (2001), quando relataram a superexpressão de hepcidina durante sobrecarga de ferro em camundongos.

A hepcidina regula negativamente a FPT de duas maneiras: por oclusão da cavidade central e por endocitose seguida de degradação (Sangkhae; Nemeth, 2017; Wunderer *et al.*, 2020). Na regulação por oclusão, a hepcidina se liga à FPT em sua cavidade central entre os domínios N e C, agindo como uma rolha molecular e impedindo sua mudança conformacional (Billesbølle *et al.*, 2020). Na regulação por endocitose, a hepcidina se liga à FPT e gera uma mudança conformacional, desencadeando a ubiquitinação do segmento citoplasmático rico em lisina que conecta os dois domínios de 6 hélices. A FPT então ubiquitinada é direcionada aos lisossomos das células para sua degradação (Qiao *et al.*, 2012; Ross *et al.*, 2012).

O fígado orchestra a homeostasia sistêmica do ferro por produzir e secretar a hepcidina (Rajagopal *et al.*, 2008). Sob condições normais, a hepcidina é secretada dos hepatócitos e se liga à FPT, permitindo a internalização do ferro e sua degradação nos enterócitos, impedindo a absorção de ferro pelo intestino e a liberação do ferro pelos macrófagos pela sua reciclagem (Koleini *et al.*, 2021). Em situações de deficiência de ferro, a produção de hepcidina é reduzida para aumentar a quantidade de ferro quando necessário para desenvolver suas funções vitais. No entanto, sua produção é induzida quando há sobrecarga de ferro, inflamação e outras situações, a fim de evitar a toxicidade gerada pelo excesso de ferro (Wang; Babitt, 2019).

A expressão do gene que codifica a hepcidina (*HAMP*) é regulada a nível transcricional. Os principais reguladores sistêmicos da hepcidina são as reservas hepáticas do ferro, inflamação sistêmica principalmente relacionada à IL-6, atividade eritropoiética, e as concentrações plasmáticas do ferro pela interação entre transferrina diférica e os receptores de transferrina TRF1 e TRF2 no fígado (Wunderer *et al.*, 2020). No entanto, as alterações agudas do ferro plasmático e as alterações do ferro tecidual são os 2 principais sinais que regulam a síntese de hepcidina pelos

hepatócitos por meio da ativação da cascata de sinalização da proteína morfogenética óssea 6 (BMP-SMAD) (Sangkhae; Nemeth, 2017; Wang; Babitt, 2019).

A regulação apropriada da hepcidina depende da capacidade do fígado de detectar o ferro tecidual e plasmático, nos meios intra e extracelular, e transmitir esses sinais ao núcleo dos hepatócitos, onde a hepcidina é expressa. Os receptores de transferrina de hepatócitos TRF1 e TRF2 e a proteína de hemocromatose humana (HFE) são os detectores do ferro extracelular, sinalizando especificamente as concentrações circulantes de ferro ligado à transferrina (2Fe-TF) (Sangkhae; Nemeth, 2017). Quando há aumento das concentrações circulantes de 2Fe-TF, o HFE se desloca do TRF1 e interage com receptor de BMP tipo I ALK3, estabilizando-o e impedindo sua ubiquitinação e degradação proteossomal, gerando aumento da expressão de ALK3 na superfície celular e modulando a sinalização da cascata BMP-SMAD (Wang; Babitt, 2019).

O sistema de sinalização da BMP-SMAD é a principal via de expressão da hepcidina em nível aumentado de ferro (Wunderer *et al.*, 2020). As células endoteliais do fígado têm a capacidade de aumentar a expressão dos ligantes BMP2 e BMP6. Esses ligantes se unem com receptores de proteína morfogenética óssea (BMP) do tipo II (ALK2 e ALK3) que fosforilam os receptores BMP do tipo I (ACR2A e BMPR2), capazes de fosforilar as proteínas SMAD 1, 5 e 8. As proteínas SMAD fosforiladas se ligam a um mediador comum chamado SMAD4, translocando-se para o núcleo, capazes de se ligarem a 2 elementos específicos promotores de hepcidina, induzindo sua transcrição (Wang; Babitt, 2019).

A inflamação, em particular a IL-6, também regula positivamente a hepcidina. Isso porque a redução do ferro circulante disponível age como um protetor contra algumas infecções, visto que todo organismo requer ferro para sua replicação e funções biológicas (Sangkhae; Nemeth, 2017; Wang; Babitt, 2019). Durante uma infecção ou inflamação, macrófagos liberam IL-6, que se liga à glicoproteína 130 (GP 130), gerando uma fosforilação no fator de transcrição STAT3, ativando-o e se translocando para o núcleo do hepatócito, ligando-se ao elemento responsivo ao STAT3 promotor da hepcidina, gerando a indução da transcrição de *HAMP* (Vogt *et al.*, 2021). A hepcidina na inflamação e infecção age como um mediador-chave na hipoferremia e anemia da inflamação, uma vez que seu aumento gera sequestro do

ferro pelos macrófagos esplênicos e hepáticos, bem como nos enterócitos duodenais, diminuindo o nível circulante de ferro no organismo. No entanto, se a inflamação e/ou infecção tornar-se crônica, pode ocorrer o aparecimento da anemia de inflamação, caracterizada pela redução na quantidade de ferro sérico e transferrina, baixa contagem de reticulócito, mas níveis normais ou elevados de ferritina (Sangkhae; Nemeth, 2017).

Existem também reguladores negativos da hepcidina, como a hipóxia, perda de sangue, eritropoiese e outras causas (Li *et al.*, 2020). O ferro desempenha uma função essencial na eritropoiese, durante o processo de formação e maturação dos glóbulos vermelhos (Li *et al.*, 2020; Rishi; Wallace; Subramaniam, 2015). Uma das principais moléculas sinalizadora e mediadora da eritropoiese é a eritropoetina (EPO), que é secretada pelo rim, regulada pelo ferro e detém a capacidade de controlar a absorção de ferro, a proliferação celular, maturação e sobrevivência de células progenitoras eritroides (Camaschella; Nai; Silvestri, 2020; Li *et al.*, 2020; Vogt *et al.*, 2021). Quando em deficiência de ferro, a EPO é capaz de estimular a eritroferona (ERFE), uma proteína solúvel capaz de diminuir a expressão de hepcidina por supressão de genes-alvo da via BMP/SMAD nos hepatócitos do fígado, bem como estimular a absorção de ferro nos enterócitos e a liberação de macrófagos recicladores de hemácias (Li *et al.*, 2020; Vogt *et al.*, 2021).

Em situações de hipóxia, há a estabilização das subunidades HIF1 α , HIF2 α e HIF3 α do fator de transcrição hipóxia-induzível (HIF) que regulam os genes-alvos específicos da hipóxia, como a EPO, suprimindo a via BMP/SMAD, gerando aumento da demanda de ferro e redução da expressão da hepcidina (Li *et al.*, 2020; Rishi; Wallace; Subramaniam, 2015).

Além dos reguladores positivos e negativos já citados, outros estímulos e vias podem regular a produção de hepcidina, como fatores de crescimento (fator de crescimento epidérmico e fator de crescimento de hepatócitos), hormônios (progesterona, testosterona e estrogênio), estresse do retículo endoplasmático e vias de sinalização Ras/RAF, MAPK e Mtor, pois muitos desses mediadores interagem com a via BMP-SMAD (Canali *et al.*, 2016; Core; Canali; Babitt, 2014; Goodnough *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015; Wang; Babitt, 2019).

3.2 A relação entre baço, metabolismo do ferro e o sistema nervoso autônomo

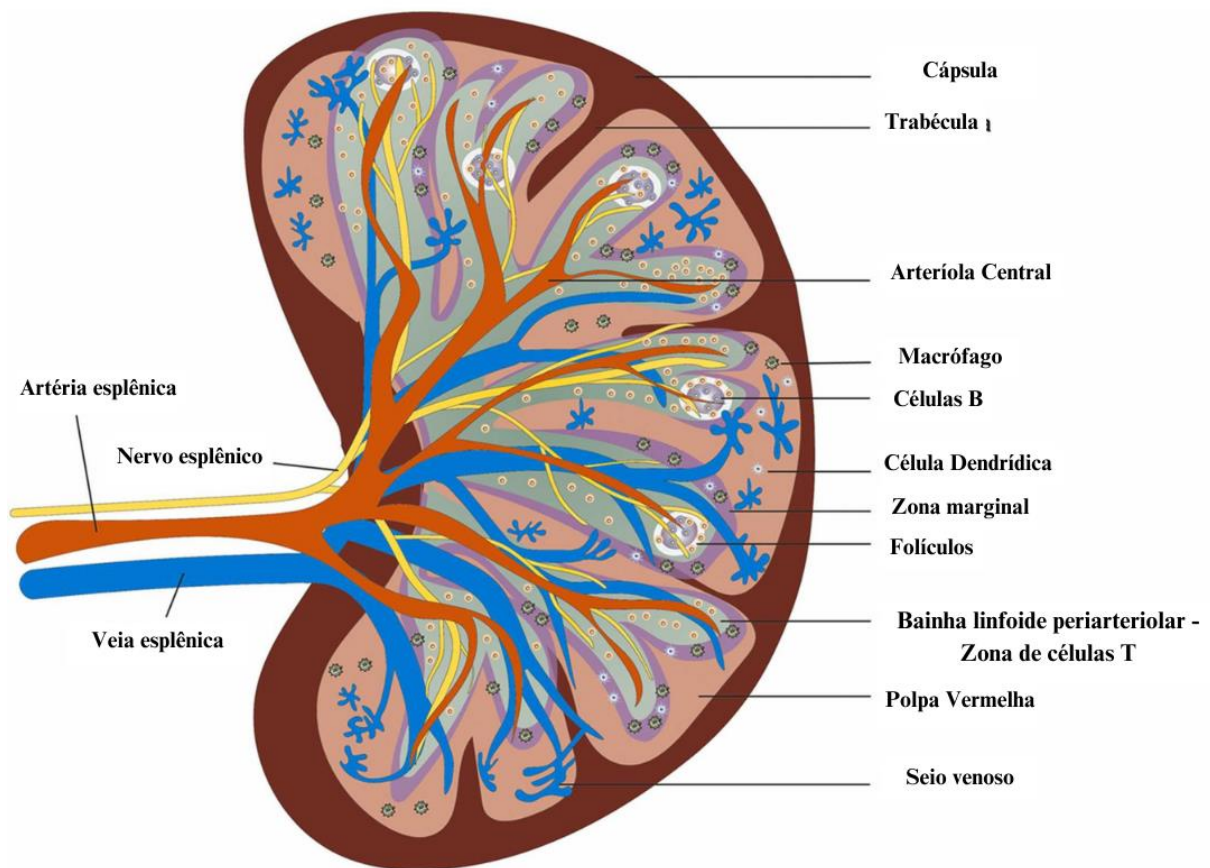
O baço é um importante órgão imunológico no corpo e é o principal biodisponibilizador de ferro, visto que uma de suas funções é a filtração de glóbulos vermelhos senescentes e a reciclagem do ferro (Lewis; Williams; Eisenbarth, 2019; Vogt *et al.*, 2021; Wei *et al.*, 2022). Além disso, o baço também controla o metabolismo de outros metais e, mais recentemente, tem-se observado sua participação no metabolismo lipídico, mas o conhecimento sobre isso ainda é limitado. Ao que se sabe, o baço é capaz de interferir na evolução de algumas doenças associadas a distúrbios lipídicos por meio dos lisossomos das células do sistema fagocítico mononuclear (Ai *et al.*, 2018).

Do mesmo modo, o baço também está envolvido no aparecimento de situações patológicas, como resistência à insulina, obesidade, síndrome metabólica e doenças imunes, bem como em sua prevenção. Estudo de Wu *et al.* (2014) demonstrou, por meio de procedimento cirúrgico de esplenectomia, que o baço está envolvido na modulação do equilíbrio imunológico, por suportar um conjunto de células B do tipo inato que, no TAB, especialmente no visceral, produzem grandes quantidades de IL-10, gerando um ambiente anti-inflamatório e protegendo contra a resistência à insulina associada à obesidade. Por outro lado, na obesidade, o cenário metabólico e imunológico muda completamente, de tal modo que o recrutamento de células B esplênicas inatas, por sua atividade anti-inflamatória, não é suficiente para neutralizar o aumento da inflamação e o desenvolvimento de resistência à insulina (Lori *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2014).

Como demonstrado na figura 2, histologicamente, o baço é dividido em PV, Polpa Branca (PB) e zona marginal. A PV do baço é uma região conhecida por sua circulação aberta, rica em eritrócitos e responsável por filtrar o sangue circulante, reter as células sanguíneas senescentes ou danificadas e manter o metabolismo do ferro (Lewis; Williams; Eisenbarth, 2019; Wei *et al.*, 2022). A PB é composta por duas subunidades: a bainha linfóide periarteriolar (PALS) na zona de células T e os folículos

nas zonas de células B, ambas comprometidas com a imunidade adaptativa. Entre essas duas áreas, encontra-se a zona marginal, uma importante área de trânsito que facilita a movimentação das células entre a corrente sanguínea e a PV e PB (Nagelkerke *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2022).

Figura 2 – Estrutura e funções do baço. O baço é um importante órgão imunológico do corpo. Histologicamente, o baço é composto principalmente de polpa vermelha (PV), polpa branca (PB) e zona marginal (ZM).



Fonte: Adaptada de Wei *et al.* (2022)

Na PV, existem os chamados macrófagos da polpa vermelha (RPM) ou também chamados de macrófagos do sistema reticuloendotelial, responsáveis por reconhecerem as hemácias senescentes, as captarem por eritrofagocitose, extraírem e armazenarem o ferro decorrentes dessas células, caracterizando a função do baço na homeostasia e biodisponibilidade deste elemento (Lewis; Williams; Eisenbarth, 2019; Vogt *et al.*, 2021; Wei *et al.*, 2022).

O baço é innervado pelo SNA pelas fibras simpáticas do plexo celíaco por meio dos nervos esplênicos (Moore; Dalley; Agur, 2019). Kong *et al.* (2018) demonstraram que a estimulação α -adrenérgica no baço é capaz de aumentar a expressão de hepcidina, gerando maior armazenamento de ferro nesse tecido.

Apesar de não haver innervação parassimpática no baço, já tem se demonstrado que pode haver atividade vagal controlando indiretamente a atividade esplênica por meio da modulação de neurônios pré-ganglionares simpáticos do gânglio celíaco (Pohanka, 2021). Em 2008, Rosas-Ballina *et al.* (2008) sugeriram que há uma conexão entre o cérebro e o baço, na qual o cérebro transmite informações ao nervo esplênico por meio do NV, que então atinge o órgão terminal e se comunica com o baço, e Mihaylova *et al.* (2014) observaram que a vagotomia reduz a resposta imunológica esplênica.

O NV é o principal elemento da innervação parassimpática em órgãos abdominais, tendo ampla distribuição e possuindo um conjunto de fibras aferentes sensoriais, viscerais e somáticas, que conduzem sinais importantes sobre metabolismo, inflamação e função visceral ao SNC, além de fibras eferentes pré-ganglionares e pós-ganglionares que conduzem respostas motoras e secretoras essenciais ao controle da homeostase (Browning; Verheijden; Boeckxstaens, 2017; Nakamura *et al.*, 2015). Desse modo, o NV exerce papel crucial na manutenção da homeostase corporal e energética, por suas funções relacionadas à digestão, saciedade, respiração, pressão arterial e controle da frequência cardíaca (Kupari *et al.*, 2019). Adicionalmente, o NV é capaz de influenciar o sistema imunológico, atuando na interface imunometabólica e tendo impacto sobre a saúde (Kressel *et al.*, 2020; Pavlov; Chavan; Tracey, 2018).

Nesse contexto, o NV participa do denominado reflexo anti-inflamatório vagal, para o qual a presença do baço é indispensável. Até o momento, há indicação de que o ramo aferente vagal é capaz de detectar sinais pró-inflamatórios do baço e de outros órgãos periféricos, os quais são conduzidos ao SNC e resultam na ativação do ramo eferente vagal, o qual, via comandos anti-inflamatórios colinérgicos, modula a produção de substâncias inflamatórias no território esplênico. Assim, os sinais anti-inflamatórios atuam no baço por meio do nervo esplênico, moderando a ativação

imune e impedindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Kressel *et al.*, 2020; Pavlov; Chavan; Tracey, 2018; Pavlov; Tracey, 2012; Rosas-Ballina; Tracey, 2009).

Ainda, parece haver um papel do NV e do exercício físico na atividade esplênica. Shimojo *et al.* (2019) demonstraram que atividade física reduziu em até 40% a produção de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), uma citocina pró-inflamatória, no baço, e que a vagotomia subdiafragmática impediu o controle do exercício físico nos níveis séricos de TNF- α , evidenciando que o controle da inflamação pelo exercício físico é modulado pelo NV.

No entanto, ainda não existem dados na literatura correlacionando o possível papel do NV no baço e dos efeitos moduladores do exercício físico com a homeostasia do ferro.

3.3 Exercício físico e sua relação com a homeostasia do ferro

Os efeitos do exercício físico para a saúde são indiscutíveis e reconhecidos desde o início da civilização antiga (Rueggsegger; Booth, 2018). Destacam-se a melhora da aptidão física e cardiorrespiratória, da saúde mental, da força muscular, além de prevenir o desenvolvimento de transtornos mentais (como a depressão, estresse e ansiedade incidente), diabetes, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, doença hepática gordurosa não alcoólica, mortalidade por todas as causas na população geral e promover perda de peso, homeostase insulínica e do perfil lipídico, dentre tantos outros efeitos (Lindgren; Börjesson, 2021).

Durante o exercício físico, as fibras musculares podem liberar diversas miocinas, como fator neutrófico derivado do cérebro (BDNF), fator inibidor de leucemia (LIF), fator de crescimento fibroblasto 21 (FGF21), fator de transcrição PGC1- α , IL-6, IL-8, IL-15 e aumentar a liberação de componentes em outros tecidos, como o aumento da liberação de adrenalina, cortisol, hormônios do crescimento, prolactina, IL-1, IL-10 (Belanger; Rao; Robbins, 2022; Pedersen, 2009).

