




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ISAURA JAQUELINE DE LIMA BRITO

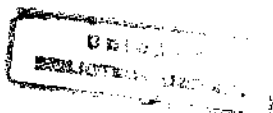
Alterações da permeabilidade ao  $Ca^{2+}$  em resposta à glicose, arginina e carbamilcolina em ilhotas de Langerhans isoladas e ao teste de tolerância à glicose e insulina de ratos com vagotomia do ramo pancreático.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Isaura Jaqueline de Lima Brito e aprovada pela Comissão Julgadora. 04/5/2000 

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular na área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Ari Gonçalves

Campinas  
2000



UNIDADE BC  
N.º CHAMADA: UNICAMP  
B777a  
V. \_\_\_\_\_ Ex. \_\_\_\_\_  
TOMBO BC/ 41408  
PROC. 278/00  
PREÇ. R\$ 11,00  
DATA 07-07-00  
N.º CPD \_\_\_\_\_

CM-00142342-6

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**Brito, Isaura Jaqueline de Lima**

**B777 a** Alterações da permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  em resposta à glicose, arginina e carbamilcolina em ilhotas de Langerhans isoladas, e ao teste de tolerância à glicose e insulina de ratos com vagotomia do ramo pancreático. / Isaura Jaqueline de Lima Brito. – Campinas, SP: [s.n], 2000. 64f.:ilus.

Orientador: Antonio Ari Gonçalves

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1. Diabetes. 2. Pâncreas. 3. Glicose. I. Gonçalves, Antonio Ari.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Data da Defesa: 04/05/2000**

**BANCA EXAMINADORA:**

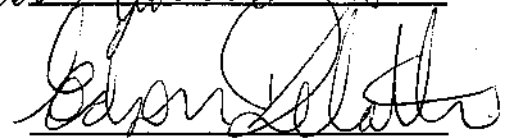
**Prof. Dr. Antonio Ari Gonçalves (Orientador)**



**Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva**



**Prof. Dr. Edson Delattre**



**Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas**

---

**Profa. Dra. Silvia Cristina Crepaldi Alves**

---

À minha mãe e ao meu pai, pela minha existência

Às minhas irmãs, pela amizade e companhia

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelas oportunidades que nos dá a cada dia...

Ao Prof. Dr. Antonio Ari Gonçalves, pela orientação, ensinamentos e amizade.

Ao meu grande amigo Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva, pela amizade, colaboração prestada no desenvolvimento do trabalho de tese e tolerância no dia a dia.

À amiga Samanta Maria Gobbo Fedrizzi, pela colaboração no estudo, incentivo e amizade.

À amiga Eunice Cristina da Silva, pela dedicação, amizade e auxílio na montagem do trabalho de tese.

Ao amigo "Tito", pela ajuda na confecção de protocolos experimentais.

À Professora Dra. Silvia Cristina Crepaldi Alves, pela atenção e auxílio na redação final da Tese.

A todos os colegas de pós Graduação, que de uma forma ou de outra contribuíram para minha formação.

A todos os funcionários e professores do Depto de Fisiologia e Biofísica.

À Josefina Sílvia, pela ajuda no experimentos e pela dedicação.

Aos meus pais, pela luta na busca de minha formação moral, religiosa e acadêmica; pelo amor e incentivo em todos os momentos de minha vida.

Às minhas irmãs, pela amizade e companherismo que nos une.

Ao órgão financiador CNPq, sem o qual não teríamos condições materiais para realização deste trabalho.

Aos professores Drs. Edson Delattre, Miguel Arcanjo Areas e Francesco Langone pela análise prévia deste trabalho.

Este trabalho foi realizado no Laboratório  
de Eletrofisiologia, Biofísica e Metabolismo no Departamento  
de Fisiologia e Biofísica- Instituto de Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas, Campinas, SP

# ÍNDICE

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>13</b>
ANIMAIS	13
CIRURGIA	13
VERIFICAÇÃO DA EFICÁCIA DA VAGOTOMIA	14
TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE ENDOVENOSO (GTT)	15
TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT)	15
DOSAGENS SÉRICAS	16
ISOLAMENTO DE ILHOTAS PARA A MEDIDA DO EFLUXO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .	16
SOLUÇÕES	18
EFLUXO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$	19
PROTOCOLO EXPERIMENTAL	19
RESPOSTA A GLICOSE	19
RESPOSTA A CARBAMILCOLINA	20
RESPOSTA A ARGININA	20
ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
<b>RESULTADOS</b>	<b>22</b>
TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE PÓS-VAGOTOMIA	22
TESTE DE TOLERÂNCIA A INSULINA	23
EFLUXO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ EM ILHOTAS ISOLADAS DE RATOS VAGOTOMIZADOS	27
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>34</b>
<b>SUMÁRIO</b>	<b>42</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>46</b>

## INTRODUÇÃO

A insulina é um hormônio capaz de diminuir a concentração de glicose no sangue. Por esta razão, déficit na liberação de insulina produz severas alterações metabólicas, como o diabetes mellitus. A insulina é liberada das células  $\beta$  de ilhotas de Langerhans. As ilhotas são um complexo de células endócrinas, onde 60 a 70 % da população celular é constituída por células  $\beta$ , secretoras de insulina; 20 a 25 %, por células  $\alpha$ , secretoras por glucagon; 10% de células  $\delta$ , secretoras de somatostatina e cerca de 1% por células PP, responsáveis pela secreção do polipeptídeo pancreático. A função de cada uma dessas células pode ser influenciada diretamente pelas células vizinhas por uma via de conexão estrutural ("gap junction") (EDDLESTONE et al, 1984, MEDA et al, 1984) ou através do efeito parácrino devido às ações dos hormônios lançados no espaço extracelular (PIPELEERS,1987).

Os secretagogos de insulina podem ser classificados em dois grupos: os iniciadores e potencializadores. Os iniciadores são capazes de estimular a secreção de insulina; incluem nutrientes que são metabolizados pela célula  $\beta$  (como: glicose, leucina, isoleucina, arginina), e os potencializadores são substâncias que estimulam o metabolismo de substratos endógenos e agentes farmacológicos como por exemplo, a carbamilcolina. (ASHCROFT,1988).

O processo secretório da insulina é deflagrado por uma seqüência de eventos iniciados pelo metabolismo da glicose e/ou de outros nutrientes e



também pode ser iniciado ou afetado por vários fármacos (MALAISSE et al, 1980; MALAISSE et al, 1981; PANTEN et al, 1989).