Nesse sentido, chama-se a atenção para IL-6, uma vez que sua produção acentua-se durante o exercício físico, podendo aumentar até 100 vezes, e alcança seu nível máximo ao final ou logo após o treinamento, para aumentar a captação de glicose e oxidação de gordura no tecido muscular, seguido por uma rápida diminuição, retornando aos níveis pré-exercício (Pedersen, 2009). Banzet *et al.* (2012) demonstraram, em seu estudo, que a IL-6 estimula a expressão de hepcidina nos hepatócitos e posterior liberação na circulação, também demonstrado por Skarpańska-Stejnborn *et al.* (2015).

A IL-6 é uma citocina que parece contribuir para a perda de gordura abdominal mediante o exercício físico. Em um estudo randomizado de 2019, adultos com obesidade abdominal receberam o anticorpo do receptor de IL-6 (tocilizumabe) ou placebo durante 12 semanas de intervenção, com e sem ciclismo; observaram que a redução da adiposidade visceral obtida pelo ciclismo foi anulada no grupo que recebeu a tocilizumabe, indicando o papel da IL-6 na gordura visceral (Wedell-Neergaard *et al.*, 2019).

O exercício físico parece exercer papel importante na homeostasia do ferro, uma vez que pode aumentar os níveis circulantes de hepcidina, IL-6, alterar a absorção intestinal do ferro, o armazenamento, a liberação e utilização pelas células (Kong; Gao; Chang, 2014).

Quando a demanda de ferro aumenta no organismo, há redução da expressão de hepcidina e consequente liberação do ferro armazenado nos órgãos e tecidos. O exercício físico é capaz de gerar aumento da expressão do receptor de transferrina (TfR) em eritroblastos, aumentando a atividade eritropoiética da medula (Kong; Gao; Chang, 2014; Qian *et al.*, 1999).

Apesar de o exercício físico aumentar a atividade eritropoiética da medula, os níveis de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito diminuem significativamente após treinamento intenso (Kong; Gao; Chang, 2014). Isso pode ocorrer por duas situações: 1- redução da absorção intestinal do ferro, demonstrada por Kong, Gao e Chang (2014) em seu estudo que observou que o exercício físico diminui a expressão de DMT1 duodenal, HCP1 e FPT em roedores submetidos a exercício físico extenuante; e 2- pela redução da exportação do ferro de hepatócitos e macrófagos pelo aumento

da hepcidina, que gera degradação de FPT, internalizando o ferro nessas células (Kong; Gao; Chang, 2014; Liu *et al.*, 2011).

O exercício físico também é capaz de promover alteração na atividade parassimpática e simpática no organismo (Krieger; Brum; Negrão, 1999). Isso acontece porque o exercício físico estimula mecanismos neurais nas áreas subcorticais e no córtex cerebral já no início da contração muscular. Quando a contração acontece, o metaborreflexo (reflexo formado por fibras sensoriais aferentes do grupo III que percebem a deformação mecânica da musculatura e por fibras do grupo IV sensíveis a mudanças metabólicas) é ativado promovendo redução da atividade parassimpática e aumento da atividade simpática no organismo. Com o aumento da intensidade do exercício, há maior produção e acúmulo de metabólitos no músculo, estimulando ainda mais a atividade nervosa simpática (Azevêdo *et al.*, 2019).

Já está bem estabelecido que o exercício físico leva a um aumento na expressão de hepcidina seguido de uma menor absorção intestinal e maior armazenamento do ferro (Larsuphrom; Latunde-Dada, 2021). Como relatado por Kong *et al.* (2018), a estimulação α -adrenérgica no baço é capaz de aumentar a expressão de hepcidina, gerando maior armazenamento de ferro nesse tecido. No entanto, ainda não existem evidências correlacionadas à redução da atividade parassimpática gerada pelo exercício físico, em especial a participação do NV e a menor estimulação α -adrenérgica no baço e seu possível papel na homeostasia do ferro.

3.4 Tecido adiposo branco e ferro

O TAB é conhecido por ser reservatório energético corporal, isolante térmico e, mais recentemente, por suas funções endócrinas (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2007). É constituído por células especializadas na manipulação e armazenamento de lipídios sob a forma de triglicerídeos (TGC) (Sakers *et al.*, 2022).

Em adultos de peso normal, o TAB representa de 15 a 20% do peso corporal no homem e de 20 a 25% na mulher, e se organiza em depósitos discretos no corpo. Classicamente, o TAB pode ser dividido em subcutâneo e visceral, de acúmulo na parte superior do corpo (depósito abdominal) ou na parte inferior do corpo (depósito glúteo-femoral) com diferentes relações com a saúde do indivíduo (Junqueira; Carneiro, 2013; Sakers *et al.*, 2022).

Apesar de 80 a 90% do volume do TAB ser constituído por adipócitos, existem diversos outros tipos de células que o compõem, como células endoteliais, precursores de adipócitos semelhantes a fibroblasto, macrófagos, células T (CD4, CD8), células B, células T natural killer, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, entre outras (Caslin *et al.*, 2020; Thompson *et al.*, 2012).

A função endócrina do TAB advém da liberação de adipocinas, substâncias bioativas, que possuem propriedades sinalizadoras e mediadoras no metabolismo, capazes de gerar comunicação com outros órgãos e tecidos, como fígado, coração, cérebro, músculo esquelético e outros (Lehr *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2022; Sakers *et al.*, 2022). Ao que se sabe até o momento, tanto os adipócitos quanto as células imunes no TAB liberam mais de 600 fatores secretores, podendo exercer ação anti-inflamatória ou pró-inflamatória (Ouchi *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2022; Ruggiero; Key; Kavanagh, 2021; Sakers *et al.*, 2022).

Dentre as adipocinas pró-inflamatórias, encontram-se a leptina, TNF, IL-6, resistina, proteína de ligação ao retinol 4 (RbP4), lipocalina 2, IL-18, proteína semelhante à angiopoietina 2 (ANGPTL2), ligante de quimiocina CC 2 (CCL2), CXC-quimiocina ligante 5 (CXCL5), nicotinamida fosforibosiltransferase (NA⁺MP⁺T) e outras que têm sua produção aumentada na obesidade, favorecendo o desenvolvimento de um estado inflamatório crônico (Ouchi *et al.*, 2011). Já as adipocinas com ação anti-inflamatória são a IL-4, IL-10, TGF- β e a proteína 5 secretada relacionada ao frizzled (sFRP5). Além disso, algumas adipocinas podem exercer ação quimiotática com IL-8, MCP-1, proteína induzível por interferon-gama 10 (IP-10) e ação semelhantes a hormônios, como a leptina, resistina, adiponectina, apelina, visfatina, omentina, vaspina, adipsina, angiopoietina e hepcidina (Ouchi *et al.*, 2011; Wozniak *et al.*, 2009).

O TAB parece expressar hepcidina, no entanto, a literatura é contraditória quanto a isso. Bekri *et al.* (2006) observou em seu estudo que a hepcidina foi expressa

não apenas no fígado, mas também no TAB. Adicionalmente, foi demonstrado que a expressão gênica da hepcidina foi aumentada em pacientes obesos. Por outro lado, Tussing-Humphreys *et al.* (2011) mostraram que o TAB em indivíduos obesos e magros não é capaz de liberar hepcidina *in vivo*.

A leptina é secretada predominantemente pelo tecido adiposo e tem como função a regulação do comportamento alimentar, do peso corporal e dos estoques de gordura por ação hipotalâmica (Perakakis; Farr; Mantzoros, 2021; Wozniak *et al.*, 2009; Zhang; Chua, 2017) e é capaz, também, de influenciar a hepcidina. Assim, estudo realizado por Chung *et al.* (2007) demonstrou que a leptina pode regular diretamente a expressão hepática de hepcidina e, consequentemente, promover a diminuição da absorção duodenal de ferro.

O conteúdo e função do TAB é também modulado pelos ramos autonômicos. O sistema nervoso simpático (SNS) exerce um papel importante nesse tecido, especialmente em situações de estresse, exercício físico e controle do metabolismo energético (Messina *et al.*, 2017). Isso acontece por meio da ação de neurotransmissores, como a noradrenalina, que regulam a lipólise, a quebra de triglicerídeos armazenados em ácidos graxos livres e glicerol, permitindo seu uso como fonte de energia para outros tecidos. Por outro lado, o sistema nervoso parassimpático, por não inervar diretamente os adipócitos, exerce efeitos indiretos que dependem da sua capacidade de modular a insulina e a inflamação. Nesse contexto, o NV parece influenciar, via aferente, a atividade simpática para o TAB e, via insulina, estimular a adipogênese e lipogênese. Além disso, por modular a resposta inflamatória, pode influenciar a função do TAB (Kuchler *et al.*, 2021; Seoane-Collazo *et al.*, 2015).

O exercício físico é amplamente conhecido por alterar a fisiologia do TAB, isso porque gera aumento do gasto energético e demanda energética, capaz de modular o SNA e induzir a lipólise de TGC e liberação de ácidos graxos para o processo de β -oxidação e queima de gordura para geração de energia (Atakan *et al.*, 2021; Thompson *et al.*, 2012). Uma vez que o exercício físico modula o SNA e gera respostas diretas ao TAB, qual seria o papel desses componentes na modulação da homeostase do ferro?

4. MÉTODO

Trata-se de uma pesquisa experimental básica, de abordagem quantitativa, realizada na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) *campus* de Cascavel/Paraná. Este estudo é um recorte de um projeto maior, intitulado “A participação esplênica e vagal nos efeitos anti-obesidade do exercício físico: um possível papel na homeostase do ferro”. Este projeto guarda-chuva engloba animais sedentários e exercitados, no entanto, para este estudo serão apresentados apenas dados dos animais exercitados.

4.1. Animais

Neste estudo, foram utilizados ratos *Wistar* machos com 60 dias de vida, submetidos a ablação cirúrgica no NV e/ou baço, associado ou não ao treinamento de natação, aqui intitulado como exercício, conforme protocolos descritos a seguir.

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UNIOESTE pelo protocolo de n.º 16-22, conforme exigência do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Ratos *Wistar* machos com 50 dias de vida foram obtidos do Biotério Central da Unioeste e transferidos para o Biotério setorial do Laboratório de Fisiologia e Metabolismo Endócrino (LAFEM), onde foram aclimatados e mantidos sob condições controladas de luminosidade (12h claro-escuro) e temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) em gaiolas forradas com maravalha, onde receberam *ad libitum* ração (Supralab®, Brasil) própria para roedores e água potável proveniente da torneira.

4.2. Procedimentos cirúrgicos

Aos 60 dias de vida, ratos machos (n=30) foram submetidos à esplenectomia (SPL), conforme protocolo de Gotoh *et al.* (2012) e/ou a Vagotomia Subdiafragmática Bilateral (SV), conforme proposto por Kiba *et al.* (1996) e adaptado por Balbo *et al.* (2007). Controles cirúrgicos passaram por falsa operação (SHAM).

Para serem submetidos à cirurgia, os animais ficaram em jejum prévio de 12 horas e foram anestesiados com isoflurano (1%), sob oxigênio a 1 mL/min em máscara e ventilação espontânea adaptada para roedores. O campo cirúrgico foi preparado com a tricotomização e antissepsia local com gluconato de clorexidina na cavidade abdominal aberta.

Para a SV, o fígado foi afastado para expor o esôfago. Os ramos anteriores e posteriores do NV foram afastados da parede de esôfago, seccionados, e as extremidades foram amarradas com fio cirúrgico, conforme protocolo de Kiba *et al.* (1996) com adaptações de Balbo *et al.* (2007).

Nos animais selecionados para a SPL, estes foram anestesiados, e então realizada uma incisão ventral (± 2 cm) logo abaixo do esterno. O baço foi localizado e exposto, os vasos sanguíneos foram laqueados com fio cirúrgico e o órgão foi retirado e pesado, conforme proposto por Gotoh *et al.* (2012). Após os procedimentos, as paredes musculares e a pele foram fechadas por pontos contínuos.

Os animais controles cirúrgicos que passaram por SHAM foram anestesiados, os órgãos e nervos manipulados, porém, não seccionados e então as aberturas foram fechadas por fios cirúrgicos.

Todos os animais operados foram transferidos para caixas individuais, tendo livre acesso a água e ração por 1 semana. Foi administrada dipirona em gota nas primeiras 24h para alívio da dor. Após a primeira semana do pós-cirúrgico, os animais foram reagrupados conforme grupo experimental até o fim do experimento.

4.3. Protocolo de treinamento

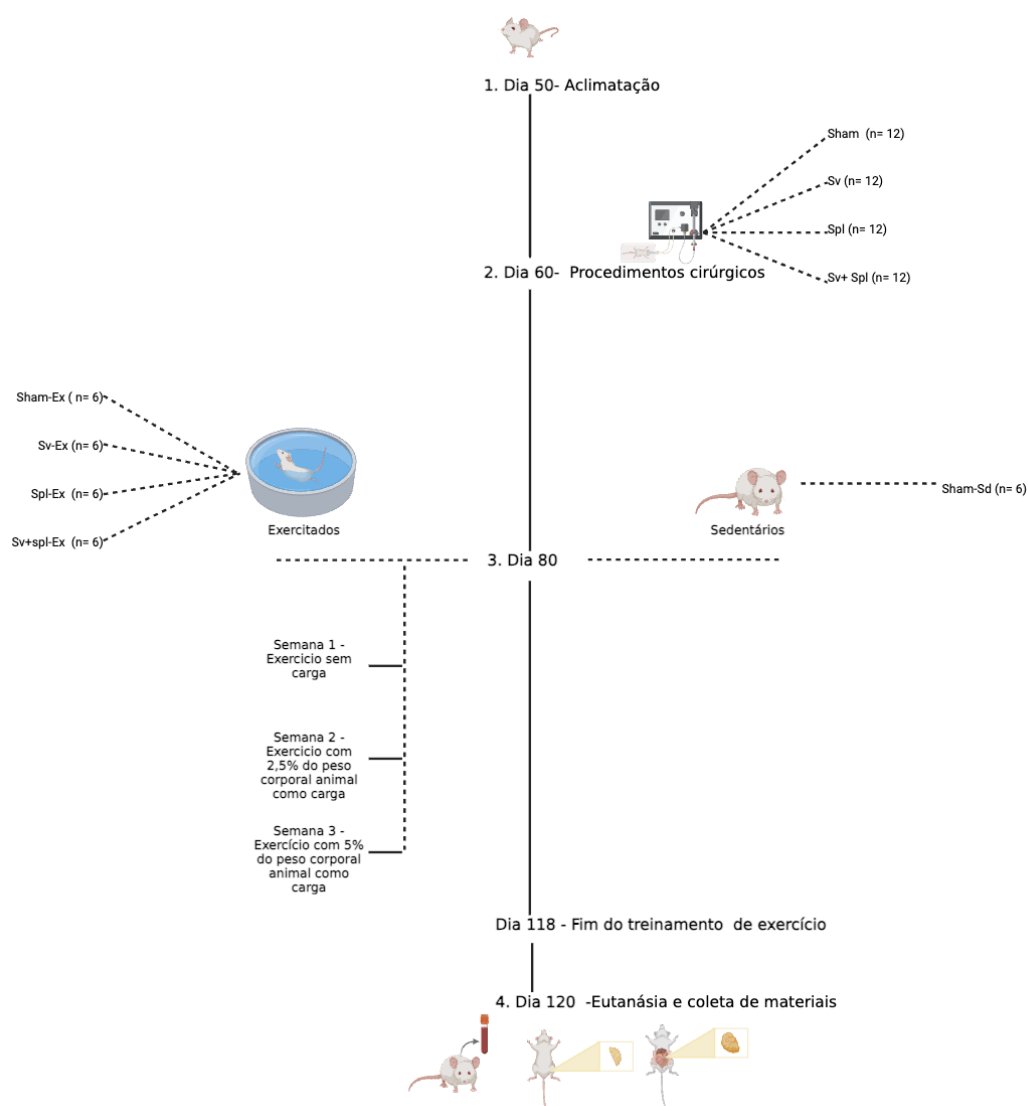
Aos 80 dias de vida, os animais foram aleatoriamente distribuídos em exercitados (EX) ou sedentários (SD). Os animais do grupo EX foram submetidos ao protocolo de natação (5 vezes/semana/30min) em piscina aquecida (34°C) durante 40 dias. Os animais SD não fizeram nenhum exercício, apenas atividades de mobilidade/deambulação espontânea.

Na primeira semana, os animais EX foram submetidos a um programa de adaptação ao meio aquático, que consiste em natação livre de carga por 30 minutos. A partir da segunda semana, houve uma carga progressiva presa à cauda do animal, inicialmente equivalente a 2,5% do peso corporal e, após adaptação, 5% do peso corporal. Ao final de cada sessão, os animais foram secos e devolvidos ao biotério.

4.4. Grupo amostral

Considerando os procedimentos cirúrgicos e o exercício, foram formados 5 grupos experimentais (n=6/ratos por grupo), como demonstrado na Figura 3.

Figura 3 – Delineamento Experimental. A linha do tempo mostra as intervenções ao longo da vida do animal: 1. Período de aclimação de 50 a 60 dias de vida pós-natal; 2. Procedimentos cirúrgicos (Dia 60): Ratos submetidos à falsa operação (Sham); Ratos submetidos à vagotomia subdiafragmática bilateral (SV); Ratos submetidos à esplenectomia (Spl); Ratos submetidos à vagotomia subdiafragmática bilateral e esplenectomia (Sv+Spl); 3. Treinamento de natação (Dia 80 ao 118); 4. Eutanásia e coleta de tecidos (Dia 120). Desse modo, considerando os procedimentos cirúrgicos e exercício, foram originados cinco subgrupos experimentais com 6 ratos *Wistar* machos por grupo: ratos submetidos à falsa operação sedentários (Sham-Sd); Ratos submetidos à falsa operação e exercício (Sham-Ex); Ratos submetidos à vagotomia subdiafragmática bilateral e exercício (Sv-Ex); Ratos submetidos à esplenectomia e exercício (Spl-Ex); Ratos submetidos à vagotomia subdiafragmática bilateral, esplenectomia e exercício (Sv+Spl-Ex). Imagem produzida com o auxílio da ferramenta Biorender.



Fonte: Elaborada pelo autor (2025)

4.5. Eutanásia e coleta de materiais

Aos 120 dias de vida, após 48 horas sem exercício físico e 12 horas de jejum, os animais foram pesados e eutanasiados. Para isso, os animais foram previamente dessensibilizados em câmara de dióxido de carbono (CO₂ - 20% vol/min) e decapitados por guilhotina para evitar interferência nas variáveis metabólicas.

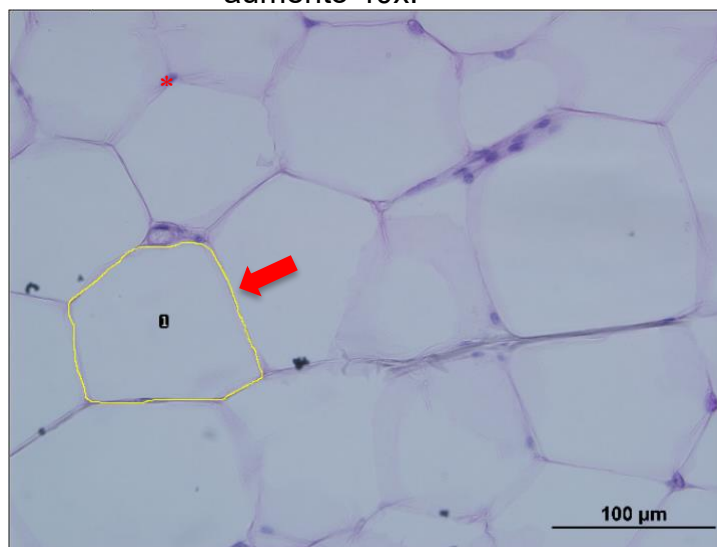
Imediatamente após, o sangue total foi coletado, o comprimento naso-anal (CNA; cm) foi realizado, seguido pela laparotomia da cavidade abdominal e coleta do TAB visceral retroperitoneal (TAB-R) e subcutâneo inguinal (TAB-I), os quais foram lavados em salina 0.9%, pesados para análise da adiposidade. Em seguida, fragmentos desses depósitos foram transferidos para a solução de fixação histológica (ALFAC: álcool etílico 80%, formaldeído 40% e ácido acético glacial) em que foram mantidos por 24h. Após esse período, todas as amostras foram armazenadas em álcool 70% até os procedimentos histológicos, conforme descritos a seguir.

4.6. Preparo dos tecidos e processamento de dados

4.6.1. Histologia do TAB:

Para o preparo dos tecidos, as amostras foram submetidas à desidratação em série crescente de álcool (80, 90, 95 e 100%), logo em seguida, pela diafanização gradual por xilol tipo I e tipo II, e depois incluídos em parafina (Dinamica®). Os blocos foram cortados em uma espessura de 7µm, com o auxílio do micrótomo (Olympus cut 4055). De cada animal (n=6 ratos/grupo), foram feitas 3 lâminas, contendo 3 cortes por lâmina. Posteriormente, foi realizada a técnica de coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E) (Ribeiro; Lima, 2000). As lâminas histológicas foram fotografadas com auxílio do microscópio de luz (OLYMPUS BX60), acoplado à câmera de captura (OLYMPUS DP71), sendo realizadas 3 fotomicrografias por corte no aumento de 40X. Para a caracterização do tamanho dos adipócitos, foi utilizado o software ImageJ (Versão 1.54j, USA), conforme mostra fotomicrografia representativa na Figura 4.

Figura 4 – Fotomicrografia representativa dos adipócitos do TAB indicando como foi realizada a mensuração de área (linha amarela) e núcleos (seta vermelha) software ImageJ. Coloração de hematoxilina e eosina (H&E), aumento 40x.



Fonte: Elaborada pelo autor (2025)

4.6.2. Parâmetros Bioquímicos Plasmáticos e sanguíneos

Imediatamente após a eutanásia, o sangue total foi coletado em um tubo heparinizado. Parte dele foi transferida para microtubos, centrifugados (12.600g, 10 minutos, 4°C), e o plasma foi armazenado (-20°C) para análise dos parâmetros plasmáticos de glicose, triglicerídeos e colesterol total pelo método enzimático colorimétrico, usando kits comerciais (LaborLab®, Laboratory Products Ltd, São Paulo, BR). Os níveis séricos de ferro circulante foram determinados pelo método de Goodwin modificado (Blioclin®, Quibasa basic chemistry, Minas Gerais, BR). A concentração plasmática de hepcidina foi avaliada pelo kit imunoenzimático (Thermo Fisher Scientific Inc®, São Paulo, BR).

4.7. Análise de dados

Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP). Os dados paramétricos foram analisados pelo teste Anova One-way, seguido do pós-teste de Tukey. Dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis. Valor de $p < 0,05$ foi adotado como critério de significância em todas as análises. Correlação de Pearson foi utilizada para avaliar relação entre ferro ou hepcidina e os dados do TAB. As análises e os gráficos foram realizados usando o software estatístico GraphPad Prism® (versão 10.2 para MacOs).

5. ARTIGO

O artigo intitulado: "Vagus nerve and spleen modulates hepcidin plasma levels and white tissue mass in male Wistar rats submitted to swimming training", foi formatado de acordo com as normas para submissão da revista *Nutrients* ([Manuscript requirements](#); Anexo B)

Vagus nerve and spleen modulates hepcidin plasma levels and white tissue mass in male Wistar rats submitted to swimming training

Tessaro Giovana Fanhani ^{1*}, Oldra Caroline Maman ¹, Gomes, Ellen Carolina Zawoski ¹, Fujita Amanda Rocha ¹, Helene Eveline Cristiane Batista Schimidt ¹, Martins Matheus Dias ², Siqueira Bruna Schumaker ¹, Hoffmann Elizangela Vanessa ², Daudt Beatriz Machado ¹, Urrutia Marianela Andrea Díaz ¹, Grassioli Sabrina ¹.

¹ Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Programa de Pós-graduação em Biociências e Saúde (PPG-BCS), Cascavel, Brasil

² Centro universitário de cascavel, faculdade de fisioterapia, Cascavel, Brasil

* Correspondence: gftessaro1999@gmail.com.

Abstract: Background/Objectives: at present work we evaluated WAT mass and histology on vagotomized and splenectomized male Wistar rats submitted to swimming training and related these effects with iron and hepcidin plasma levels.. **Methods:** At 60 days of life the rats (n=30) were randomly distributed in subgroups according to surgical procedures: splenectomy; subdiaphragmatic vagotomy (Sv; SV+spl, association of both surgeries and sham groups, surgical control. At 80 days of life part of the animals in each group were randomly distributed into Exercised (ex) or Sedentary (sd) groups. In this way, 5 experimental groups were formed (n=6 rats/group): Sham-Sd; Sham-Ex; Spl-Ex; Sv-Ex; Sv+Spl-Ex. At 120 days, the animals were euthanized, and blood was collected for analysis of plasma parameters. deposits of inguinal (I-WAT) and retroperitoneal (R-WAT) white adipose tissue were collected for histological analysis, number and area of adipocytes. **Results:** Trained animals had higher levels of total cholesterol. Iron and hepcidin levels were not changed. Exercise did not affect t I-WAT weight. Histology showed an increase in the number of adipocytes in I-WAT, with a reduction in adipocyte area in exercised animals subjected to VS and SPL. Exercise, Sv and spl reduced R-WAT weight and influenced adipocyte number and area. In Sham-Sd animals, a positive correlation was observed between iron and I-WAT weight and number of adipocytes. There was no association between iron, hepcidin and R-WAT variables. **Conclusions:** The SV mainly when associated with SPL, it favors the reduction of WAT, reducing the size of adipocytes in exercised rats, exerting an anti-adiposity response and independent of the fluctuation in circulating levels of iron or hepcidin.

Keywords: Physical activity; adipocytes; iron; vagus nerve; splenectomy.

1. Introduction

White adipose tissue (WAT) is a complex organ participating of metabolic, immune and endocrine functions [1] Adipocytes are primary cells that composed WAT tissue and performed important metabolic activities, such as lipolysis and lipogenesis. Moreover, as well established in the literature, these cells also produce and release several proteins, grouped in the concept nominated adipokines, among which the following stand out leptin, resistin, adiponectin, interleukin (IL) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) [2]. Among adipocytes also reside a greater number of immune cells, in special, macrophages. This manner, there is important structural and functional relationship between adipocytes and macrophages into WAT, event fundamental to health [3].

Several hormones, neurotransmitters and micronutrients are able in modulate WAT expansion and metabolism[4], [5]. Insulin is primary lipogenic hormone, favoring WAT mass expansion as well as

adipogenesis [6]. On contrast, autonomic nervous system (ANS), mainly by sympathetic nervous system (SNS) promotes lipolytic effects on WAT reducing mass and adipocytes area [7]. More recently it has been demonstrated that micronutrients, such as iron can influence WAT mass and function [8]. In this sense, iron modulates leptin and adiponectin levels in WAT [9]–[11]. In addition, manipulation of iron on mitochondria of WAT impact systemic metabolism [12]. Recently study using genetically manipulated mice demonstrated that lower iron on adipocytes induces reduction on iron absorption at intestinal levels [11]. According to authors, adipocytes iron is a important rate limiting to excessive energy supply. Iron also is essential to WAT adipogenesis. Adipocytes- transferrin (Tf) deleted lowers its capacity to take up iron, resulting in decreased intracellular lipid accumulation, with markedly reduced expression of adipogenic genes and increased inflammation levels [12].

Iron interferes with insulin responsivity at WAT and is able in influence macrophages in this tissue. For this reason, preserving iron balance, avoiding deficiency or iron overload are important to avoids chronic metabolic diseases, especially those linked to obesity, such as diabetes and cardiovascular dysfunctions [13].

Vagus nerve (VN) and spleen are two territories involved in so-called “vagal anti-inflammatory reflex” which modulates metabolism and immune functions [14]. We [15] and others [16]–[18] have demonstrated that bidirectional vagal-splenic interactions may modulate WAT mass, insulin secretion and insulin responsivity besides liver fat deposition and cytokines release. Spleen, mainly at macrophages of red pulp (RP) participates in iron recycling, a central mechanism that destroys senescent erythrocytes releasing iron to be used for several biological systems [19]. VN reduces pro-inflammatory splenic responsivity [20] but whether this pathway also modulates iron metabolism in the splenocytes is unknow.

Exercise exerts positive effects on health, in greater part for limit WAT expansion avoiding pro-inflammatory state, typically common on obese and diabetic conditions [21]. Moreover, exercise also interferes with iron levels [22] and in athletic subjects this appear be involved on higher incidence of anemia, decreases athletic performance and impairs immune function and leads to other physiologic dysfunctions [23]. This relationship between iron deficiency and exercise appears to be related with lactate. Liu *et. al* (2023) et al demonstrated in vitro, mice and humans that over lactate production cause rise and hepcidin and reduction of iron level during exercise.

Hepcidin is a hepatic protein essential to iron homeostasis, mainly because it regulates iron intestinal absorption, iron storage in the macrophages into liver and spleen as well as iron deposition in other targets [22]–[24]. These effects are consequence of its potential in modulating principal protein to export iron of cell, the ferroportin (FPN) [25]–[27]. Thus, hepcidin can associate with Fpn obstructing iron efflux besides stimulates Fpn degradation at lisosomal system. Several states are able in modulate hepcidin, including hypoxia, iron plasma levels and immune cytokines, such as IL6, interesting IL6 is raised during exercise [27]–[30].

Despite VN not directly innervates adipocytes on WAT it is able in modulates WAT mass [16]–[18], including via spleen dependent mechanisms as demonstrated by our studies [14] [15]. In addition, anti-inflammatory vagal-splenic mechanisms can alter cytokines [20]. Considering these data, our hypothesis is that VN and spleen ablation negatively impact iron and hepcidin plasma levels during exercise leading to WAT reduction. Thus, at present work we evaluated WAT mass and histology on vagotomized and splenectomized male Wistar rats submitted to swimming training and related these effects with iron and hepcidin plasma levels.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Ethical Aspects

In the present study were used Wistar male rats at 60 days of life which were submitted to surgical VN and/or spleen ablation associated or not with swimming training according to protocols describe below. All experimental procedures were previously approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of State University Of West Of Paraná (UNIOESTE, protocol nº 16-22), following the principles established by the National Council for Animal Experimentation (CONCEA) and the ARRIVE Guidelines [31]. 50-day-old male rats were obtained from Central Animal Facility at the (UNIOESTE and transferred to the Sectoral Animal Facility of the Laboratory of Endocrine Physiology and Metabolism (LAFEM), where they were acclimated and maintained under controlled light (12-hour light/dark cycle) and temperature conditions ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) and receiving rodent chow (Supralab®, Brazil) and drinking water ad libitum.

2.2. Surgical Procedures

At 60 days of life the rats ($n=30$) were fasted for 12 hours and randomly distributed in subgroups according to surgical procedures: splenectomy (Spl), total ablation of spleen; subdiaphragmatic vagotomy (Sv), total section of VN; SV+spl, association of both surgeries and sham groups, surgical control.

For this, the animals were anesthetized with isoflurane (3-5% for induction, 1-2% for maintenance), under oxygen (O_2 ; 1 mL/min), using a spontaneous ventilation mask. Upon observing the absence of tail and palpebral reflexes, the surgical field was prepared by shaving and disinfecting the area with 2% chlorhexidine gluconate, and then the abdominal cavity was opened with the aid of a scalpel. Splenectomy was performed according to the protocol by Gotoh *et al.* (2012) [32]. Briefly, after anesthesia and abdominal laparotomy the spleen was located and exposed, blood vessels were ligated with surgical thread, and the organ was totally removed and weighed. The Sv procedure was done according to the original protocol proposed by Kiba *et al.* (1996) [33] with adaptations Balbo *et al.* (2007) [34]. Briefly, after anesthesia and abdominal laparotomy the liver was localized and retracted to expose the esophagus identifying VN branches. Thus, the anterior and posterior branches of the VN were separated from the esophageal wall, cut, and the ends tied with surgical thread to avoid reinnervation. In the groups Sv+spl both surgical procedures were done at same time. Animals underwent Sham were submitted to anesthesia, laparotomy, spleen and VN manipulation, but without cutting the VN or removing the spleen. After the procedures, muscle and skin layers were sutured with absorbable thread (Catgut no. 3.0) and nylon (Procure no. 3.0) for continuous and simple stitches, respectively. All operated animals were transferred to individual cages with free access to water and feed for one week and received via oral, Medley® sodium dipyrone (50 mg/kg) during the first 24 hours for pain relief [32]. After the first postoperative week, the animals were regrouped (3 to 4 rats per cage) according to their experimental group.

2.3. Swimming training protocol

At 80 days of life part of the animals in each group were randomly distributed into Exercised (ex) or Sedentary (sd) groups. The exercised rats swam during 30 minutes/day, 5 days a week, in a heated ($32 \pm 2^{\circ}\text{C}$) stainless steel tank (100 cm x 60 cm x 60 cm). Six to eight animals swam in the tank in each section training. Swimming training was maintained for 8 weeks during which the overload was added and adjusted proportionally to prevent habituation. Thus, 1st week: consisted in the adaptation phase in which the rats swim freely; 2nd week: the rats received an overload of 2.5% of body weight (bw) attached to the animal's tail; 3 to 8 weeks: the overload added to tail was 5% of bw. Swimming took place in the afternoon, after which the rats were dried and returned to their cages. The Sd animals did not perform any exercise, only mobility/spontaneous walking activities.

2.4. Experimental design

Considering surgical procedures and swimming, were formed 5 experimental groups (n=6 rats/group) according to shown in the Figure 1. Sham-Sd: Sham Operation - Sedentary; Sham-Ex: Sham Operation - Exercised; Spl-Ex: Splenectomy - Exercised; Sv-Ex: Vagotomy - Exercised; Sv+Spl-Ex: Vagotomy + Splenectomy – Exercised.

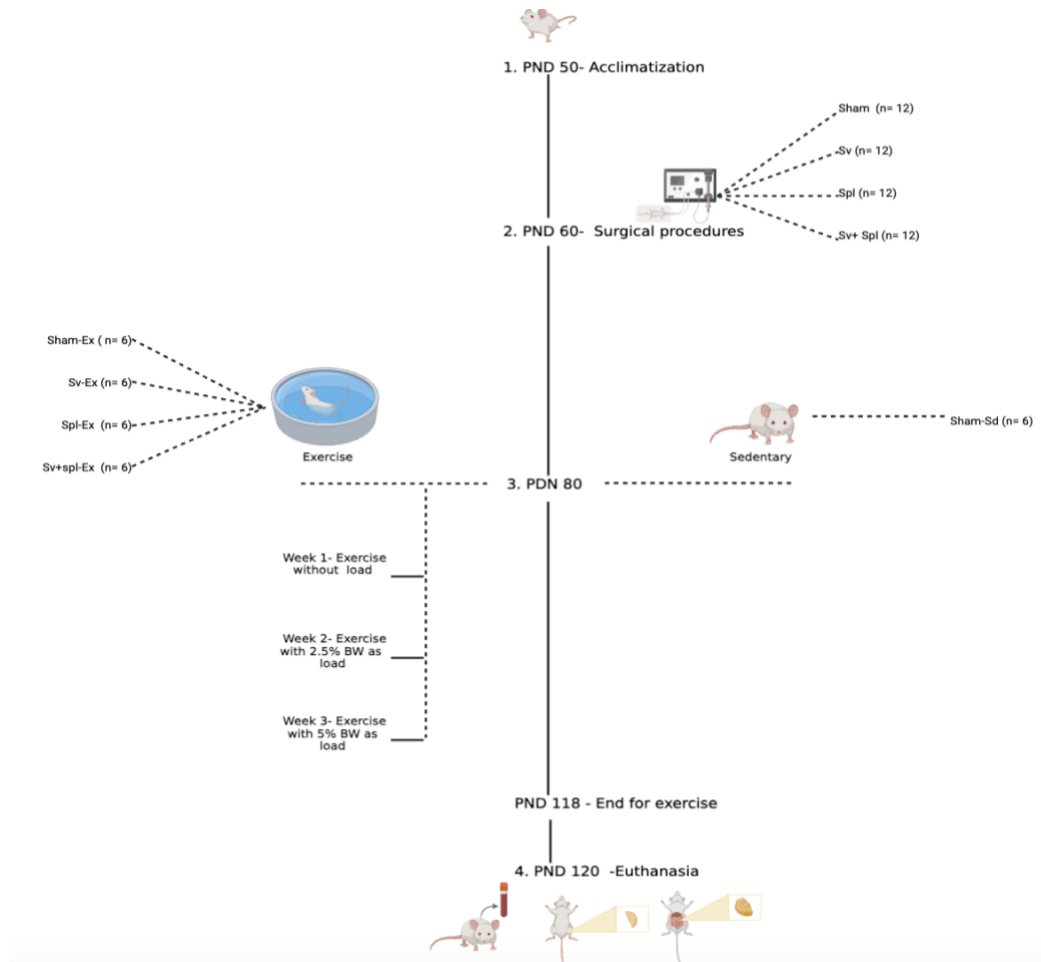


Figure 1. Experimental design. The timeline shows intervention at long to life: 1. Acclimation period from 50 to 60 post-natal day (PND); 2. Surgical procedures (PND 60): Rats subjected to sham operation (Sham); Rats subjected to bilateral subdiaphragmatic vagotomy (Sv); Rats subjected to splenectomy (Spl) and rats subjected bilateral subdiaphragmatic vagotomy and splenectomy (Sv+Spl); 3. Swimming training from 80 PND to PND118; 4. Euthanasia and tissue extraction and analysis (PND 120). Thus, considering surgical procedures and exercise were originated five experimental subgroups with 6 male Wistar rats for group: rats subjected to sham operation sedentary (S-Sham) and exercise (Ex-Sham); rats subjected to bilateral subdiaphragmatic vagotomy exercise (Sv-Ex); rats subjected to splenectomy exercise (Spl-Ex); rats subjected to bilateral subdiaphragmatic vagotomy and exercise (Sv+Spl-Ex). Image produced with the help of the Biorender tool. Source: Author (2025).