Uma das formas de ativação do processo secretório envolve a mudança do estado elétrico das células  $\beta$ . O potencial de repouso da célula  $\beta$  é principalmente determinado pela atividade dos canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ). Quando há aumento na concentração de glicose plasmática, verifica-se aumento da captação de glicose pela célula  $\beta$  e seu metabolismo é estimulado, aumentando a geração de ATP e, conseqüentemente, a relação ATP/ADP, levando ao fechamento de canais de potássio sensíveis ao ATP (doravante designados canais  $K_{ATP}$ ) causando a despolarização da membrana. Isto resulta na ativação dos canais de  $Ca^{2+}$  sensíveis à voltagem e na iniciação de uma atividade elétrica rítmica, tipicamente em *bursts*. O aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  induz liberação de  $Ca^{2+}$  intracelular e, conseqüentemente, aumenta a secreção de insulina (PRENTKI & MATSCHINSKY, 1987).

Na célula  $\beta$  pancreática a glicose é transportada através da membrana pelo transportador denominado GLUT 2. Após a captação, ela é fosforilada e metabolizada, aumentando a produção de NADH(P) reduzido,  $H^+$  e de ATP. O aumento da razão ATP/ADP promove o fechamento dos canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP, despolarizando a célula e, conseqüentemente, promove a abertura dos canais de  $Ca^{2+}$  do tipo L e uma atividade elétrica típica, com surtos de potenciais

de ação dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (ASHCROFT & RORSMAN, 1989), resultando no aumento da concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Além deste processo, o início da secreção pode ocorrer independente do bloqueio do canal de  $\text{K}_{\text{ATP}}$ , como sugerido por GEMBAL et al, (1993).

Como já exposto, a insulina promove a redução da glicemia plasmática; portanto, deficiência da sua secreção pode resultar no diabetes mellitus. Suas manifestações clínicas são caracterizadas por hiperglicemia, poliúria, polidipsia e, muitas vezes, cetose. Muitas formas de diabetes são reconhecidas; porém, de acordo com os critérios de classificação atualmente aceitos, o diabetes pode ser dividido em duas síndromes mórbidas gerais. No diabetes tipo 1, também chamado diabetes mellitus dependente de insulina (DMID), o indivíduo tem pouca ou nenhuma capacidade endógena de secreção de insulina, desenvolvendo hiperglicemia extrema, cetose e, por conseguinte, dependem totalmente da insulina exógena para a sua sobrevivência. Esta forma surge geralmente, no início da vida adulta. O tipo 2, ou diabetes mellitus não-dependente de insulina (DMNID), ocorre em indivíduos que ainda possuem capacidade significativa de secreção de insulina. Embora possa haver necessidade de tratamento com insulina, para o controle da hiperglicemia, estes pacientes não desenvolvem cetose na ausência de insulino-terapia e tampouco dependem da insulina exógena para sua sobrevivência (BENNET & PLUM, 1997).

O tipo 1 é a forma mais grave de diabetes mellitus primária e a menos freqüente (5 a 15%). Afeta principalmente indivíduos jovens; é caracterizada pela destruição da maioria das células  $\beta$ . Esses indivíduos podem desenvolver hiperglicemia extrema, cetose e sintomas associados, a não ser que sejam tratados com insulina. Dependem totalmente da insulina exógena para a sua sobrevivência.

Por outro lado, no diabetes mellitus tipo 2 (DMNID), o diagnóstico é menos preciso, sendo baseado na distinção entre níveis normais e anormais de glicemia. Essa abordagem encontra-se associada a várias dificuldades, visto que a prova de tolerância à glicose oral é afetada por muitas variáveis que podem causar anormalidades leves do metabolismo da glicose, independentemente do diabetes. O DMNID, geralmente, não depende da insulina; é a forma mais freqüente, compreendendo 85 a 95% dos diabéticos, podendo evoluir para o diabetes tipo 1. Em geral, tem início depois dos quarenta anos de idade, com instalação gradual dos sintomas, mais tardio em comparação à manifestação do tipo 1. A concentração plasmática de insulina pode ser normal ou ainda mais elevada do que em indivíduos não obesos com tolerância normal à glicose. Na realidade, a concentração de insulina é anormalmente baixa para a concentração plasmática de glicose, em comparação aos não diabéticos de mesmo grau de obesidade (BENNET & PLUM, 1997).

Em estudos da fisiopatologia do diabetes mellitus não insulino-dependente (DMNID), foram identificados basicamente dois defeitos: resistência à insulina e prejuízos da função da célula  $\beta$ -pancreática, i.e, secreção deficiente (LEAHY, 1990). Estas alterações são causadas por uma combinação de fatores genéticos e ambientais (MUECKLER, 1990; TAYLOR et al., 1994). Os estudos em gêmeos permitiram distinguir a contribuição da herança em relação à participação dos fatores ambientais. Entre gêmeos com menos de 40 anos de idade, se um deles for diabético (principalmente com DMID baseado na idade), em apenas 30 a 50% dos casos o outro desenvolve diabetes. Porém, se os dois pares forem concordantes, o segundo gêmeo geralmente desenvolve diabetes em dois anos após o primeiro. Numa doença puramente genética, a concordância deve ser de 100%. Isto sugere que, embora os fatores genéticos sejam importantes no DMID, são apenas fatores predisponentes que devem interagir com influências ambientais para que haja desenvolvimento do diabetes (BENNET & PLUM, 1997).

No diabetes mellitus freqüentemente se observam complicações degenerativas caracterizadas por lesões de fundo neurológico. Tais neuropatias são comuns em pacientes em estágios avançados de diabetes mellitus, afetando nervos periféricos e o sistema nervoso autônomo. Alterações da velocidade de condução do impulso nervoso também são verificadas em diabetes experimental (KOSTYUK, 1997).

Alguns autores sugeriram que lesões neurológicas poderiam surgir bem cedo, durante o desenvolvimento do diabetes (HOSKING et al, 1978, LAUTT, 1979), quando ainda não seriam facilmente detectadas alterações sistemáticas da glicemia. De acordo com estes autores, as lesões do sistema nervoso parassimpático seriam precoces e estariam entre as principais modificações funcionais envolvidas na etiologia do diabetes do adulto não-obeso. Segundo recomendações do *Diabetes Council Comittee Research Group* (DCCTRG, 1995), a terapia intensiva poderia retardar ou impedir o desenvolvimento de manifestações clínicas da polineuropatia diabética. Infelizmente, as formas subclínicas da neuropatia são de difícil diagnóstico. Antes que lesões mais amplas possam ser identificadas, ocorre diminuição da velocidade de condução dos impulsos em nervos motores e sensoriais. Estudando um grupo de setenta e cinco crianças e adolescentes diabéticos, dos quais apenas três apresentavam sinais e sintomas característicos de neuropatia, HYLLIENMARK et al (1995) observaram que, apesar do bom controle metabólico e da subdivisão da dose diária de insulina em múltiplas injeções, aqueles pacientes ainda apresentaram redução da velocidade de condução em nervos motores e sensoriais.