2.5. Euthanasia and Tissue Collection

Forty-eight hours after the last swimming training session and after a 12-hour of fasting the animals were euthanized. For this, the rats were briefly desensitized at dioxide of carbon chamber (CO₂ - 20% vol/min) and the body weight (BW) and naso-anal length (NAL; cm) were recorded immediately. Then, the rats were quickly decapitated and total blood collected to biochemical and hormonal dosage

according explained to next section. After euthanasia, the abdominal cavity was opened, and visceral WAT from depots retroperitoneal (R-WAT) and inguinal (I-WAT) were removed and weighed.

2.6. Blood biochemistry variables, iron and hepcidin levels

Immediately afterward, whole blood was collected in a heparinized tube. Part of it was transferred to microtubes, centrifuged (12,600g, 10 minutes, 4°C), and the plasma was stored (-20°C) for plasma parameter analysis. Thus, in the plasma were measured glucose, triglycerides and total cholesterol using enzymatic method (LaborLab®, Laboratory Products Ltd, São Paulo, BR). Serum iron circulating levels were determined using the modified goodwin mehod (Blioclin®, Quibasa basic chemistry, Minas Gerais, BR). Plasma hepcidin concentration was assessed using an immunoenzymatic kit (Thermo Fisher Scientific Inc®, São Paulo, BR).

2.7. White adipose tissue histology

After retired and weighted the visceral (R-WAT; n = 6 – 8 rats/group) and subcutaneous (I-WAT; n = 6 – 8 rats/group) WAT depots were transferred to fixation solution (Alfac: 85% ethyl alcohol, 10% formaldehyde and 5% glacial acetic acid) during 24h and after transferred to alcohol solution (70%). For histology procedures, the WAT samples were diaphanized in xylol, dehydrated in growing alcohol solution and embedded in paraplast (Dinamica®). To each sample were prepared three slides where were added three semi-seriated cut (7µM) with interval of approximately 80 µM to each sample. The microtomy was performed using semi-automated microtome (Olympus cut 4055®). Slides were stained with Hematoxylin and Eosin (HE). Then, histological slides were registered using a light microscope (Olympus BX60) coupled to a capture camera (Olympus DP71) with three photomicrographs per section being taken at 40X magnification, totaling nine photomicrographs per animal. To characterize and quantify the size and number of adipocytes, ImageJ software (Version 1.54j, USA) was used.

2.8. Statistical Analysis

The data are presented as mean ± standard deviation (SD). Parametric data was analyzed by anova one-way and non-parametric data for Kruskal-Wallis test. When the F values were significantly different (p<0.05), Tukey's post-hoc test was applied. For correlation analysis, Pearson Correlation was used. The analyses were performed using the statistical software GraphPad Prism® (versão 10.2 for MacOs).

3. Results

Neither swimming training nor surgical procedures significantly affected body weight gain and NAL. Similarly, fasting values of glucose and triglycerides no were altered either surgical or exercise. On contrast, exercised grous showed higher total cholesterol levels (Sham-Ex: p=0.0002; Spl-Ex: p=0.0057; Sv-Ex: p=0.0012; Sv+Spl-Ex: p= 0.0082) when compared to Sham-Sd animals. The IR, evaluated by TyG values, also was not different between groups (Table 1).

Table 1. Effects of VN and spleen absence on BW gain, growth and metabolic variables of Wistar male rats submitted to swimming training.

		Variables					
Groups		Bw gain PND 70-120 (g)	NAL (cm)	Glucose (mg/dL)	Total Cholesterol (mg/dL)	Triglycerides (mg/dL)	TyG
	Sham-Sd	70.67 ± 15.07	23.22 ± 1.21	100.59 ± 15.83	50.54 ± 14.70	114.09 ± 92.35	8.46 ± 0.72
	Sham-Ex	91.83 ± 6.05	22.92 ± 0.73	96.79 ± 4.75	95.58 ± 18.68 ^A	80.14 ± 28.12	8.20 ± 0.40
	Spl-Ex	93.67 ± 18.01	23.58 ± 1.02	98.93 ± 8.12	83.98 ± 10.03 ^A	85.11 ± 18.05	8.32 ± 0.29
	Sv-Ex	90.83 ± 22.23	22.66 ± 0.51	97.97 ± 3.42	89.50 ± 11.27 ^A	87.94 ± 16.41	8.35 ± 0.15
	Sv+Spl-Ex	83.67 ± 20.84	22.50 ± 0.55	92.84 ± 12.61	82.69 ± 18.08 ^A	71.28 ± 38.83	7.89 ± 0.78

Data are expressed as mean ± SD (n= 6 rats/group). The different letters subscripted in the lines symbolize the effect on the Tukey post-test (p<0,05). A: different from Sd-Sham; Bw: Body weight; NAL: Nasal-anal length; Tyg: Triglyceride and glucose index. Source: Author (2025).

Serum levels of iron as well as plasmatic hepcidin were no altered neither by exercise nor surgical procedures (Figure 2.A and 2.B).

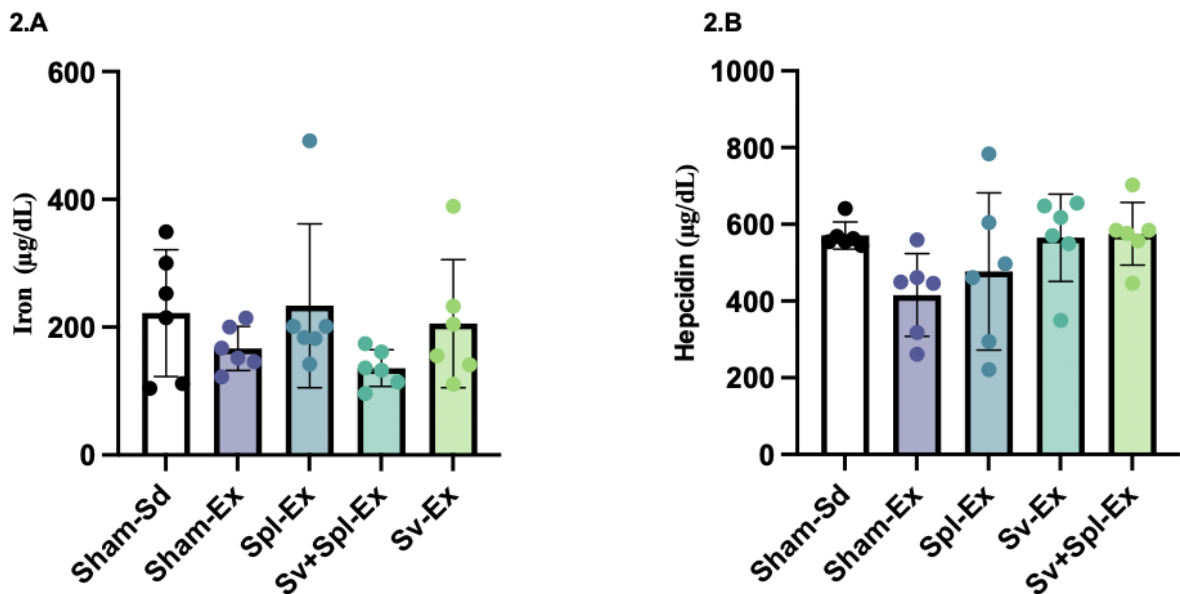


Figure 2. Effects of the absence VN and spleen on serum iron and hepcidin levels in exercised rats. Data are express mean ± SD. (6 rats/group). 3.a: Iron (µg/dL); 3.b Hepcidin (µg/dL). Source: Author (2025).

The weight of I-WAT depot no was affected by exercise. However, this parameter was modified by VN and spleen ablation in exercised rats. In this sense, in the groups Sv-Ex (p=0.0394) and Sv+Spl-Ex (p=0.0497) were found smaller I-WAT content in relation to Sham-Sd rats (Figure 3.A). Adipocytes number and size from I-WAT no were significantly affected in the Sham-Ex compared to Sham-Sd (Figure 3.B). On contrast, significant changes in adipocyte number and area were observed in exercised groups submitted to SV and Spl surgical. Thus, animals of the Spl-Ex (p=0.0002), Sv-Ex (p=0.0008) and Sv+Spl-Ex (p<0.0001) groups showed higher adipocytes number in I-WAT in comparison to Sham-Sd (Figure 3.B and 3.C). In consequence, the Spl-Ex (p=0.0164), Sv-Ex (p=0.0284) and Sv+Spl-Ex (p=0.0065) groups showed smaller adipocyte area at this WAT depot in relation to Sham-Sd rats (Figure 3.C).

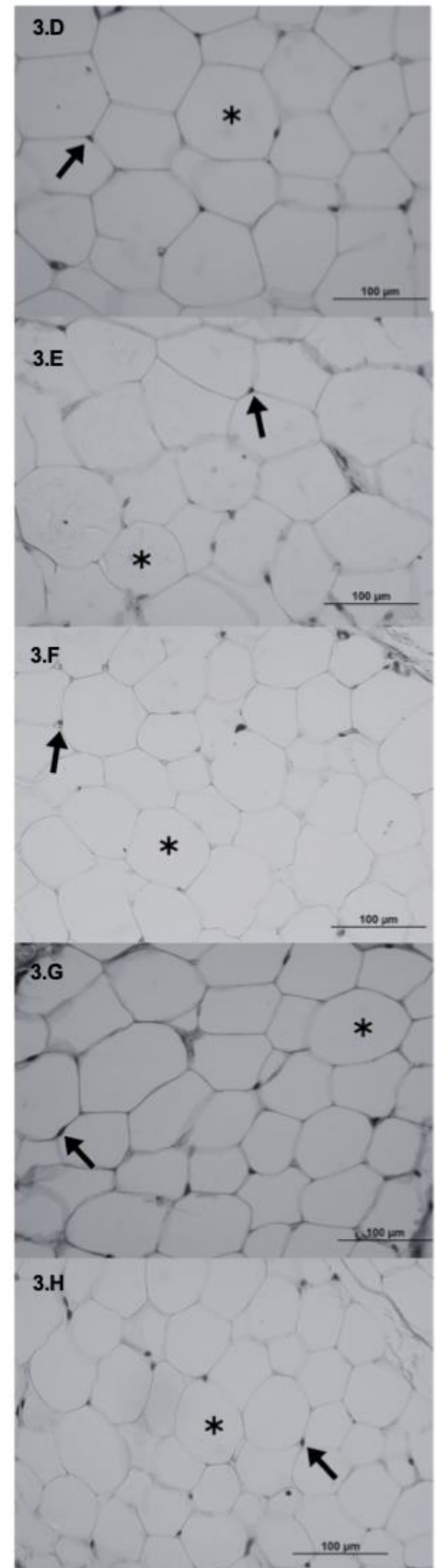
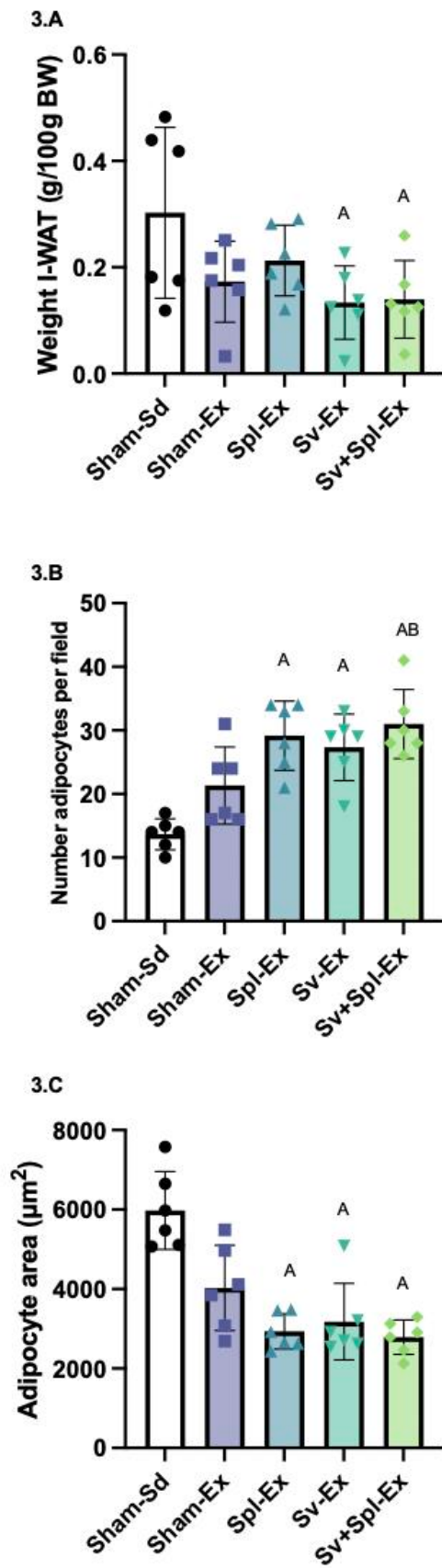


Figure 3. Effects of the absence VN and spleen on the content and histology of subcutaneous adipose tissue (WAT-I) in exercised rats. Data are expressed mean $\pm$ SD. (6 rats/group). **3.A:** Weight WAT-I (g/110g BW); **3.B:** number of adipocytes per field; **3.C:** adipocytes area (μm^2); representative photomicrographs: Sham-Sd (**3.D**); Sham-Ex (**3.E**); Spl-Ex (**3.F**); Sv-Ex (**3.G**); Sv+Spl-Ex (**3.H**). Hematoxylin and Eosin (HE) staining, 40x magnification. The arrow indicates the nucleus of an adipocyte; (*) The asterisk indicates an adipocyte used to measure the area. The different letters subscripted in the lines symbolize the effect on the Tukey post-test ($p < 0,05$). A: different from Sd-Sham-Sd; B: different from Sham-Ex. Source: Author (2025).

The visceral R-WAT depot weight was not significantly influenced only by exercise. However, when exercise was associated with surgical procedures, r-WAT weight was significantly reduced. Thus, rats of groups Sv-Ex ($p=0.0013$; $p=0.0413$) and Sv+Spl-Ex ($p=0.0003$; $p=0.0098$) showed significant reduction in the R-WAT content in comparison to Sham-Sd and Sham-Ex; an effect not observed in Spl-Ex rats.

Similarly, swimming training in animals without VN and spleen significantly influenced adipocytes' number and size in the R-WAT depot. Therefore, the number of adipocytes were significantly augmented on the R-WAT of groups Spl-Ex ($p=0.0228$), Sv-Ex ($p=0.0001$) and Sv+Spl-Ex ($p=0.0001$) in comparison to R-WAT depot of Sham-Sd rats (Figure 4). Moreover, the groups Sv-Ex ($p=0.0025$) and Sv+Spl-Ex ($p<0.0001$) showed higher adipocytes number in R-WAT when compared to Sham-Ex rats. The Spl-ex rats also presented higher adipocytes number in relation to Sv-Ex ($p=0.0185$) and Sv+Spl-Ex ($p<0.0001$). In the groups Sv+spl-Ex also noted higher adipocytes number than Sv-Ex ($p=0.0049$). In consequence, the adipocytes size was significantly modified either by exercise and surgical procedures. Thus, in the groups Sham-Ex: $p=0.0005$; Spl-Ex: $p=0.0002$; Sv-Ex: $p<0.0001$; Sv+Spl-Ex: $p<0.0001$ was found smaller adipocytes size in relation to Sham-Sd rats (Fig.4). This response was accentuated by VN and spleen absence. In this sense, reduced adipocyte sizes were observed in the Sv-Ex ($p=0.0187$) and Sv+Spl-Ex ($p=0.0003$) groups when compared to Sham-Ex rats. Moreover, Sv-Ex ($p=0.0493$) and Sv+Spl-Ex ($p=0.0010$) animals showed significant reduction on adipocyte size of R-WAT also in comparison to Spl-Ex rats (Figure.4).

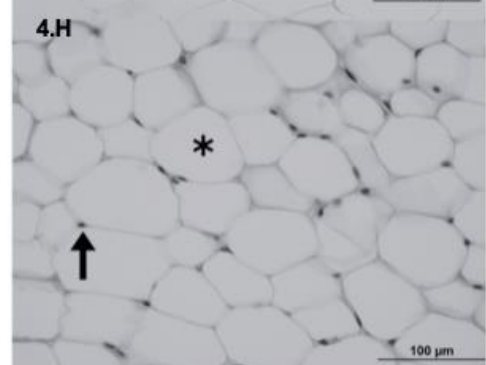
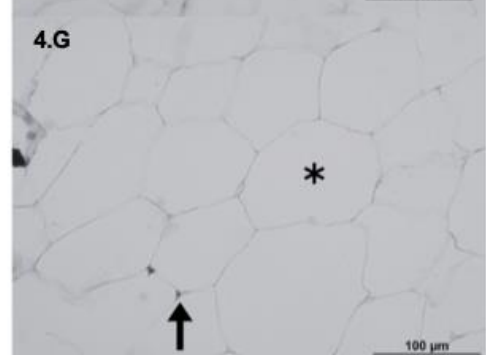
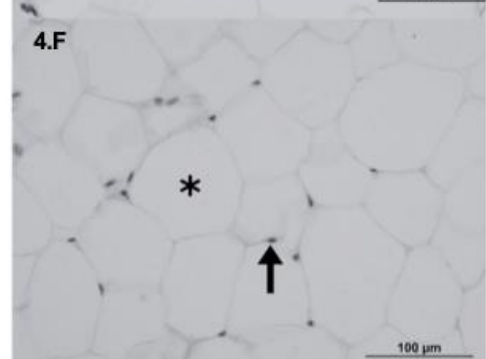
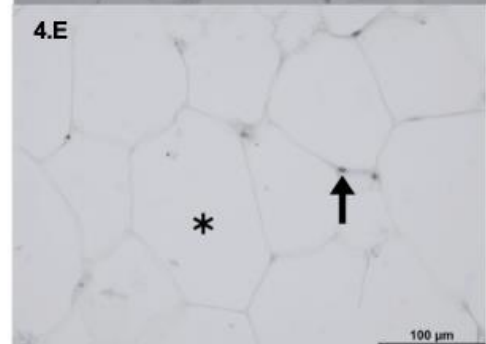
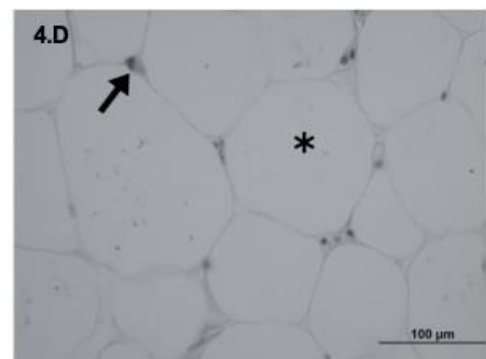
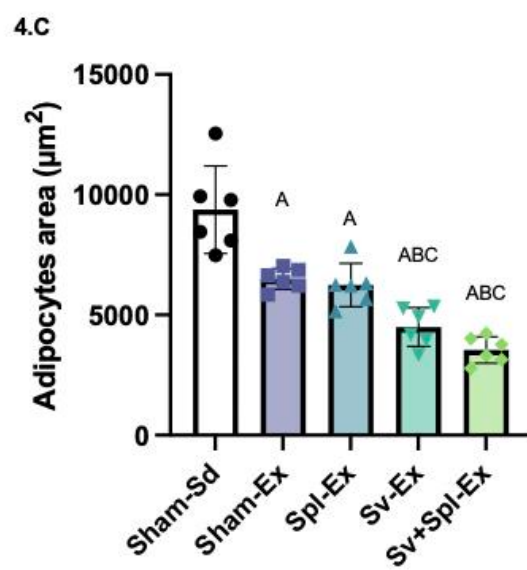
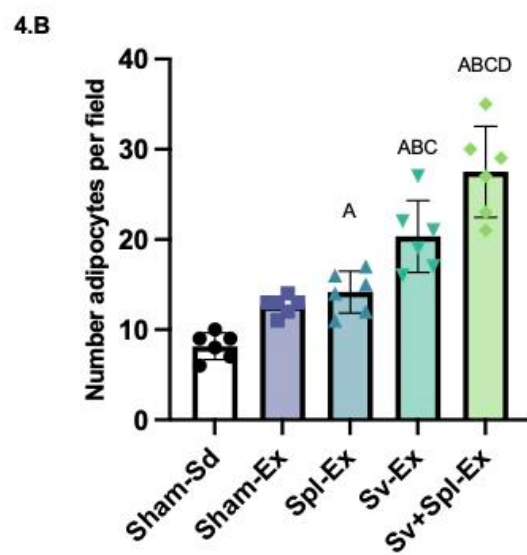
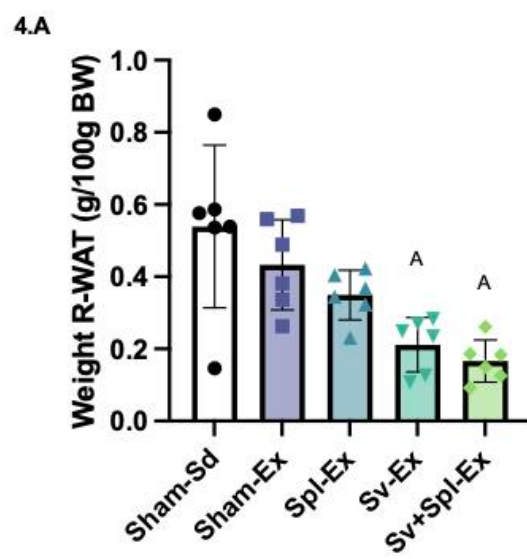


Figure 4. Effects of the absence of VN and spleen on the content and histology of visceral adipose tissue (WAT-R) in exercise rats. Data are express as mean $\pm$ SD (6 rats/group). 4.A: Weight WAT-R (g/100g BW); 4.B: number of adipocytes per field; 4.C: Adipocytes area (μm^2); representatives photomicrographs: Sham-Sd (4.D); Sham-Ex (4.E); Spl-Ex (4.F); Sv-Ex (4.G); Sv+Spl-Ex (4.H) Hematoxylin and Eosin (HE) staining, 40x magnification. The arrow indicates the nucleus of an adipocyte; (*) The asterisk indicates an adipocyte used to measure the area. The different letters subscripted in the lines symbolize the effect on the Tukey post-test ($p < 0,05$). A: different from Sd-Sham-Sd; B: different from Sham-Ex; C: different from Spl-Ex; D: different from Sv-Ex. Source: Author (2025).

In the Table 2 are shown the correlation between serum iron and plasma hepcidin levels and variables of I-WAT and R-WAT in Wistar male rats submitted to swimming training. Only in Sham-Sd rats there was a significant positive correlation of iron levels with I-WAT weight ($r = 0.8893$, $R^2 = 0.7909$, $p\text{-value} = 0.0177$) and adipocytes number ($r = 0.9451$, $R^2 = 0.8982$, $p\text{-value} = 0.0044$). Moreover, in this group, also there was a negative correlation ($r = -0.7677$, $R^2 = 0.5893$) between adipocyte size and iron levels at this depot, although this was not statistically significant ($p\text{-value} = 0.0747$). Neither iron nor hepcidin circulating levels were significantly associated to R-WAT variables in Sham-Sd rats (Table 2).

Despite have been observed in the Sham-Ex animals, a slight and positive tendency between serum iron and I-WAT weight ($r = 0.7554$, $R^2 = 0.5706$, $p\text{-value} = 0.0824$), in other surgical-exercised groups (Sv, Spl, and Sv+Spl), none of I-WAT or R-WAT variables showed significant correlation either with serum iron or plasma hepcidin levels (Table 2).

Table 2. Correlation between circulating levels of iron or hepcidin and WAT variables in male Wistar rats submitted to swimming training.

I-WAT										
	Sham-Sd		Sham-Ex		Sv-Ex		Spl-Ex		Sv+Spl-Ex	
	Iron	Hepcidin	Iron	Hepcidin	Iron	Hepcidin	Iron	Hepcidin	Iron	Hepcidin
Weight	$r: 0.8893$	$r: 0.3351$	$r: 0.4469$	$r: -0.0303$	$r: -0.189$	$r: -0.0946$	$r: -0.6017$	$r: 0.2037$	$r: -0.5830$	$r: 0.0609$
I-WAT	$R^2: 0.7909$	$R^2: 0.1123$	$R^2: 0.1998$	$R^2: 0.0009$	$R^2: 0.0357$	$R^2: 0.0089$	$R^2: 0.3620$	$R^2: 0.0415$	$R^2: 0.3399$	$R^2: 0.0037$
	$p: 0.0177$	$p: 0.5162$	$p: 0.3742$	$p: 0.9545$	$p: 0.7199$	$p: 0.0859$	$p: 0.2064$	$p: 0.6987$	$p: 0.2245$	$p: 0.9088$
Adipocytes	$r: 0.9451$	$r: -0.0039$	$r: 0.7554$	$r: 0.0531$	$r: -0.0536$	$r: -0.4024$	$r: -0.0405$	$r: 0.2112$	$r: -0.5788$	$r: 0.1748$
number	$R^2: 0.8982$	$R^2: 0$	$R^2: 0.5706$	$R^2: 0.0028$	$R^2: 0.1619$	$R^2: 0.1645$	$R^2: 0.1645$	$R^2: 0.0446$	$R^2: 0.3355$	$R^2: 0.0306$
	$p: 0.0044$	$p: 0.9941$	$p: 0.0824$	$p: 0.9204$	$p: 0.4290$	$p: 0.4250$	$p: 0.4250$	$p: 0.6880$	$p: 0.2288$	$p: 0.7405$
Adipocytes	$r: -0.7677$	$r: -0.1626$	$r: -0.7213$	$r: 0.0202$	$r: 0.0606$	$r: 0.3644$	$r: 0.6191$	$r: 0.3367$	$r: 0.3468$	$r: -0.2124$
size	$R^2: 0.5893$	$R^2: 0.0264$	$R^2: 0.5203$	$R^2: 0.0004$	$R^2: 0.0037$	$R^2: 0.1328$	$R^2: 0.3833$	$R^2: 0.1134$	$R^2: 0.1203$	$R^2: 0.0451$
	$p: 0.0747$	$p: 0.7583$	$p: 0.1057$	$p: 0.9696$	$p: 0.9093$	$p: 0.4776$	$p: 0.1900$	$p: 0.5140$	$p: 0.5006$	$p: 0.6862$
R-WAT										
	Sham-Sd		Sham-Ex		Sv-Ex		Spl-Ex		Sv+Spl-Ex	
	Iron	Hepcidin	Iron	Hepcidin	Iron	Hepcidin	Iron	Hepcidin	Iron	Hepcidin
Weight	$r: -0.5882$	$r: 0.1438$	$r: -0.0579$	$r: -6.6924$	$r: 0.5037$	$r: -0.3475$	$r: -0.0351$	$r: -0.4231$	$r: 0.5882$	$r: -0.0441$
R-WAT	$R^2: 0.3460$	$R^2: 0.0207$	$R^2: 0.0034$	$R^2: 0.4793$	$R^2: 0.2537$	$R^2: 0.1208$	$R^2: 0.0012$	$R^2: 0.1790$	$R^2: 0.3460$	$R^2: 0.0019$
	$p: 0.2195$	$p: 0.7859$	$p: 0.9132$	$p: 0.1274$	$p: 0.3084$	$p: 0.4997$	$p: 0.9473$	$p: 0.4032$	$p: 0.2195$	$p: 0.9339$
Adipocytes	$r: 0.5161$	$r: -0.3942$	$r: -0.2393$	$r: 0.0917$	$r: -0.5667$	$r: 0.3678$	$r: -0.0591$	$r: 0.2145$	$r: -0.6698$	$r: 0.4203$
number	$R^2: 0.2663$	$R^2: 0.1554$	$R^2: 0.0573$	$R^2: 0.0084$	$R^2: 0.3211$	$R^2: 0.1353$	$R^2: 0.0035$	$R^2: 0.0460$	$R^2: 0.4486$	$R^2: 0.1766$
	$p: 0.2946$	$p: 0.4393$	$p: 0.6478$	$p: 0.8628$	$p: 0.2410$	$p: 0.4732$	$p: 0.9114$	$p: 0.6831$	$p: 0.1456$	$p: 0.4067$
Adipocytes	$r: -0.6292$	$r: 0.1904$	$r: -0.0001$	$r: 0.0203$	$r: 0.0459$	$r: -0.3916$	$r: -0.0161$	$r: -0.1626$	$r: 0.5496$	$r: -0.5560$
size	$R^2: 0.3959$	$R^2: 0.0363$	$R^2: 0$	$R^2: 0.0004$	$R^2: 0.2112$	$R^2: 0.1533$	$R^2: 0.0003$	$R^2: 0.0265$	$R^2: 0.3021$	$R^2: 0.3091$
	$p: 0.1807$	$p: 0.7178$	$p: 0.9999$	$p: 0.9686$	$p: 0.3591$	$p: 0.4437$	$p: 0.9758$	$p: 0.7582$	$p: 0.2586$	$p: 0.2520$

Pearson correlation coefficient (r): $p > 0.05$ =non-significant, $p < 0.05$ =significant, Values in bold represent significance at $P < 0.05$. Source: Author (2025).

4. Discussion

Iron levels are modulated by exercise and the greater risk to iron deficiency anemia is likely found in the athletic subjects [23], [35]. Hepcidin is a primary hepatic hormone to iron homeostasis

control [36]. The effects of exercise on hepcidin have shown contradictory results [37]. Here we not found significant differences neither in serum iron nor plasmatic hepcidin levels between sedentary and exercised male rats. Important to emphasize that iron and hepcidin levels during exercise are modulated by intensity, time and sex [38]. Studies in the humans have demonstrated that hepcidin rise in the 3, 6 and 24 h post-exercise, and then declined from there, reaching baseline at 72 h post-exercise, indicating relationship of hepcidin with time [39]. Women athletes are more susceptible to iron deficiency anemia [40]. Moreover, intensity to exercise determine the degree of inflammatory response, in special to IL6, a cytokine with stimulatory effects on hepcidin [41]. Our exercise protocol cannot be considered intense in comparison to other swimming protocols [42] and our analysis were performed 48h after last exercise session. Thus, it's probable that in health male submitted at moderated swimming training protocol iron or hepcidin no had been affected. In agreement, a study of Shimojo, G. *et al.* (2019) showed that aerobic swimming for 1 h attenuated serum TNF levels without affecting glycemia or serum IL6 levels in endotoxemic mice [43]. These findings do not discharge the possibility of intracellular iron levels may be altered by exercise. However, intracellular iron deposition was not evaluated at present work.

As above mentioned, inflammatory process is able in modulates hepcidin and iron state [44]. VN and spleen participates in the anti-inflammatory reflex that exerts influence on metabolism and WAT mass [45]. No study has evaluated the participation of anti-inflammatory reflex on iron homeostasis. Our data showed that absence of VN and spleen to exercised rats no significant alter iron or hepcidin circulating levels in health rat. Macrophages resident on the red spleen participate in iron recycling, a process that appears to be essential to maintain iron homeostasis [19]. However, during spleen absence the liver can elevate iron recycling [46], [47]. Moreover, the liver iron levels rise with exercise, whereas spleen iron levels decreased [48]. Thus, it is probable that liver compensates for spleen absence avoiding iron endogenous disruption.

Herein we are demonstrating for the first time that VN exerts more anti-adiposity effects than exercise on health state. Thus, we demonstrated that i-WAT and r-WAT content are significantly reduced in vagotomized and exercised rats in relation to animals with intact VN indicating greater vagal influences on subcutaneous and visceral WAT depot during exercise.

The ANS modulations are important to metabolic and cardiovascular adjustments during exercise [49]. In general, rodents and humans submitted to exercise show rises in the SNS activity, with augmented catecholamines (adrenaline and noradrenaline) response in WAT [50]. Our data indicates that despite swimming training reducing WAT mass and adipocytes size these effects were more evident in vagotomized and exercised groups, pointing out that VN participates in WAT mass and lipolysis control during exercise. VN ablation has been related with higher catecholamines circulating levels [51], [52], indicating high SNS flux in vagotomized animals. In humans, afferent vagal neurons are able in modulate SNS, including catecholamines release [53]. Interesting, data have demonstrated that VN could monitor plasmatic levels of catecholamines [54], [55]. On contrast, selective hepatic vagotomy not modify catecholamine levels in acute exercised rats [56], [57].

More recent study demonstrated that vagotomy avoids beneficial effects of exercise on metabolism from obese mice [58]. According to these authors the prevention of HFD related insulin resistance by exercise intervention involves the decrease of TNF- α level in the spleen. However, this last-mentioned study does not evaluate WAT mass. We have demonstrated that spleen and VN interactions can modulate WAT mass in lean and hypothalamic-obese non-exercised rats [16]. At present work, we are showing that the association vagotomy plus splenectomy promotes more accented reduction on WAT mass, adipocyte size with rises in adipocytes number to exercised rats. These data suggest that in health conditions VN and spleen can control lipolysis and adipogenesis on WAT.

In agreement, despite WAT lacks direct innervation by the parasympathetic VN [59], several studies have demonstrated vagal involvement in the control of fat mass. For example, surgical ablation

of the abdominal VN can result in a considerable reduction of body weight [60], and vagal denervation has also been linked to increased weight loss following gastrectomy [61]–[63].

Lipolysis and adipogenesis in the WAT are regulated by insulin [64]. It is well recognized insulin sensitizer effect of exercise [64]. Our group showed that in lean rats VN and spleen ablation reduced insulin secretion [65]. It is possible that swimming training to Vs+Spl exercised rats provoked reduction on insulin and favoring lipolysis and improving adipogenic responses. However, no significant differences in the levels peripheral of insulin and glucagon, and also to epinephrine and norepinephrine were observed between hepatic-vagotomized and sham-operated rats in either resting or exercising [57]. Important, to remember that hepatic vagal nerve is primary constituted of afferent signals while abdominal VN have afferent and efferent signals and study of Holland, J. *et al.* (2019) showed that vagal efferent signal promotes adipogenesis on WAT of obese mice with reduced melanocortin system activation [66].