O controle nervoso das funções pancreáticas é efetuado por ramificações parassimpáticas pré-ganglionares do vago. No pâncreas as fibras vagais que fazem sinapse com neurônios colinérgicos inervam as células das ilhotas. Estudos em animais normais sugerem que o sistema nervoso parassimpático não

apresenta tônus estimulatório. Por outro lado, o sistema nervoso simpático exerce tônus inibitório sobre a secreção de insulina. (JEANRENAUD & JEANRENAUD,1987).

O núcleo motor dorsal do nervo vago supre a inervação pré-gangliônica para o pâncreas (SIAUD et al, 1990) com função secretomotora (IONESCU et al 1983). A secreção de insulina é inibida pela vagotomia bilateral (FROHMAN et al 1967), a qual rompe o equilíbrio existente entre as vias que controlam a glicemia através da inervação autonômica, liberando as células  $\beta$  do controle central efetuado pelos núcleos motores dorsais do vago e do trato solitário. Estas áreas estão sob a influência de grupamentos neuronais do hipotálamo ventromedial e lateral (NIIJIMA, 1986; NIIJIMA et al, 1988; DORETTO, 1989).

No abdome o tronco ventral do vago percorre a parede ventral do esôfago e se divide formando os ramos hepático, ventral gástrico e, em alguns casos, o celíaco acessório. O tronco dorsal percorre a porção dorsal do esôfago e se ramifica, dando origem aos ramos celíaco e dorsal gástrico (POWLEY, et al,1983, BERTHOUD et al,1983; PRECHTL & POWLEY, 1985; BERTHOUD et al 1990).

Diversos estudos do processo secretório da insulina, realizados com ratos normoglicêmicos, constataram que há secreção reflexa de insulina em resposta a estímulos gustativos, a qual é mediada pelo nervo vago (LOUIS-SYLVESTRE,1976). Esta via é reconhecida como a responsável pela fase cefálica da secreção de insulina, a qual precede a chegada do alimento ao estômago

(STEFFENS, 1976). NIIJIMA (1991) demonstrou que a estimulação da língua pelo sabor doce (D-glicose 5 g/dl ou sacarose 10 g/dl) aumentou a atividade elétrica dos ramos pancreáticos e hepáticos do nervo vago e diminuiu as descargas do nervo esplâcnico, nos ramos para as adrenais, pâncreas e fígado. Por outro lado, o estímulo pelo sabor salgado (NaCl 5%) resultou em efeitos opostos.

Também foi observado que o reflexo pré-absortivo das funções viscerais foi bloqueado pela anestesia da língua em ratos normais, à semelhança do que aconteceu com a estimulação dos receptores gustativos e em ratos decerebrados. Estas demonstrações confirmaram os estudos de HALTER et al (1975) e de LOUIS-SYLVESTRE (1976), os quais demonstraram que o reflexo originado nos receptores gustativos pela glicose encontra-se prejudicado em diabéticos.

O desaparecimento da primeira fase da secreção é um dos sinais precoces do estabelecimento do diabetes. O primeiro pico (pré-absortivo) da liberação de insulina, reflexamente induzido pela presença do alimento na cavidade oral, foi abolido pela vagotomia troncular (LOUIS-SYLVESTRE, 1976). Por outro lado, o segundo pico de secreção de insulina, desencadeado pela presença do alimento na porção gastroduodenal, não parece ser devido à estimulação vagal direta das células  $\beta$ . Embora o primeiro pico tenha sido abolido pela vagotomia troncular completa, o segundo foi mantido em ratos diabéticos após transplante de tecido pancreático; portanto, mesmo ilhotas denervadas manifestam a resposta (LOUIS-SYLVESTRE, 1978).

Além de afetar diretamente a secreção de insulina, os nervos autônomos podem também influenciar a tolerância à glicose, uma vez que controlam funções hepáticas. A desnervação parassimpática envolvendo o pâncreas e o fígado prejudica a tolerância oral à glicose, tal como constatado em pacientes submetidos a tratamento cirúrgico de úlceras duodenais (vagotomia troncal ou piloroplastia). Eles apresentaram tolerância anormal à glicose, com aumento da glicose plasmática, em comparação aos valores normais de uma hora, porém normal ou baixa em duas horas (HALL et al, 1973). Possivelmente, isto pode ser devido à rápida absorção de glicose, após a piloroplastia.

As funções glicostáticas hepáticas também são controladas pelo vago, o qual coordena a intensidade de mobilização das reservas energéticas (YAMAGUCHI, 1992). Uma das funções da insulina é a ativação de uma seqüência de reações enzimáticas que suprime unidades de três carbonos ligados a uridina difosfato (UDPG), ativando a sintetase glicogênio, direta ou indiretamente. (DE FRONZO, 1988).

A inervação autonômica do parênquima hepático modula a atividade das enzimas que determinam a mobilização das reservas de glicogênio (LAUTT, 1980; JUNGEMANN, 1992). A porção parassimpática, atuando através de receptores muscarínicos, induz a elevação na atividade das enzimas que promovem a síntese e o armazenamento de glicogênio (NIJIMA, 1989; JUNGEMANN, 1992). Por outro lado, a porção simpática atua de maneira seletiva, dependendo do tipo



de adrenoceptor ativado. Quando ocorre a ativação dos receptores tipo  $\alpha$ -2 adrenérgicos presentes nos vasos que perfundem o parênquima, verificam-se mudanças na hemodinâmica local regulando o fluxo de oxigênio para as células. Quando os receptores ativados são do tipo  $\beta$ -2 adrenérgicos, aumenta a geração de AMP cíclico, que é o agente ativador de algumas proteínas-quinase dependentes de AMPc, que por sua vez ativam as enzimas glicogenolíticas e glicolíticas (LAUTT,1980). Existe ainda uma população de receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos, que também ativam as fosforilases, induzindo a depleção das reservas de glicogênio. No entanto, a ação destes receptores decorre da estimulação da fosfolipase C e da geração de trifosfatidil de inositol (IP3)(BERRIDGE,1986).

Também tem sido proposta a existência de glicoreceptores, que funcionariam como sensores de glicose nos vasos sanguíneos que perfundem o fígado (RUSSEK, 1963). A aferência proveniente destes receptores teria a função de informar ao hipotálamo a "concentração" de glicose que chega ao fígado. A partir destas informações, o hipotálamo lateral e o ventromedial coordenariam as respostas eferentes que interferem nas funções das adrenais, fígado e pâncreas endócrino, modulando a mobilização das reservas de glicose.

GIACOMINI et al (1994) sugeriram que a inervação vagal exerce um efeito trófico sobre as células das ilhotas, após constatar que a vagotomia alterou a permeabilidade da membrana das células  $\beta$  ao  $Rb^+$  (rubídio) utilizado como

substituto do  $K^+$ . É possível que outros parâmetros iniciais do processo de secreção também sejam afetados pela disfunção do sistema nervoso autônomo, particularmente o controle vagal, tal como fluxo de  $Ca^{2+}$  das células  $\beta$  induzido pela glicose e aminoácidos.

Portanto, disfunções do vago ou a remoção da inervação vagal poderiam afetar a fisiologia do fígado e/ ou do pâncreas endócrino e, por si só, alterar as respostas individuais à insulina ou a sobrecargas de glicose.

## OBJETIVOS

Em vista do acima exposto, neste trabalho estudamos:

1-) Os efeitos, a médio prazo (quinze e trinta dias), da vagotomia subdiafragmática seletiva sobre a permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ , em presença dos secretagogos glicose e arginina, e o efeito potencializador da carbamilcolina sobre a estimulação com glicose.

2-) Os efeitos da vagotomia a curto (oito dias) e médio prazo (trinta dias) sobre a sobrecarga de glicose, avaliada através do teste de tolerância à glicose (GTT).

3-) Os efeitos da vagotomia de curto (oito dias) e médio prazo (trinta dias) sobre a resposta a uma sobrecarga de insulina (ITT).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar, de dois a quatro meses de idade, pesando entre duzentos e duzentos e cinquenta gramas. Os animais foram mantidos em condições de fotoperíodo controlado (12 : 12 h, luz acesa às 6:00). Água e ração (LABINA- PURINA) estiveram disponíveis "ad libitum".

Os ratos foram distribuídos nos grupos experimentais: controle e submetidos a vagotomia seletiva do ramo pancreático. Os efeitos da vagotomia foram estudados, a curto e médio prazo (oito, quinze e trinta dias após a cirurgia), sobre os seguintes parâmetros:

- ❖ Fluxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em ilhotas isoladas, (quinze e trinta dias)
- ❖ Teste de tolerância à glicose (GTT), (oito e trinta dias)
- ❖ Teste de tolerância à insulina (ITT), (oito e trinta dias)

### Cirurgia

Antecedendo a cirurgia, os ratos foram mantidos em jejum durante a noite anterior. A cirurgia foi efetuada sob anestesia com pentobarbital sódico (50mg/ Kg de peso) após tricotomia e anti-sepsia com álcool na região abdominal. A seguir,

foi feita uma incisão na parede do abdômen, logo abaixo do esterno, expondo a porção do esôfago abaixo do hiato esofágico, para evidenciar os troncos vagais, dorsal e ventral, e as suas ramificações: gástricas, hepática, celíaca (pancreática) e celíaca acessória, seguindo as indicações de LAUTT (1980) e LOUIS-SYLVESTRE (1976,1978). Após a secção do ramo dorsal esquerdo, a incisão abdominal foi suturada com fio de algodão (5-0) e a anti-sepsia dessa região foi feita com merthiolate (Lilly). A seguir foram administrados (0,2 ml) de pentabiótico para animais de pequeno porte (Fontoura - Wyeth), via intramuscular, em cada pata posterior. Os ratos operados foram mantidos no biotério e tratados com terramicina (Pfizer) oral, durante cinco dias.

#### Verificação da eficácia da vagotomia

Decorridos sete dias após a cirurgia, realizamos o teste de validação da eficiência da vagotomia (LOUIS- SYLVESTRE et al, 1981). Foi administrado 1,0 ml de solução de glicose a 50 g/dl através de uma cânula colocada sobre a língua e, após vinte minutos, foram coletados 2,0 ml sangue de através da veia oftálmica, utilizando tubos capilares heparinizados. O sangue foi imediatamente centrifugado a 5000 rpm e o plasma foi utilizado para a dosagem de glicose, pelo método da glicose oxidase ("kit" E-Enzimático, Celm- Reactoclin).

### Teste de tolerância à glicose endovenoso (GTT)

Para realizar o teste de tolerância à glicose, via intravenosa, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso, i.p.). Constatada a ausência do reflexo de retirada da pata ao pinçamento, indicativo da sensação dolorosa, foi realizada uma incisão na porção interna da perna posterior, para localizar a veia femural. Com auxílio de seringas utilizadas para injetar insulina, uma amostra de sangue (0,3 ml) foi coletada para a determinação da glicemia inicial (tempo zero). Em seguida, foi administrada uma sobrecarga de glicose (1 g/kg de peso). Outras amostras foram coletadas aos cinco, quinze, trinta, quarenta e cinco e sessenta minutos após a sobrecarga de glicose, sendo acondicionadas em gelo. Ao final de coleta, foram centrifugadas a 2500 rpm durante quinze minutos; o plasma foi separado e utilizado para a dosagem de glicose.

### Teste de tolerância à insulina (ITT)

Os ratos submetidos ao ITT receberam uma injeção de insulina (30  $\mu$ U/100 g de peso corporal) logo após a coleta da primeira amostra de sangue. Os demais

procedimentos de coleta de sangue e processamento das amostras foram idênticos aos descritos no item anterior.

### Dosagens Séricas

#### Glicose

Para a determinação da glicose foi utilizado o método enzimático ("kit" glicose-E Enzimática Celm-Reactoclin, originalmente descrito por TRINDER (1969).

### Análise dos Resultados dos Testes de Tolerância à Glicose e à Insulina

Para analisar os efeitos do teste de tolerância à glicose para cada curva, foram calculadas as constantes aparentes ( $K_a$ ), que exprimem a velocidade de desaparecimento (ou remoção) da glicose do compartimento vascular, no período compreendido entre o quinto e trigésimo minutos. O mesmo procedimento foi realizado para o teste de tolerância à insulina. (LEFEBVRE & LUYCKX, 1982).

### Isolamento de ilhotas para a medida do efluxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .

O isolamento das ilhotas foi realizado por meio da destruição seletiva do pâncreas, utilizando colagenase (EC3.4.24.3), conforme LACY & KOSTIANOVSKY (1967), com pequenas modificações.