Several studies have demonstrated changes in blood fluxes, red and white blood cells and immune responses in spleen during exercise [67], [68]. Data previously published for us showed that splenectomy reduces WAT content in hypothalamic obese rats and spleen presence appears to be important to anti-adiposity effects of vagotomy in lean rats [15]. At present work we confirm that splenectomy on exercised rats favors WAT reduction, however in smaller magnitude of vagotomy. Spleen modulates immune response to some perivascular WAT depot [69] exerting protective anti-inflammatory effects. Moreover, spleen-supplied innate-like B cells in WAT which appears involved in the obesity-associated diseases [17]. However, our data indicates that during exercise spleen absence can favor lipolysis and adipogenesis in WAT depot of lean rats. Thus, it is possible that spleen pro or anti-inflammatory roles be different in health and obese state, as suggested for data published by us [15].

Finally, iron and hepcidin can modulate WAT mass [10], [70]. Deficiency of hepcidin in I-WAT and iBAT induces iron accumulation at this depot and reduces adipogenesis [71]. At present work circulating levels of iron and hepcidin have not been significantly altered by exercised or surgery. Thus, our data suggest that higher WAT loss in vagotomized and splenectomized rats submitted to exercise occur independent of changes on iron or hepcidin plasmatic circulating levels. However, as above mentioned this finding no discharge iron intracellular adipocyte accumulation.

5. Conclusions

In conclusion, our data indicate that, at health state, the VN in special when associated with splenectomy favor reduction on subcutaneous and visceral WAT mass, diminishing adipocyte size in exercised rats, exerting more potent anti-adiposity response than only the exercise. Important, anti-adiposity effects of vagal and splenic absence in exercised rats are independent of oscillation in the iron or hepcidin circulating levels.

Author Contributions: Conceptualization, HELENE, ECBS and URRUTIA, MAD, TESSARO, GF; Methodology TESSARO, GF and OLDRA, CM; Validation, GOMES, ECZ and OLDRA, CM; Formal analysis, TESSARO, GF and GOMES and ECZ and SIQUEIRA and BS; DAUDT, BM; Investigation, FUJITA, AR; Resources, MARTINS, MD and HOFFMANN, EV; Data curation, GOMES, ECZ; Writing—original draft preparation, TESSARO,GF; Writing—review and editing, TESSARO,GF; Visualization, TESSARO, GF and OLDRA, CM; Supervision, GRASSIOLLI, S; Project administration, TESSARO, GF and OLDRA, CM and FIJUTA, AR; Funding acquisition, GRASSIOLLI, S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by CNPq, universal notice, grant number 402230.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Committee on the use of animals of State University of Western Paraná (protocol 16-22 and d approved 03/02/2023).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All other relevant data are available upon request from the authors.

Acknowledgments: We acknowledge the support given by the Araucária Foundation, through of the social demand program with scholarship, process no. 88887.835540/2023-0.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

WAT	White adipose tissue
IL	Interleukin
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
ANS	Autonomic nervous System
VN	Vagus nerve
RP	Red pulp
FPN	Ferroportin
UNIOESTE	State University of West of Paraná
CONCEA	National Council for Animal Experimentation
LAFEM	Laboraty of Endocrine Physiology and Metabolism
SPL	Splenectomy
Sv	Subdiaphragmatic Vagotomy
Ex	Exercised
Sd	Sedentary
PND	Post-natal Day
BW	Body Weight
NAL	Naso-anal Length
R-WAT	Retroperitoneal white adipose tissue
I-WAT	Inguinal white adipose tissue
SD	Standard deviation
WG	Weight gain
Tyg	Triglyceride and glucose index

References

1. Sakers, A., De Siqueira, M. K., Seale, P. & Villanueva, C. J. Adipose-tissue plasticity in health and disease. *Cell* **185**, 419–446 (2022).
2. Ren, Y. *et al.* Adipokines, Hepatokines and Myokines: Focus on Their Role and Molecular Mechanisms in Adipose Tissue Inflammation. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **13**, (2022).
3. Caslin, H. L., Bhanot, M., Bolus, W. R. & Hasty, A. H. Adipose tissue macrophages: Unique polarization and bioenergetics in obesity. *Immunol. Rev.* **295**, 101–113 (2020).
4. Ghesmati, Z. *et al.* An update on the secretory functions of brown, white, and beige adipose tissue: Towards

- therapeutic applications. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **25**, 279–308 (2024).
5. An, Y. A. *et al.* The mitochondrial dicarboxylate carrier prevents hepatic lipotoxicity by inhibiting white adipocyte lipolysis. *J. Hepatol.* **75**, 387–399 (2021).
 6. Cignarelli, A. *et al.* Insulin and Insulin Receptors in Adipose Tissue Development. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 759 (2019).
 7. Messina, G. *et al.* Role of Autonomic Nervous System and Orexinergic System on Adipose Tissue. *Front. Physiol.* **8**, (2017).
 8. Hilton, C., Sabaratnam, R., Drakesmith, H. & Karpe, F. Iron, glucose and fat metabolism and obesity: an intertwined relationship. *Int. J. Obes.* **47**, 554–563 (2023).
 9. Gabrielsen, J. S. *et al.* Adipocyte iron regulates adiponectin and insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* **122**, 3529–3540 (2012).
 10. Gao, Y. *et al.* Adipocyte iron regulates leptin and food intake. *J. Clin. Invest.* **125**, 3681–3691 (2015).
 11. Zhang, Z. *et al.* Adipocyte iron levels impinge on a fat-gut crosstalk to regulate intestinal lipid absorption and mediate protection from obesity. *Cell Metab.* **33**, 1624–1639.e9 (2021).
 12. Kusminski, C. M. *et al.* MitoNEET-driven alterations in adipocyte mitochondrial activity reveal a crucial adaptive process that preserves insulin sensitivity in obesity. *Nat. Med.* **18**, 1539–1549 (2012).
 13. Fernández-Real, J. M. & Manco, M. Effects of iron overload on chronic metabolic diseases. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2**, 513–526 (2014).
 14. Pavlov, V. A. & Tracey, K. J. Neural regulation of immunity: molecular mechanisms and clinical translation. *Nat. Neurosci.* **20**, 156–166 (2017).
 15. Kuchler, J. C. *et al.* The Vagus Nerve and Spleen: Influence on White Adipose Mass and Histology of Obese and Non-obese Rats. *Front. Physiol.* **12**, (2021).
 16. de Souza, T. A. *et al.* Splenic participation in glycemic homeostasis in obese and non-obese male rats. *Obes. Res. Clin. Pract.* **14**, 479–486 (2020).
 17. Wu, L., Parekh, V. V., Hsiao, J., Kitamura, D. & Van Kaer, L. Spleen supports a pool of innate-like B cells in white adipose tissue that protects against obesity-associated insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, (2014).
 18. Rosas-Ballina, M. *et al.* Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. *Science* (80-.). **334**, 98–101 (2011).
 19. Lewis, S. M., Williams, A. & Eisenbarth, S. C. Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci. Immunol.* **4**, (2019).
 20. Kressel, A. M. *et al.* Identification of a brainstem locus that inhibits tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 29803–29810 (2020).
 21. Della Guardia, L. & Codella, R. Exercise Restores Hypothalamic Health in Obesity by Reshaping the Inflammatory Network. *Antioxidants* **12**, 297 (2023).
 22. Castell, L. M., Nieman, D. C., Bermon, S. & Peeling, P. Exercise-Induced Illness and Inflammation: Can Immunonutrition and Iron Help? *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **29**, 181–188 (2019).
 23. Beard, J. & Tobin, B. Iron status and exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* **72**, 594S–597S (2000).
 24. Xu, Y., Alfaro-Magallanes, V. M. & Babitt, J. L. Physiological and pathophysiological mechanisms of hepcidin regulation: clinical implications for iron disorders. *Br. J. Haematol.* **193**, 882–893 (2021).
 25. Liu, W. *et al.* Lactate modulates iron metabolism by binding soluble adenylyl cyclase. *Cell Metab.* **35**, 1597–1612.e6 (2023).
 26. Vogt, A.-C. S. *et al.* On Iron Metabolism and Its Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 4591 (2021).
 27. Wang, C.-Y. & Babitt, J. L. Liver iron sensing and body iron homeostasis. *Blood* **133**, 18–29 (2019).
 28. Li, Y., Huang, X., Wang, J., Huang, R. & Wan, D. Regulation of Iron Homeostasis and Related Diseases. *Mediators Inflamm.* **2020**, 1–11 (2020).
 29. Pedersen, B. K. & Febbraio, M. A. Muscle as an Endocrine Organ: Focus on Muscle-Derived Interleukin-6. *Physiol. Rev.* **88**, 1379–1406 (2008).
 30. Sangkhue, V. & Nemeth, E. Regulation of the Iron Homeostatic Hormone Hepcidin. *Adv. Nutr.* **8**, 126–136 (2017).
 31. McGrath, J., Drummond, G., McLachlan, E., Kilkenny, C. & Wainwright, C. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br. J. Pharmacol.* **160**, 1573–1576 (2010).
 32. Gotoh, K. *et al.* A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced hypothalamic inflammation. *J. Neurochem.* **120**, 752–764 (2012).
 33. Kiba, T. *et al.* Ventromedial hypothalamic lesion-induced vagal hyperactivity stimulates rat pancreatic cell proliferation. *Gastroenterology* **110**, 885–893 (1996).
 34. Balbo, S. L. *et al.* Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. *Endocrine* **31**, 142–148 (2007).

35. Sim, M. *et al.* Iron considerations for the athlete: a narrative review. *Eur. J. Appl. Physiol.* **119**, 1463–1478 (2019).
36. Miozzo, J., Meunier, C., Park, S., Faure, P. & Van Noolen, L. Role and interest of hepcidin in iron homeostasis. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. **81**, 111–124 (2023).
37. Barba-Moreno, L. *et al.* Hepcidin and interleukin-6 responses to endurance exercise over the menstrual cycle. *Eur. J. Sport Sci.* **22**, 218–226 (2022).
38. Peeling, P. *et al.* Effects of Exercise on Hepcidin Response and Iron Metabolism during Recovery. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **19**, 583–597 (2009).
39. Roecker, L., Meier-Buttermilch, R., Brechtel, L., Nemeth, E. & Ganz, T. Iron-regulatory protein hepcidin is increased in female athletes after a marathon. *Eur. J. Appl. Physiol.* **95**, 569–571 (2005).
40. Sims, S. T. *et al.* High Prevalence of Iron Deficiency Exhibited in Internationally Competitive, Non-Professional Female Endurance Athletes—A Case Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **19**, 16606 (2022).
41. Kong, W.-N., Gao, G. & Chang, Y.-Z. Hepcidin and sports anemia. *Cell Biosci.* **4**, 19 (2014).
42. de Araujo, G. G., Papoti, M., de Barros Manchado, F., de Mello, M. A. R. & Gobatto, C. A. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **148**, 888–892 (2007).
43. Shimojo, G. *et al.* Exercise activates vagal induction of dopamine and attenuates systemic inflammation. *Brain. Behav. Immun.* **75**, 181–191 (2019).
44. Wrighting, D. M. & Andrews, N. C. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* **108**, 3204–3209 (2006).
45. Mughrabi, I. T. *et al.* Voltammetry in the spleen assesses real-time immunomodulatory norepinephrine release elicited by autonomic neurostimulation. *J. Neuroinflammation* **20**, 236 (2023).
46. Thakerngpol, K. *et al.* Liver injury due to iron overload in thalassemia: histopathologic and ultrastructural studies. *Biomaterials* **9**, (1996).
47. Porter, J. B. *et al.* Iron overload across the spectrum of non-transfusion-dependent thalassaemias: role of erythropoiesis, splenectomy and transfusions. *Br. J. Haematol.* **176**, 288–299 (2017).
48. Kaptanoglu, B. *et al.* Effects of Acute Exercise on the Levels of Iron, Magnesium, and Uric Acid in Liver and Spleen Tissues. *Biol. Trace Elem. Res.* **91**, 173–178 (2003).
49. Hauptman, P. J. & Mann, D. L. The vagus nerve and autonomic imbalance in heart failure: past, present, and future. *Heart Fail. Rev.* **16**, 97–99 (2011).
50. Fu, Q. & Levine, B. D. Exercise and the autonomic nervous system. in 147–160 (2013). doi:10.1016/B978-0-444-53491-0.00013-4.
51. Cousineau, D., de Champlain, J., Nadeau, R. & Péronnet, F. Plasma Catecholamines Following Low and High Doses of Ouabain in Anesthetized Dogs With or Without Cervical Vagotomy. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2**, 761–770 (1980).
52. Lavoie, J. M., Cardin, S. & Doiron, B. Influence of hepatic vagus nerve on pancreatic hormone secretion during exercise. *Am. J. Physiol. Metab.* **257**, E855–E859 (1989).
53. Verlinden, T. J. M., Rijkers, K., Hoogland, G. & Herrler, A. Morphology of the human cervical vagus nerve: implications for vagus nerve stimulation treatment. *Acta Neurol. Scand.* **133**, 173–182 (2016).
54. Gidron, Y., Perry, H. & Glennie, M. Does the vagus nerve inform the brain about preclinical tumours and modulate them? *Lancet Oncol.* **6**, 245–248 (2005).
55. Mravec, B. & Hulin, I. Does vagus nerve constitute a self-organization complexity or a ‘hidden network’? *Bratisl. Lek. Listy* **107**, 3–8 (2006).
56. Tadjore, M. *et al.* Lack of Effects of an Acute Hepatic Vagotomy on Insulin and Catecholamine Responses in Rats Following Exercise. *Arch. Physiol. Biochem.* **106**, 228–235 (1998).
57. Latour, M. G., Cardin, S., Helie, R., Yamaguchi, N. & Lavoie, J. M. Effect of hepatic vagotomy on plasma catecholamines during exercise-induced hypoglycemia. *J. Appl. Physiol.* **78**, 1629–1634 (1995).
58. Huang, Z., Tang, J. & Ji, K. Exercise prevents HFD-induced insulin resistance risk: involvement of TNF- α level regulated by vagus nerve-related anti-inflammatory pathway in the spleen. *Diabetol. Metab. Syndr.* **13**, 124 (2021).
59. Giordano, A. *et al.* White adipose tissue lacks significant vagal innervation and immunohistochemical evidence of parasympathetic innervation. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **291**, R1243–R1255 (2006).
60. Smith, D., Sarfeh, J. & Howard, L. TRUNCAL VAGOTOMY IN HYPOTHALAMIC OBESITY. *Lancet* **321**, 1330–1331 (1983).
61. Kim, H. H. Effects of vagus nerve preservation and vagotomy on peptide YY and body weight after subtotal gastrectomy. *World J. Gastroenterol.* **18**, 4044 (2012).
62. Miyato, H. *et al.* Vagus Nerve Preservation Selectively Restores Visceral Fat Volume in Patients with Early Gastric

- Cancer who Underwent Gastrectomy. *J. Surg. Res.* **173**, 60–67 (2012).
63. Miyato, H., Kitayama, J. & Nagawa, H. Vagus nerve preservation results in visceral fat maintenance after distal gastrectomy. *Hepatogastroenterology*. **59**, 1299–301 (2012).
 64. Scherer, T. *et al.* Brain Insulin Controls Adipose Tissue Lipolysis and Lipogenesis. *Cell Metab.* **13**, 183–194 (2011).
 65. Siqueira, B. S. *et al.* Vagotomy and Splenectomy Reduce Insulin Secretion and Interleukin-1 β . *Pancreas* **50**, 607–616 (2021).
 66. Holland, J. *et al.* A Brain-Melanocortin-Vagus Axis Mediates Adipose Tissue Expansion Independently of Energy Intake. *Cell Rep.* **27**, 2399–2410.e6 (2019).
 67. Nielsen, H. B. *et al.* Splenectomy impairs lymphocytosis during maximal exercise. *Am. J. Physiol.* **272**, R1847–52 (1997).
 68. Shephard, R. J. Responses of the human spleen to exercise. *J. Sports Sci.* **34**, 929–36 (2016).
 69. da Silva, R. de N. O. *et al.* Immune spleen cells attenuate the inflammatory profile of the mesenteric perivascular adipose tissue in obese mice. *Sci. Rep.* **11**, 11153 (2021).
 70. Ma, W., Jia, L., Xiong, Q., Feng, Y. & Du, H. The role of iron homeostasis in adipocyte metabolism. *Food Funct.* **12**, 4246–4253 (2021).
 71. Deschemin, J.-C. *et al.* HePCidin deficiency in mice impairs white adipose tissue browning possibly due to a defect in de novo adipogenesis. *Sci. Rep.* **13**, 12794 (2023).

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Neste estudo, demonstrou-se que a ausência do NV e do baço favorecem a redução da massa do TAB subcutâneo e visceral, diminuindo o tamanho dos adipócitos em ratos exercitados, exercendo uma resposta antiadiposidade mais potente do que apenas o exercício, cujos efeitos são independentes da oscilação nos níveis circulantes de ferro ou hepcidina.

Esses achados são inéditos e apontam um novo mecanismo fisiológico importante para o controle da massa adiposa durante o exercício e ampliam os questionamentos sobre o papel do eixo ferro-hepcidina nesse contexto.

Explorar esses mecanismos pode estabelecer novos treinamentos, técnicas cirúrgicas ou mesmo possibilitar novas ferramentas farmacológicas que auxiliem a manutenção da massa adiposa, em especial em condições de distúrbios metabólicos como obesidade e câncer.

7. REFERÊNCIAS

AI, X M; HO, L C; HAN, L L; LU, J J; YUE, X; YANG, N Y. The role of splenectomy in lipid metabolism and atherosclerosis (AS). **Lipids in Health and Disease**, v. 17, n. 1, p. 186, 16 dez. 2018.

ATAKAN, M M; KOŞAR, Ş N; GÜZEL, Y; TIN, H T; YAN, X. The Role of Exercise, Diet, and Cytokines in Preventing Obesity and Improving Adipose Tissue. **Nutrients**, v. 13, n. 5, p. 1459, 25 abr. 2021.

AZEVEDO, L M; SILVA, L G O; SOUSA, J C S; FECCHIO, R Y; BRITO, L C; FORJAZ, C L M. Exercício físico e pressão arterial: efeitos, mecanismos, influências e implicações na hipertensão arterial. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 29, n. 4, p. 415–422, 20 dez. 2019.