Os ratos foram mortos por decapitação e, após incisão abdominal, foi ocluída a extremidade duodenal do ducto biliar comum. Um catéter foi inserido na parte proximal do duto hepático, para injetar 10 ml de solução Hanks contendo 8 mg de colagenase (Boehinger, Mannheim, GmbH, Alemanha), para intumescer o pâncreas e iniciar a digestão. Este foi imediatamente excisado e transferido para uma placa de Petri contendo solução de Hanks e limpo, separando-se a porção gordurosa e a maioria dos vasos e glânglios linfáticos. Para cada experimento foram usados, em média, quatro pâncreas, os quais foram picados com tesoura. Este tubo foi mantido durante vinte minutos em banho-maria a 37°C, sendo continuamente agitado pelo gaseamento com carbogênio (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>). Após esse período, o tubo foi agitado manualmente por aproximadamente um minuto e meio. O procedimento foi interrompido após a mistura apresentar um aspecto "leitoso", homogêneo. Então, o conteúdo foi transferido para outro frasco e diluído com solução de Krebs, a qual foi trocada várias vezes para remover os fragmentos de tecido e ermitir a precipitação das ilhotas. As ilhotas foram coletadas manualmente, sob lupa, usando pipeta siliconizada.



## Soluções

### Solução de Hanks para isolamento de ilhotas

Para o isolamento das ilhotas, esta solução apresentou a seguinte composição iônica (em mM): Na<sup>+</sup>, 141,5; K<sup>+</sup>, 5,8; Ca<sup>2+</sup>, 1,3; Mg<sup>2+</sup>, 0,8; Cl<sup>-</sup>, 143,6; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 4,2; HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 0,3; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 0,8; H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, 0,4. O pH da solução foi ajustado em 7,4 com carbogênio (95% O<sub>2</sub>: 5% CO<sub>2</sub>, v/v ) (HANKS e WALLACE, 1949).

### Solução para lavagem, incubação e perfusão das ilhotas.

A solução de Krebs (KREBS e HENSELEIT, 1932) foi utilizada para lavagem, incubação e perfusão das ilhotas de Langerhans, sendo composta de (em mM) : Na<sup>+</sup>, 139,0 ; K<sup>+</sup>, 5,0; Ca<sup>2+</sup>, 2,6; Mg<sup>2+</sup>, 1,0; Cl<sup>-</sup>, 123,6; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 24,0. Durante o período de incubação, com o intuito de aumentar a captação de <sup>45</sup>Ca, utilizamos uma solução de Krebs onde o íon Ca<sup>2+</sup> foi suprimido. À solução foi acrescentada 500 mg/dl de albumina bovina (Gibco, Gent, Bélgica), imediatamente antes do uso e, em seguida, equilibrada e mantida em pH 7,4 através de gaseamento com carbogênio.

## Efluxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Após isoladas, 150 a 200 ilhotas foram depositadas em câmara forrada com filtro de acetato de celulose (SCWP 01300, 8  $\mu\text{m}$ , Millipore, França). O sistema de perfusão foi constituído por um banho-maria para manter constantes a temperatura (36°C) e a pressão das soluções de perfusão. Uma bomba peristáltica de dois canais (Minipuls 2, Gilson Medical Electronics, França) foi utilizada para impulsionar as soluções perfusoras através da câmara contendo ilhotas. As soluções de Krebs, controle e experimental, que perfundiram, alternadamente, as ilhotas eram provenientes de dois frascos mantidos no banho-maria e foram continuamente gaseadas com carbogênio para manter o pH a 7,4. O efluente foi coletado a cada dois minutos, em frascos apropriados para a contagem de radioatividade. O fluxo foi ajustado para 1 ml/minuto. A defasagem entre a mudança de posição das válvulas (torneiras) e o início da troca das soluções nas câmaras foi devidamente computada na elaboração dos gráficos.

### PROTOCOLO EXPERIMENTAL.

#### Resposta à glicose

- 1-) Condição inicial: solução de Krebs desprovida de glicose (G0)
- 2-) Condição experimental: solução de Krebs contendo 16,7 mM de glicose (G16,7)

Na primeira fase do efluxo (controle) as ilhotas foram perfundidas com solução de Krebs desprovida de glicose e, após o quadragésimo minuto (fase experimental), esta foi trocada pela solução de Krebs contendo 16,7 mM de glicose.

#### Resposta à carbamilcolina

1-) Condição inicial: solução de Krebs contendo 5,6 mM de glicose (G5,6).

2-) Condição experimental: solução de Krebs contendo glicose 5,6 mM e 100 $\mu$ M de carbamilcolina (G 5,6 + CCh).

O procedimento experimental foi idêntico ao descrito no item anterior, porém no quadragésimo minuto a solução foi trocada por outra contendo 5,6 mM de glicose e 100 $\mu$ M de carbamilcolina .

#### Resposta à arginina

1-) Condição inicial: solução de Krebs contendo 8,3 mM de glicose (G8,3).

2-) Condição experimental: solução de Krebs contendo 8,3 mM de glicose e 20mM de arginina (G8,3+Arg).

O procedimento experimental foi idêntico ao descrito no item anterior. Porém, no quadragésimo minuto a solução foi trocada por outra contendo 8,3 mM de glicose e 20 mM de arginina.

Para analisar os efeitos da vagotomia seletiva sobre a permeabilidade da membrana da célula  $\beta$  sobre o efluxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , além da descrição da variação do fluxo induzido pelas mudanças indicadas no protocolo experimental, foram calculadas as áreas sob as curvas (expressas em unidade arbitrária) para os intervalos entre o quadragésimo-quinquagésimo minutos. As estimativas dos valores das áreas sob as curvas foram obtidas através do programa ORIGIN 2.8.

### Análise Estatística

Os valores do tempo zero do ITT e do GTT, das constantes ( $K_a$ ) e das áreas sob a curva dos efluxos de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  foram comparados através da análise de variância, seguida pelo teste de Tukey. Foram admitidas como significativas as diferenças com probabilidades inferiores a 5% (ZAR, 1996).

## RESULTADOS

### TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE PÓS-VAGOTOMIA

Considerando que a ausência do controle parassimpático sobre as ilhotas de Langerhans possa influir na utilização da glicose, estudamos a resposta dos grupos experimentais a uma sobrecarga de glicose (1g/kg de peso corpóreo), administrada através da veia femural (figura. 1). A vagotomia, a curto ou médio prazo (VGTP 8 e VGTP30 dias), não alterou a glicemia de jejum de 12 horas. Após trinta minutos da administração da sobrecarga, a glicemia do grupo controle retornou aos valores basais ( $104,77 \pm 10,17$ ). No grupo estudado após oito dias da vagotomia, embora a glicemia diminuísse, manteve-se acima dos valores de controle durante todo período experimental. No grupo trinta dias, a glicemia diminuiu rapidamente até o trigésimo minuto, porém, voltou a se elevar no final do teste, quando se tornou igual ao VGTP 8 dias.

Para cada um dos grupos experimentais foram calculadas as constantes de desaparecimento de glicose ( $K_a$ ), cujos valores foram: grupo controle,  $K_a = 0,024 \pm 0,002$ ; vagotomizado 8 dias,  $K_a = 0,004 \pm 0,002$  e vagotomizado 30 dias,  $K_a = 0,012 \pm 0,002$ . A análise de variância demonstrou diferenças entre os grupos controle e VGTP 8 dias ( $P < 0,001$ ) e VGTP 30 dias ( $P < 0,01$ ), mas não entre os grupos VGTP 8 e VGTP 30 dias ( $P > 0,05$ ).

## TESTE DE TOLERÂNCIA A INSULINA

A figura 2 mostra que a administração endovenosa de insulina (30  $\mu$ U/100 g de peso corporal) provocou redução da glicemia nos ratos- controle e nos VGTP 8 e 30 dias até o trigésimo minuto. No grupo- controle, após o trigésimo minuto a glicemia voltou a aumentar, resultado consistente com registros de outros autores, que mostram ser esta a resposta esperada à administração da sobrecarga de insulina. Diferindo deste, os grupos vagotomizados mantiveram a glicemia baixa ( $P < 0,05$ , 8 dias;  $P < 0,05$ , 30 dias,  $n = 4$  para os três grupos experimentais).

A análise de variância mostrou que não houve diferença entre os grupos controle e VGTP 8 e VGTP 30 dias, no tempo zero ( $P > 0,05$ ), porém no sexagésimo minuto o grupo controle diferiu dos grupos VGTP 8 e VGTP 30 dias ( $P < 0,001$ ), mantendo-se com valores mais elevados. Por sua vez, não houve diferença significativa entre os grupos VGTP 8 e 30 dias, em relação ao sexagésimo minuto.

A velocidade de remoção de glicose, expressa pela constante,  $K_a$ , para o período quinto- trigésimo minutos foi  $0,074 \pm 0,014$  para o grupo controle;  $0,072 \pm 0,008$  para o VGTP 08 dias e  $0,060 \pm 0,005$  para o VGTP 30 dias. Os valores da constante de desaparecimento da glicose entre os três grupos experimentais não diferiram entre si ( $P > 0,05$ ).

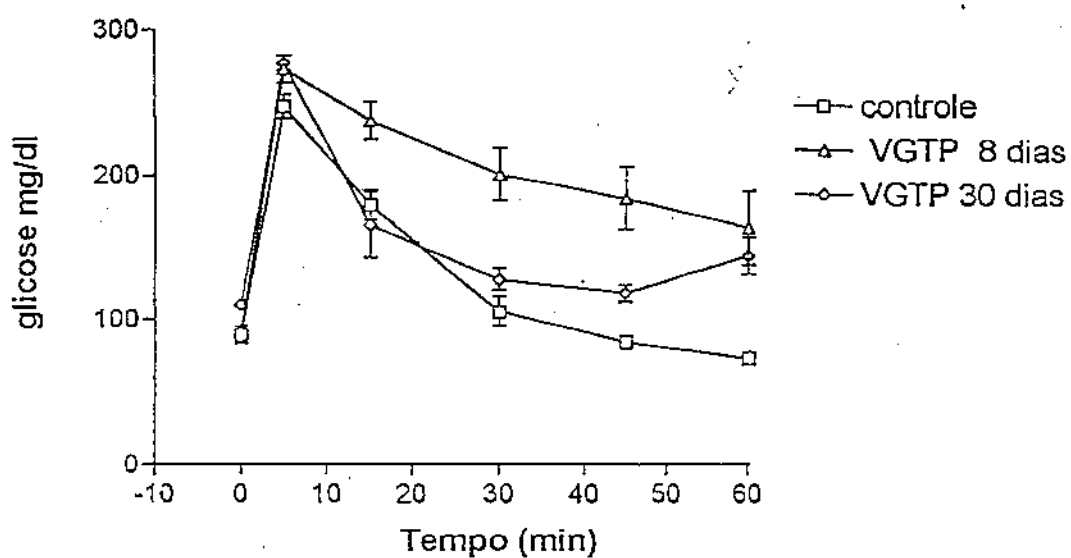


Figura 1– Concentração de glicose plasmática (mg/dl) durante o teste intravenoso de tolerância à glicose (1g/kg de peso corporal, i.v) em ratos controle e após oito ou trinta dias de vagotomia (VGTP 8 dias e VGTP 30 dias). Cada ponto representa a média  $\pm$  epm (erro padrão da média), sendo o  $n = 4$ .

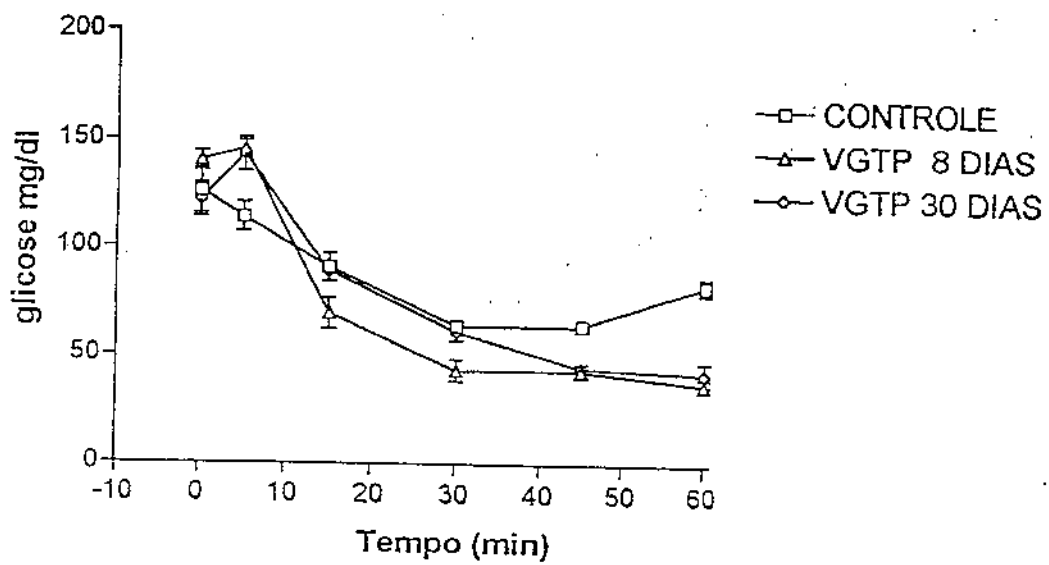


Figura 2- Concentração de glicose plasmática (mg/dl) durante o teste de tolerância à insulina ( $30 \mu\text{U}/100 \text{ g}$  de peso corporal, i.v) em ratos- controle e oito e trinta dias após vagotomia (VGTP 8 dias e VGTP 30 dias). Os dados representam a média  $\pm$  epm (erro padrão da média), sendo o  $n = 4$ .