BALBO, S L; GRASSIOLLI, S; RIBEIRO, R A; BONFLEUR, M L; GRAVENA, C; BRITO, M DO N; ANDREAZZI, A E; MATHIAS, P C; 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, 6 abr. 2007.

BANZET, S; SANCHEZ, H; CHAPOT, R; BIGARD, X; VAULONT, S; KOULMANN, N. Interleukin-6 contributes to hepcidin mRNA increase in response to exercise. **Cytokine**, v. 58, n. 2, p. 158–161, maio 2012.

BEKRI, S; GUAL, P; ANTY, R; LUCIANI, N; DAHMAN, M; RAMESH, B; IANNELLI, A; STACCINI-MYX, A; CASANOVA, D; BEN AMOR, I; SAINT-PAUL, M C; HUET, P M; SADOUL, J L; GUGENHEIM, J; SRAI, S K; TRAN, A; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y. Increased Adipose Tissue Expression of Hepcidin in Severe Obesity Is Independent From Diabetes and NASH. **Gastroenterology**, v. 131, n. 3, p. 788–796, set. 2006.

BELANGER, M J.; RAO, P; ROBBINS, J M. Exercise, Physical Activity, and Cardiometabolic Health. **Cardiology in Review**, v. 30, n. 3, p. 134–144, 2 maio 2022.

BILLESBØLLE, C B; AZUMAYA, C M; KRETSCH, R C; POWERS, A S; GONEN, S; SCHNEIDER, S; ARVEDSON, T; DROR, R O; CHENG, Y; MANGLIK, A. Structure of hepcidin-bound ferroportin reveals iron homeostatic mechanisms. **Nature**, v. 586, n. 7831, p. 807–811, 29 out. 2020.

BOGDAN, A R; MIYAZAWA, M; HASHIMOTO, K; TSUJI, Y. Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 274–286, mar. 2016.

BROWNING, K N; VERHEIJEN, S; BOECKXSTAENS, G. E. The Vagus Nerve in Appetite Regulation, Mood, and Intestinal Inflammation. **Gastroenterology**, v. 152, n. 4, p. 730–744, mar. 2017.

CAMASCHELLA, C; NAI, A; SILVESTRI, L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. **Haematologica**, v. 105, n. 2, p. 260–272, fev. 2020.

CANALI, S; VECCHI, C; GARUTI, C; MONTOSI, G; BABITT, J L; PIETRANGELO, A. The SMAD Pathway Is Required for Hepcidin Response During Endoplasmic Reticulum Stress. **Endocrinology**, v. 157, n. 10, p. 3935–3945, out. 2016.

CARVALHO, M C de; BARACAT, E C E; SGARBIERI, V C. Anemia ferropriva e anemia de doença crônica: distúrbios do metabolismo de ferro. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, SP, v. 13, n. 2, p. 54–63, 2015.

CASLIN, H L; BHANOT, M; BOLUS, W R; HASTY, A H. Adipose tissue macrophages: Unique polarization and bioenergetics in obesity. **Immunological Reviews**, v. 295, n. 1, p. 101–113, maio 2020.

CHENG, R; DHORAJIA, V V; KIM, J; KIM, Y. Mitochondrial iron metabolism and neurodegenerative diseases. **NeuroToxicology**, v. 88, p. 88–101, jan. 2022.

CHUNG, B; MATAK, P; MCKIE, A T; SHARP, P. Leptin Increases the Expression of the Iron Regulatory Hormone Hepcidin in HuH7 Human Hepatoma Cells. **The Journal**

of Nutrition, v. 137, n. 11, p. 2366–2370, nov. 2007.

CORE, A B; CANALI, S.; BABITT, J. L. Hemojuvelin and bone morphogenetic protein (BMP) signaling in iron homeostasis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, 13 maio 2014.

DEL GIUDICE, E M; SANTORO, N; AMATO, A; BRIENZA, C; CALABRÒ, P; WIEGERINCK, E T; CIRILLO, G; TARTAGLIONE, N; GRANDONE, A; SWINKELS, D W; PERRONE, L. Hepcidin in Obese Children as a Potential Mediator of the Association between Obesity and Iron Deficiency. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 12, p. 5102–5107, 1 dez. 2009.

DUTT, S; HAMZA, I; BARTNIKAS, T B. Molecular Mechanisms of Iron and Heme Metabolism. **Annual Review of Nutrition**, v. 42, n. 1, p. 311–335, 22 ago. 2022.

EMS, T; LUCIA, K S; HUECKER, M R. 2023 Apr 17. In: StatPearls [Internet]. **Treasure Island (FL): StatPearls Publishing**; 2023 Jan–. PMID: 28846259.

FENG, J; LI, L; OU, Z; LI, Q; GONG, B; ZHAO, Z; QI, W; ZHOU, T; ZHONG, J; CAI, W; YANG, X; ZHAO, A; GAO, G; YANG, Z. IL-25 stimulates M2 macrophage polarization and thereby promotes mitochondrial respiratory capacity and lipolysis in adipose tissues against obesity. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 15, n. 5, p. 493–505, 13 maio 2018.

FONSECA-ALANIZ, M H; TAKADA, J; ALONSO-VALE, M I C; LIMA, F B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de Pediatria**, v. 0, n. 0, 6 nov. 2007.

GANZ, T. Systemic Iron Homeostasis. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 4, p. 1721–1741, out. 2013.

GOODNOUGH, J B; RAMOS, E; NEMETH, E; GANZ, T. Inhibition of hepcidin transcription by growth factors. **Hepatology**, v. 56, n. 1, p. 291–299, jul. 2012.

GOTOH, K; INOUE, M; MASAKI, T; CHIBA, S; SHIMASAKI, T; ANDO, H; FUJIWARA,

K; KATSURAGI, I; KAKUMA, T; SEIKE, M; SAKATA, T; YOSHIMATSU, H. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced hypothalamic inflammation. **Journal of Neurochemistry**, v. 120, n. 5, p. 752–764, mar. 2012.

GROTTO, H Z W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, out. 2008.

GROTTO, H Z W. Fisiologia e metabolismo do ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 08–17, jun. 2010.

GUO, W; BACHMAN, E; LI, M; ROY, C N; BLUSZTAJN, J; WONG, S; CHAN, S Y; SERRA, C; JASUJA, R; TRAVISON, T G; MUCKENTHALER, M U; NEMETH, E; BHASIN, S. Testosterone administration inhibits hepcidin transcription and is associated with increased iron incorporation into red blood cells. **Aging Cell**, v. 12, n. 2, p. 280–291, abr. 2013.

GUYTON, A C; HALL, J E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HASCHKA, D; HOFFMANN, A; WEISS, G. Iron in immune cell function and host defense. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 115, p. 27–36, jul. 2021.

HILTON, C; SABARATNAM, R; DRAKESMITH, H; KARPE, F. Iron, glucose and fat metabolism and obesity: an intertwined relationship. **International Journal of Obesity**, v. 47, n. 7, p. 554–563, 7 jul. 2023.

HSU, M Y; MINA, E; ROETTO, A; PORPORATO, P E. Iron: An Essential Element of Cancer Metabolism. **Cells**, v. 9, n. 12, p. 2591, 3 dez. 2020.

HUNT, J. R. Bioavailability of iron, zinc, and other trace minerals from vegetarian diets. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 3, p. 633S-639S, set. 2003.

INSTITUTE OF MEDICINE (US). Panel on Micronutrients. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington (DC): National Academies Press (US); 2001.

JUNQUEIRA, L C U; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2013. v. 1

KIBA, T, *et al.* Ventromedial hypothalamic lesion-induced vagal hyperactivity stimulates rat pancreatic cell proliferation. **Gastroenterology** **110**, 885–893 (1996).

KOLEINI, N; SHAPIRO, J S; GEIER, J; ARDEHALI, H. Ironing out mechanisms of iron homeostasis and disorders of iron deficiency. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 11, 1 jun. 2021.

KONG, W-N.; GAO, G; CHANG, Y-Z. Hepcidin and sports anemia. **Cell & Bioscience**, v. 4, n. 1, p. 19, 14 dez. 2014.

KONG, N W; CUI, Y; FU, Y J; LEI, Y; CI, Y; BAO, Y; ZHAO, S; XIE, L; CHANG, Y Z; ZHAO, S E. The α 1-adrenergic receptor is involved in hepcidin upregulation induced by adrenaline and norepinephrine via the STAT3 pathway. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 7, p. 5517–5527, 6 jul. 2018.

KRAUSE, A; NEITZ, S; MÄGERT, H J; SCHULZ, A; FORSSMANN, W G; SCHULZ-KNAPPE, P; ADERMANN, K. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. **FEBS Letters**, v. 480, n. 2–3, p. 147–150, 1 set. 2000.

KRESSEL, A M; TSAAVA, T; LEVINE, Y A; CHANG, E H; ADDORISIO, M E; CHANG, Q; BURBACH, B J; CARNEVALE, D; LEMBO, G; ZADOR, A M; ANDERSSON, U; PAVLOV, V A; CHAVAN, S S; TRACEY, K J. Identification of a brainstem locus that inhibits tumor necrosis factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 47, p. 29803–29810, 24 nov. 2020.

KRIEGER, E M; BRUM, P C; NEGRÃO, C E. State-of-the-Art Lecture. **Hypertension**,

v. 34, n. 4, p. 720–723, out. 1999.

KULAKSIZ, H; FEIN, E; REDECKER, P; STREMMEL, W; ADLER, G; CETIN, Y. Pancreatic β -cells express hepcidin, an iron-uptake regulatory peptide. **Journal of Endocrinology**, v. 197, n. 2, p. 241–249, maio 2008.

KUCHLER, J C; SIQUEIRA, B S; CEGLAREK, V M; CHASKO, F V; MOURA, I C; SCZEPANHAK, B F; VETTORAZZI, J F; BALBO, S L; GRASSIOLLI, S. The vagus nerve and spleen: influence on white adipose mass and histology of obese and non-obese rats. **Front Physiol**, v. 12, p. 672027, Jun. 2021.

LARSUPHROM, P; LATUNDE-DADA, G O. association of serum hepcidin levels with aerobic and resistance exercise: a systematic review. **Nutrients**, v. 13, n. 2, p. 393, 27 jan. 2021.

LEHR, S; HARTWIG, S; LAMERS, D; FAMULLA, S; MÜLLER, S; HANISCH, F G; CUVELIER, C; RUIGE, J; ECKARDT, K; OUWENS, D M; SELL, H; ECKEL, J. Identification and Validation of Novel Adipokines Released from Primary Human Adipocytes. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 1, p. M111.010504, jan. 2012.

LEWIS, S M; WILLIAMS, A; EISENBARTH, S C. Structure and function of the immune system in the spleen. **Science Immunology**, v. 4, n. 33, 22 mar. 2019.

LI, X, RHEE, D K; MALHOTRA, R; MAYEUR, C; HURST, L A; AGER, E; SHELTON, G; KRAMER, Y; MCCULLOH, D; KEEFE, D; BLOCH, K D; BLOCH, D B; PETERSON, R T. Progesterone receptor membrane component-1 regulates hepcidin biosynthesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 1, p. 389–401, 14 dez. 2015.

LI, Y; HUANG, X; WANG, J; HUANG, R; WAN, D. Regulation of Iron Homeostasis and Related Diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2020, p. 1–11, 2 maio 2020.

LINDGREN, M; BÖRJESSON, M. The importance of physical activity and cardiorespiratory fitness for patients with heart failure. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 176, p. 108833, jun. 2021.

LIU, Y Q; CHANG, Y Z; ZHAO, B; WANG, H; DUAN, X L. Does Hepatic Hepcidin Play an Important Role in Exercise-Associated Anemia in Rats? **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 21, n. 1, p. 19–26, fev. 2011.

LORI, A; PERROTTA, M; LEMBO, G; CARNEVALE, D. The Spleen: A Hub Connecting Nervous and Immune Systems in Cardiovascular and Metabolic Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1216, 7 jun. 2017.

MESSINA, G; VALENZANO, A; MOSCATELLI, F; SALERNO, M; LONIGRO, A; ESPOSITO, T; MONDA, V; CORSO, G; MESSINA, A; VIGGIANO, A; TRIGGIANI, AI; CHIEFFI, S; GUGLIELMI, G; MONDA, M; CIBELLI, G. Role of Autonomic Nervous System and Orexinergic System on Adipose Tissue. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 10 mar. 2017.

MIHAYLOVA, S; SCHWEIGHÖFER, H; HACKSTEIN, H; ROSENGARTEN, B. Effects of anti-inflammatory vagus nerve stimulation in endotoxemic rats on blood and spleen lymphocyte subsets. **Inflammation Research**, v. 63, n. 8, p. 683–690, 7 ago. 2014

MOORE, K L; DALLEY, A F; AGUR, A M R. **Anatomia orientada para a clínica**. 8. ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2019. v. 1

MUCKENTHALER, M U; RIVELLA, S; HENTZE, M W; GALY, B. A Red Carpet for Iron Metabolism. **Cell**, v. 168, n. 3, p. 344–361, jan. 2017.

NAGELKERKE, S Q; BRUGGEMAN, C W; DEN HAAN, J M M; MUL, E P J; VAN DEN BERG T K; VAN BRUGGEN, R; KUIJPERS, T W. Red pulp macrophages in the human spleen are a distinct cell population with a unique expression of Fc-γ receptors. **Blood Advances**, v. 2, n. 8, p. 941–953, 24 abr. 2018.

NAKAMURA, K; MORI, F; TOMOYA, K; TANJI, K. MIKI, Y; TOMIYAMA, M; KUROTAKE, H; TOYOSHIMA, Y; KAKITA, A; TAKAHASHI, H; UAMADA, M; WAKABAYASHI, K. Filamentous aggregations of phosphorylated α-synuclein in Schwann cells (Schwann cell cytoplasmic inclusions) in multiple system atrophy. **Acta**

Neuropathologica Communications, v. 3, n. 1, p. 29, 21 dez. 2015.

NEMETH, E; GANZ, T. Hepcidin-Ferroportin Interaction Controls Systemic Iron Homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6493, 17 jun. 2021.

NEMETH, E; GANZ, T. Hepcidin and Iron in Health and Disease. **Annual Review of Medicine**, v. 74, n. 1, p. 261–277, 27 jan. 2023.

NOGUEIRA-DE-ALMEIDA, C A; UED, F D V; DEL CIAMPO, L A; MARTINEZ, E Z; FERRAZ, I S; CONTINI, A A; CRUZ, F C S D; SILVA, R F B; NOGUEIRA-DE-ALMEIDA, M E; LAMOUNIER, J A. Prevalence of childhood anaemia in Brazil: still a serious health problem: a systematic review and meta-analysis. **Public Health Nutrition**, v. 24, n. 18, p. 6450–6465, 2 dez. 2021.

OUCHI, N; PARKER, J L; LUGUS, J J; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 85–97, 21 fev. 2011.

PARK, C H; VALORE, E V; WARING, A J; GANZ, T. Hepcidin, a Urinary Antimicrobial Peptide Synthesized in the Liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 11, p. 7806–7810, mar. 2001.

PAVLOV, V A; CHAVAN, S S; TRACEY, K J. Molecular and Functional Neuroscience in Immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 36, n. 1, p. 783–812, 26 abr. 2018.

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. 743–754, 21 dez. 2012.

PEDERSEN, B K. The disease of physical inactivity - and the role of myokines in muscle-fat cross talk. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 23, p. 5559–5568, 1 dez. 2009.

PERAKAKIS, N; FARR, O M; MANTZOROS, C.S. Leptin in Leanness and Obesity. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 77, n. 6, p. 745–760, fev. 2021.

PIGEON, C; ILYIN, G; COURSELAUD, B; LEROYER, P; TURLIN, B; BRISSOT, P; LORÉAL, O A. New Mouse Liver-specific Gene, Encoding a Protein Homologous to Human Antimicrobial Peptide Hecidin, Is Overexpressed during Iron Overload. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 11, p. 7811–7819, mar. 2001.

PINTO, G. M. Deficiência de ferro: resistência ou suscetibilidade a infecções? **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 18, n. 3, p. 191–196, 2008.

POHANKA, M. Pharmacological Influencing of The Cholinergic Anti-inflammatory Pathway in Infectious Diseases and Inflammatory Pathologies. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 660–669, abr. 2021.

QIAN, Z M; XIAO, D S; TANG, P L; YAO, F Y; LIAO, Q K. Increased expression of transferrin receptor on membrane of erythroblasts in strenuously exercised rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 87, n. 2, p. 523–529, 1 ago. 1999.

QIAO, B; SUGIANTO, P; FUNG, E; DEL-CASTILLO-RUEDA, A; MORAN-JIMENEZ, M J; GANZ, T; NEMETH, E. Hecidin-Induced Endocytosis of Ferroportin Is Dependent on Ferroportin Ubiquitination. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 6, p. 918–924, jun. 2012.

QIU, A; JANSEN, M; SAKARIS, A; MIN, S H; CHATTOPADHYAY, S; TSAI, E; SANDOVAL, C; ZHAO, R; AKABAS, M H; GOLDMAN, I D. Identification of an Intestinal Folate Transporter and the Molecular Basis for Hereditary Folate Malabsorption. **Cell**, v. 127, n. 5, p. 917–928, dez. 2006.

QUEIROZ, J CF DE; ALONSO-VALE, M I C; CURI, R; LIMA, F B. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 582–594, jul. 2009.

RAJAGOPAL, A; RAO, A U; AMIGO, J; TIAN, M; UPADHYAY, S K; HALL, C; UHM, S; MATHEW, M K; FLEMING, M D; PAW, B H; KRAUSE, M; HAMZA, I. Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins.

Nature, v. 453, n. 7198, p. 1127–1131, 16 jun. 2008.

REEDER, B J; WILSON, M T. Hemoglobin and Myoglobin Associated Oxidative Stress: from Molecular Mechanisms to Disease States. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 23, p. 2741–2751, 1 nov. 2005.

REN, Y; ZHAO, H; YIN, C; LAN, X; WU, L; DU, X; GRIFFITHS, H R; GAO, D. Adipokines, Hepatokines and Myokines: Focus on Their Role and Molecular Mechanisms in Adipose Tissue Inflammation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, 14 jul. 2022.