Tabela 1

Valores das Constantes Aparentes ( $K_a$  médias  $\pm$  epm, n=4) do Teste de Tolerância à glicose. Os valores foram obtidos a partir da figura 1 e seus cálculos foram efetuados de acordo com LEFEBVRE & LUYCKX, 1982.

	Controle	VGTP 8 dias	VGTP 30 dias
$K_a$	0,024 $\pm$ 0,002	0,004 $\pm$ 0,002***	0,012 $\pm$ 0,002**

Significância \* P<0,05 ; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001

Tabela 1.1

Valores das Constantes Aparentes ( $K_a$  médias  $\pm$  epm, n=4) do Teste de Tolerância à insulina. Os valores foram obtidos a partir da figura 2 e calculados de acordo com LEFEBVRE & LUYCKX, 1982.

	Controle	VGTP 8 dias	VGTP 30 dias
$K_a$	0,074 $\pm$ 0,014	0,072 $\pm$ 0,008	0,060 $\pm$ 0,005

## EFLUXO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ EM ILHOTAS ISOLADAS DE RATOS VAGOTOMIZADOS

Mudanças em fluxos iônicos são eventos iniciais na cadeia de reações que levam à secreção de insulina induzida por glicose. Tais eventos envolvem inicialmente variações do efluxo de  $\text{K}^+$  e de  $\text{Ca}^{2+}$  e poderiam ser afetadas pela remoção da inervação parassimpática. Primeiramente, estudamos as modificações dos fluxos de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , induzidas pela estimulação de ilhotas de Langerhans de ratos com 16,7mM de glicose (figura. 3). Em ilhotas isoladas de ratos controle (íntegros), seis minutos após a introdução de 16,7 mM de glicose o efluxo dobrou em relação aos últimos minutos do período controle, sendo mantido em platô até o final da perfusão ( $p < 0,05$ ).

Em outra forma de análise do efluxo, comparamos as áreas sob as curvas dos grupos controle e experimental (unidade arbitrária), onde novamente se verificou que o efluxo no período que se seguiu à adição de glicose foi maior no grupo controle do que nos grupos vagotomizados ( $P < 0,001$ ). Enquanto no grupo controle a área foi de  $21,8 \pm 5,67$ , nos grupos vagotomizados foi menor, não diferindo entre si (VGTP 15 dias,  $A = 12,66 \pm 1,71$ ; VGTP 30 dias,  $A = 12,06 \pm 2,16$ ), ( $P > 0,05$ )

Também avaliamos o efeito da vagotomia sobre a sensibilidade das células  $\beta$  à carbamilcolina (usada como substituta de acetilcolina) em presença de 5,6 mM de glicose. Para esse fim, medimos o efluxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Em ilhotas isoladas de ratos controle, a adição de carbamilcolina (100  $\mu\text{M}$ ) à solução perfusora provocou aumento transiente do efluxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  após os primeiros cinco minutos, permanecendo elevada em relação ao período precedente por oito minutos ( $p < 0,05$ ). Este aumento foi também calculado pela comparação entre as áreas do período controle e experimental, o qual mostrou que a área do grupo controle foi maior do que as áreas dos grupos VGTP 15 e VGTP 30 dias ( $A = 17,76 \pm 3,92$  controle;  $A = 10,31 \pm 2,04$  VGTP 15 dias;  $A = 11,19 \pm 2,01$  VGTP 30 dias,  $P < 0,01$ ). No entanto, nas ilhotas isoladas de ratos submetidos a vagotomia posterior (ramo pancreático), a resposta à carbamilcolina foi abolida, mantendo a mesma velocidade de efluxo do período que antecedeu a adição da carbamilcolina. Estes resultados sugerem que tenha ocorrido redução da sensibilidade colinérgica nas ilhotas, nos quinze e trinta após a vagotomia.

Também procuramos avaliar os efeitos da vagotomia sobre a sensibilidade das células  $\beta$  ao aminoácido arginina. Os efeitos da arginina sobre o efluxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  foram estudados em presença de glicose 8,3 mM em ilhotas isoladas de ratos- controle e VGTP 30 dias (figura 5). No grupo controle (íntegro), cinco minutos após a introdução de 20 mM de arginina, a constante de efluxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  aumentou 2,3 vezes em relação àquela induzida por 8,3 mM de glicose. Após um

platô de cinco minutos, o efluxo decaiu nos onze minutos seguintes (0,03 % por minuto), permanecendo assim até o final da perfusão (n=4).

No grupo vagotomizado há trinta dias, a resposta à arginina modificou-se sensivelmente em relação ao grupo controle. Nos seis minutos iniciais após a introdução de 20 mM arginina, o tipo de resposta foi idêntica à verificada no grupo controle. Porém, houve rápida redução da permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  nos onze minutos seguintes ao período de perfusão, sendo que a razão do decaimento do efluxo foi de 0,09% por minuto ( $P < 0,05$ ).