RIBEIRO, M,G; LIMA, S,R. **Iniciação às técnicas de preparação de material para estudo e pesquisa em morfologia**. Belo Horizonte: Segrac Editora. 2000.

RISHI, G; WALLACE, D F; SUBRAMANIAM, V N. Hepcidin: regulation of the master iron regulator. **Bioscience Reports**, v. 35, n. 3, 1 jun. 2015.

ROSAS-BALLINA, M; OCHANI, M; PARRISH, W R; OCHANI, K; HARRIS, Y T; HUSTON, J M; CHAVAN, S; 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, 5 ago. 2008.

ROSAS-BALLINA, M; TRACEY, K J. The Neurology of the Immune System: Neural Reflexes Regulate Immunity. **Neuron**, v. 64, n. 1, p. 28–32, out. 2009.

ROSS, S L; TRAN, L; WINTERS, A; LEE, K J; PLEWA, C; FOLTZ, I; KING, C; MIRANDA, L P; ALLEN, J; BECKMAN, H; COOKE, K S; MOODY, G; SASU, B J; NEMETH, E; GANZ, T; MOLINEUX, G; ARVEDSON, T L. Molecular Mechanism of Hepcidin-Mediated Ferroportin Internalization Requires Ferroportin Lysines, Not Tyrosines or JAK-STAT. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 6, p. 905–917, jun. 2012.

ROUGHEAD, Z K (FARIBA); ZITO, C A; HUNT, J R. Initial uptake and absorption of nonheme iron and absorption of heme iron in humans are unaffected by the addition of calcium as cheese to a meal with high iron bioavailability. **The American Journal**

of **Clinical Nutrition**, v. 76, n. 2, p. 419–425, ago. 2002.

RUEGSEGGER, G N; BOOTH, F W. Health Benefits of Exercise. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 7, p. a029694, jul. 2018.

RUGGIERO, A D; KEY, C-C C; KAVANAGH, K. Adipose Tissue Macrophage Polarization in Healthy and Unhealthy Obesity. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, 17 fev. 2021.

SAKERS, A; SIQUEIRA, M K; SEALE, P; VILLANUEVA, C J. Adipose-tissue plasticity in health and disease. **Cell**, v. 185, n. 3, p. 419–446, fev. 2022.

SANGKHAE, V; NEMETH, E. Regulation of the Iron Homeostatic Hormone Hepcidin. **Advances in Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 126–136, jan. 2017.

SEOANE-COLLAZO, P; FERNØ, J; GONZALEZ, F; DIÉGUEZ, C; LEIS, R; NOGUEIRAS, R; LÓPEZ, M. Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. **Endocrine**, v. 50, n. 2, p. 276–291, 19 nov. 2015.

SHAYEGHI, M; LATUNDE-DADA, G O; OAKHILL, J S; LAFTAH, A H; TAKEUCHI, K; HALLIDAY, N; KHAN, Y; WARLEY, A; MCCANN, F E; HIDER, R C; FRAZER, D M; ANDERSON, G J; VULPE, C D; SIMPSON, R J; MCKIE, A T. Identification of an Intestinal Heme Transporter. **Cell**, v. 122, n. 5, p. 789–801, set. 2005.

SIQUEIRA, B S; CEGLAREK, V M; GOMES, E C Z; VETTORAZZI, J F; RENTZ, T; NENEVÊ, J Z; VOLINSKI, K Z; MORAES, S S; MALTA, A; MATHIAS, P C DE F; EMÍLIO, H R DE; BALBO, S L; GRASSIOLLI, S. Vagotomy and Splenectomy Reduce Insulin Secretion and Interleukin-1 β . **Pancreas**, v. 50, n. 4, p. 607–616, abr. 2021

SKARPAŃSKA-STEJNBORN, A; BASTA, P; TRZECIAK, J; SZCZEŚNIAK-PILACZYŃSKA, Ł. Effect of intense physical exercise on hepcidin levels and selected parameters of iron metabolism in rowing athletes. **European Journal of Applied Physiology**, v. 115, n. 2, p. 345–351, 14 fev. 2015.

SOARES, M P; HAMZA, I. Macrophages and Iron Metabolism. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 492–504, mar. 2016.

SUKHBAATAR, N; WEICHHART, T. Iron Regulation: Macrophages in Control. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 4, p. 137, 14 dez. 2018.

SZKLARZ, M; GONTARZ-NOWAK, K; MATUSZEWSKI, W; BANDURSKA-STANKIEWICZ, E. “Ferrocrinology”—Iron Is an Important Factor Involved in Gluco- and Lipocrinology. **Nutrients**, v. 14, n. 21, p. 4693, 6 nov. 2022.

THOMPSON, D; KARPE, F; LAFONTAN, M; FRAYN, K. Physical Activity and Exercise in the Regulation of Human Adipose Tissue Physiology. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 1, p. 157–191, jan. 2012.

TIAN, Y; TIAN, Y; YUAN, Z; ZENG, Y; WANG, S; FAN, X; YANG, D; YANG, M. Iron Metabolism in Aging and Age-Related Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, p. 3612, 25 mar. 2022.

VOGT, A-C S; ARSIWALA, T; MOHSEN, M; VOGEL, M; MANOLOVA, V; BACHMANN, M F. On Iron Metabolism and Its Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4591, 27 abr. 2021.

WANG, C-Y.; BABITT, J. L. Liver iron sensing and body iron homeostasis. **Blood**, v. 133, n. 1, p. 18–29, 3 jan. 2019.

WEDELL-NEERGAARD, A.-S; LEHRSKOV, L L; CHRISTENSEN, R H; LEGAARD, G E; DORPH, E; LARSEN, M K; LAUNBO, N; FAGERLIND, S R; SEIDE, S K; NYMAND, S; BALL, M; VINUM, N; DAHL, C N; HENNEBERG, M; RIED-LARSEN, M; NYBING, J D; CHRISTENSEN, R; ROSENMEIER, J,B; KARSTOFT, K; PEDERSEN, B K; ELLINGSGAARD, H; KROGH-MADSEN, R. Exercise-Induced Changes in Visceral Adipose Tissue Mass Are Regulated by IL-6 Signaling: A Randomized Controlled Trial. **Cell Metabolism**, v. 29, n. 4, p. 844- 855.e3, abr. 2019.

WEI, Y; WANG, T; LIAO, L; FAN, X; CHANG, L; HASHIMOTO, K. Brain-spleen axis in

health and diseases: A review and future perspective. **Brain Research Bulletin**, v. 182, p. 130–140, maio 2022.

WHITE, C; YUAN, X; SCHMIDT, P J; BRESCIANI, E; SAMUEL, T K; CAMPAGNA, D; HALL, C; BISHOP, K; CALICCHIO, M L; LAPIERRE, A; WARD, D M; LIU, P; FLEMING, M D; HAMZA, I. HRG1 Is Essential for Heme Transport from the Phagolysosome of Macrophages during Erythrophagocytosis. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 261–270, fev. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control. A guide for programme managers. Geneva: World Health Organization; 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Nutritional Anemias: Tools for Effective Prevention and Control. Geneva: World Health Organization, 2017.

WOZNIAK, S E; GEE, L L; WACHTEL, M S; FREZZA, E E. Adipose Tissue: The New Endocrine Organ? A Review Article. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 54, n. 9, p. 1847–1856, 4 set. 2009.

WU, L; PAREKH, V V; HSIAO, J; KITAMURA, D; VAN KAER, L. 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, 28 out. 2014.

WUNDERER, F; TRAEGER, L; SIGURSLID, H H; MEYBOHM, P; BLOCH, D B; MALHOTRA, R. The role of hepcidin and iron homeostasis in atherosclerosis. **Pharmacological Research**, v. 153, p. 104664, mar. 2020.

ZEIDAN, R S; HAN, S M; LEEUWENBURGH, C; XIAO, R. Iron homeostasis and organismal aging. **Ageing Research Reviews**, v. 72, p. 101510, dez. 2021.

ZHANG, Y; CHUA, S. Leptin Function and Regulation. In: **Comprehensive Physiology**. [s.l.] Wiley, 2017. p. 351–369.

APÊNDICE

A- Etiquetas das caixas da prole

PROJETO FERRO E NATAÇÃO	PROJETO FERRO E NATAÇÃO	PROJETO FERRO E NATAÇÃO
ID Mãe: _____ Data nascimento: ____/____/____ Espécie: Ratos Wistar Sexo: Fêmea Total de filhotes: _____ M: _____ F: _____ N de filhotes: _____ MSG ☐ CTRL ☐ () Aplicação: <u>1</u>() 2() 3() 4() 5() Responsável: Giovana Tessaro Orientadora: Sabrina Grassioli	ID Mãe: _____ Data nascimento: ____/____/____ Espécie: Ratos Wistar Sexo: Fêmea Total de filhotes: _____ M: _____ F: _____ N de filhotes: _____ MSG ☐ CTRL ☐ () Aplicação: <u>1</u>() 2() 3() 4() 5() Responsável: Giovana Tessaro Orientadora: Sabrina Grassioli	ID Mãe: _____ Data nascimento: ____/____/____ Espécie: Ratos Wistar Sexo: Fêmea Total de filhotes: _____ M: _____ F: _____ N de filhotes: _____ MSG ☐ CTRL ☐ () Aplicação: <u>1</u>() 2() 3() 4() 5() Responsável: Giovana Tessaro Orientadora: Sabrina Grassioli
ID Mãe: _____ Data nascimento: ____/____/____ Espécie: Ratos Wistar Sexo: Fêmea Total de filhotes: _____ M: _____ F: _____ N de filhotes: _____ MSG ☐ CTRL ☐ () Aplicação: <u>1</u>() 2() 3() 4() 5() Responsável: Giovana Tessaro Orientadora: Sabrina Grassioli	ID Mãe: _____ Data nascimento: ____/____/____ Espécie: Ratos Wistar Sexo: Fêmea Total de filhotes: _____ M: _____ F: _____ N de filhotes: _____ MSG ☐ CTRL ☐ () Aplicação: <u>1</u>() 2() 3() 4() 5() Responsável: Giovana Tessaro Orientadora: Sabrina Grassioli	ID Mãe: _____ Data nascimento: ____/____/____ Espécie: Ratos Wistar Sexo: Fêmea Total de filhotes: _____ M: _____ F: _____ N de filhotes: _____ MSG ☐ CTRL ☐ () Aplicação: <u>1</u>() 2() 3() 4() 5() Responsável: Giovana Tessaro Orientadora: Sabrina Grassioli
ID Mãe: _____ Data nascimento: ____/____/____ Espécie: Ratos Wistar Sexo: Fêmea Total de filhotes: _____ M: _____ F: _____ N de filhotes: _____ MSG ☐ CTRL ☐ () Aplicação: <u>1</u>() 2() 3() 4() 5() Responsável: Giovana Tessaro Orientadora: Sabrina Grassioli	ID Mãe: _____ Data nascimento: ____/____/____ Espécie: Ratos Wistar Sexo: Fêmea Total de filhotes: _____ M: _____ F: _____ N de filhotes: _____ MSG ☐ CTRL ☐ () Aplicação: <u>1</u>() 2() 3() 4() 5() Responsável: Giovana Tessaro Orientadora: Sabrina Grassioli	ID Mãe: _____ Data nascimento: ____/____/____ Espécie: Ratos Wistar Sexo: Fêmea Total de filhotes: _____ M: _____ F: _____ N de filhotes: _____ MSG ☐ CTRL ☐ () Aplicação: <u>1</u>() 2() 3() 4() 5() Responsável: Giovana Tessaro Orientadora: Sabrina Grassioli

B- Etiqueta das caixas dos animais desmamados

PROJETO FERRO E NATAÇÃO	PROJETO FERRO E NATAÇÃO	PROJETO FERRO E NATAÇÃO
ID Mãe: _____ Data nascimento: ____/____/____ ID Caixa: _____ PND21: ____/____ PND60: ____/____ PND80: ____/____ Grupo: () CTRL () MSG Natação: () sim () Não Cirurgia: () SHAM () VAG () SPL () VAG+SPL Identificação: I _____ III _____ II _____ Ø _____ Responsável: Giovana Tessaro Orientadora: Sabrina Grassioli	ID Mãe: _____ Data nascimento: ____/____/____ ID Caixa: _____ PND21: ____/____ PND60: ____/____ PND80: ____/____ Grupo: () CTRL () MSG Natação: () sim () Não Cirurgia: () SHAM () VAG () SPL () VAG+SPL Identificação: I _____ III _____ II _____ Ø _____ Responsável: Giovana Tessaro Orientadora: Sabrina Grassioli	ID Mãe: _____ Data nascimento: ____/____/____ ID Caixa: _____ PND21: ____/____ PND60: ____/____ PND80: ____/____ Grupo: () CTRL () MSG Natação: () sim () Não Cirurgia: () SHAM () VAG () SPL () VAG+SPL Identificação: I _____ III _____ II _____ Ø _____ Responsável: Giovana Tessaro Orientadora: Sabrina Grassioli
ID Mãe: _____ Data nascimento: ____/____/____ ID Caixa: _____ PND21: ____/____ PND60: ____/____ PND80: ____/____ Grupo: () CTRL () MSG Natação: () sim () Não Cirurgia: () SHAM () VAG () SPL () VAG+SPL Identificação: I _____ III _____ II _____ Ø _____ Responsável: Giovana Tessaro Orientadora: Sabrina Grassioli	ID Mãe: _____ Data nascimento: ____/____/____ ID Caixa: _____ PND21: ____/____ PND60: ____/____ PND80: ____/____ Grupo: () CTRL () MSG Natação: () sim () Não Cirurgia: () SHAM () VAG () SPL () VAG+SPL Identificação: I _____ III _____ II _____ Ø _____ Responsável: Giovana Tessaro Orientadora: Sabrina Grassioli	ID Mãe: _____ Data nascimento: ____/____/____ ID Caixa: _____ PND21: ____/____ PND60: ____/____ PND80: ____/____ Grupo: () CTRL () MSG Natação: () sim () Não Cirurgia: () SHAM () VAG () SPL () VAG+SPL Identificação: I _____ III _____ II _____ Ø _____ Responsável: Giovana Tessaro Orientadora: Sabrina Grassioli
ID Mãe: _____ Data nascimento: ____/____/____ ID Caixa: _____ PND21: ____/____ PND60: ____/____ PND80: ____/____ Grupo: () CTRL () MSG Natação: () sim () Não Cirurgia: () SHAM () VAG () SPL () VAG+SPL Identificação: I _____ III _____ II _____ Ø _____ Responsável: Giovana Tessaro Orientadora: Sabrina Grassioli	ID Mãe: _____ Data nascimento: ____/____/____ ID Caixa: _____ PND21: ____/____ PND60: ____/____ PND80: ____/____ Grupo: () CTRL () MSG Natação: () sim () Não Cirurgia: () SHAM () VAG () SPL () VAG+SPL Identificação: I _____ III _____ II _____ Ø _____ Responsável: Giovana Tessaro Orientadora: Sabrina Grassioli	ID Mãe: _____ Data nascimento: ____/____/____ ID Caixa: _____ PND21: ____/____ PND60: ____/____ PND80: ____/____ Grupo: () CTRL () MSG Natação: () sim () Não Cirurgia: () SHAM () VAG () SPL () VAG+SPL Identificação: I _____ III _____ II _____ Ø _____ Responsável: Giovana Tessaro Orientadora: Sabrina Grassioli

C - Tabela para controle de evolução corporal semanal do roedor

Semana	Evolução Peso Corporal CONTROLE									
	CTRL 1	CTRL 2	CTRL 3	CTRL 4	CTRL 5	CTRL 6	CTRL 7	CTRL 8	CTRL 9	CTRL 10
1ª										
2ª										
3ª										
4ª										
5ª										
6ª										
7ª										
8ª										
9ª										
10ª										
11ª										
12ª										
13ª										
14ª										
15ª										
16ª										
17ª										
18ª										

ANEXO

A- Autorização do comitê de Ética no Uso de Animais para execução do projeto



Autorização

O Protocolo nº 16-22 intitulado "**A participação esplênica e vagal nos efeitos antiobesidades do exercício físico: um possível papel na homeostase do ferro**", sob a responsabilidade de **Sabrina Grassiolli**, 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 03/02/2023. Essa Autorização não substitui o Certificado Experimental de realização ética da pesquisa, necessitando do encaminhamento do Relatório Final de execução do Projeto para sua emissão.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	04/02/2023 – 01/08/2025
Espécie/linhagem/raça	Rattus Norvegicus albinus (linhagem Wistar)
N. de animais	40
Peso/idade	150-200g (prenhas)
Sexo	Feminino
Origem	Biotério Central da UNIOESTE – Campus de Cascavel.

Cascavel, 03/02/2023.

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2752/2020-GRE

B- Comprovante de submissão de artigo na revista *Nutrients*

[Nutrients] Manuscript ID: nutrients-3453096 - Submission Received Caixa de entrada x

Editorial Office <nutrients@mdpi.com>
para Sabrina, mim, Caroline, Ellen, Amanda, Eveline, Matheus, Bruna, Elizangela, Beatriz, Mariana

ter., 14 de jan., 16:05

Traduza para o português

Dear Mrs. Tessaro, Mrs. Grassioli,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: *Nutrients*
Manuscript ID: nutrients-3453096
Type of manuscript: Article
Title: Vagus nerve and spleen modulates hepcidin plasma levels and white tissue mass in male Wistar rats submitted to swimming training
Authors: Giovana Fanhani Tessaro *, Caroline Maman Oldra, Ellen Carolina Zawoski Gomes, Amanda Rocha Fujita, Eveline Cristiane Batista Schmidt Helene, Matheus Dias Martins, Bruna Schumaker Siqueira, Elizangela Vanessa Hoffmann, Beatriz Machado Daudt, Mariana Andrea Díaz Urrutia, Sabrina Grassioli *

Received: 14 Jan 2025
E-mails: gftessaro1999@gmail.com, carol.dmaman@gmail.com, carolinazawoski@gmail.com, nutriamandafujita@gmail.com, evelin.schmidt@hotmail.com, math.dmartinstkd@gmail.com, schumakerbruna@gmail.com, elivanessa2022@gmail.com, bia.daudt@hotmail.com, marianeladiazurruia@gmail.com, sgrassioli@gmail.com

We encourage you to provide an Author Biography on this publication's