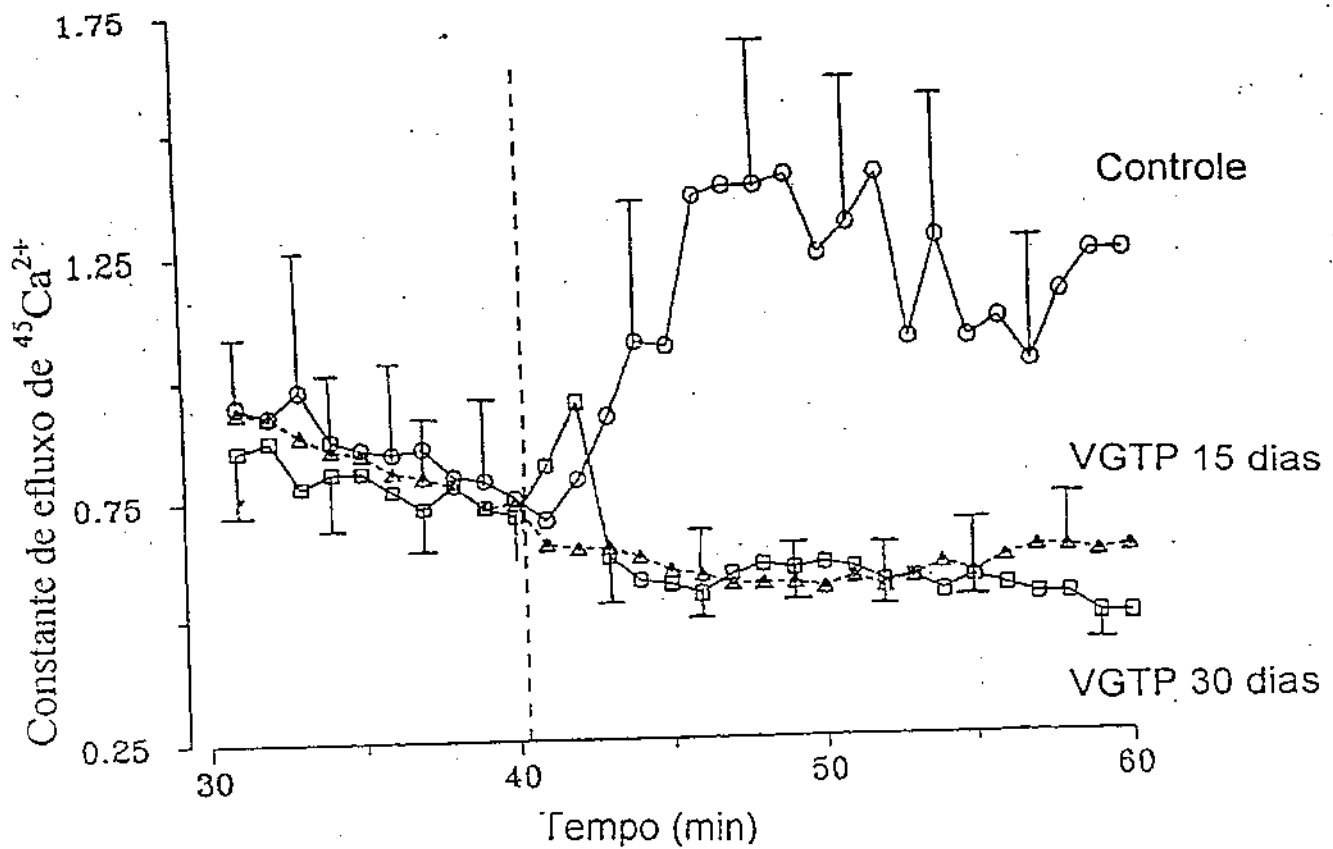


Figura 3: Efeito da adição de glicose sobre a constante de efluxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle e vagotomizados, com quinze ou trinta dias de período pós-operatório (VGTP 15 dias e VGTP 30 dias). Após adaptação, as ilhotas foram perfundidas por solução de Krebs-bicarbonato desprovida de glicose, até o quadragésimo minuto. A linha vertical tracejada indica o início da perfusão com 16,7 mM de glicose. Cada ponto representa a média de duas câmaras, cada qual contendo de cento e cinquenta a duzentas ilhotas.

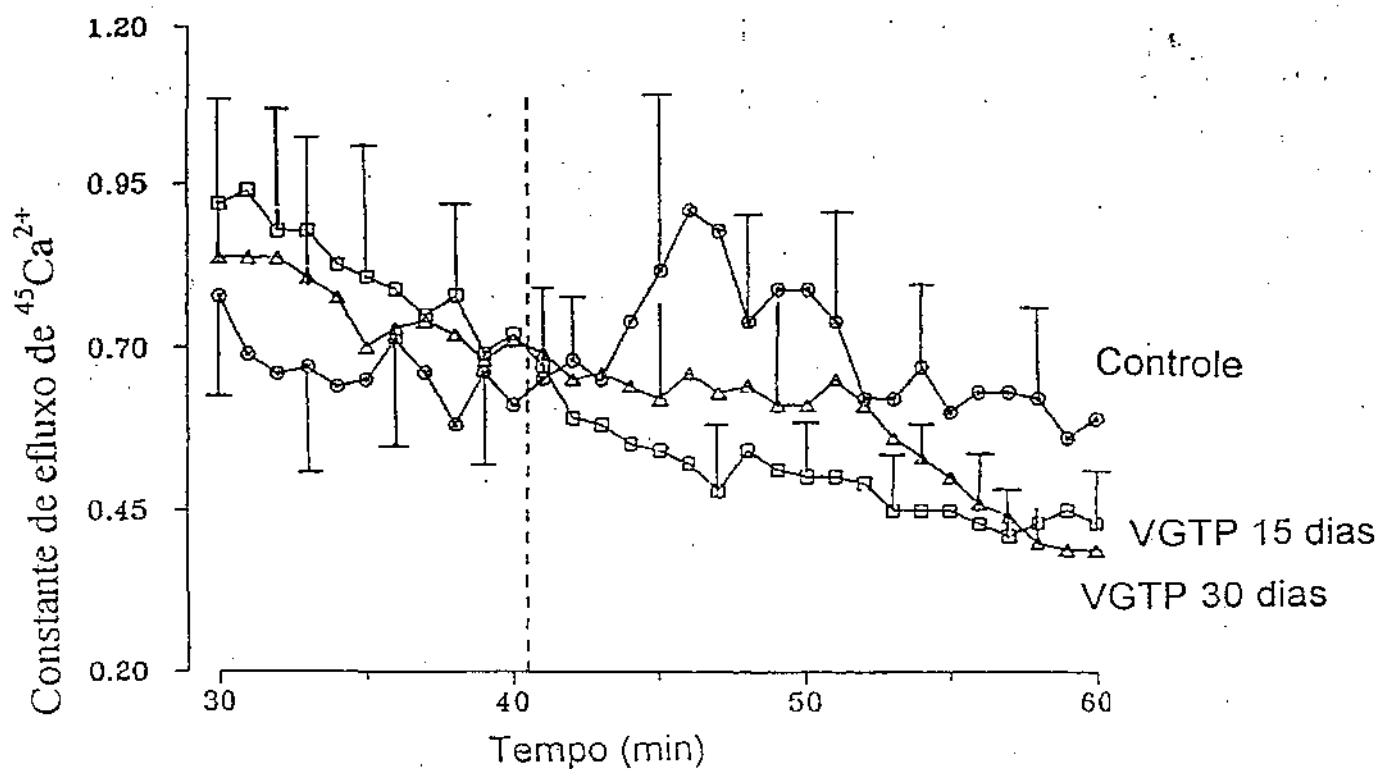


Figura 4: Efeito de carbamilcolina ( $100 \mu\text{M}$ ) sobre a constante de efluxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle e de ratos submetidos à vagotomia pancreática (quinze e trinta dias de pós-operatório – VGTP 15 dias e VGTP 30 dias). As ilhotas (cento e cinquenta a duzentas) foram perfundidas por solução de Krebs-bicarbonato contendo  $5,6 \text{ mM}$  de glicose, durante toda a perfusão. A linha tracejada indica o momento de introdução da carbamilcolina. Cada ponto representa a média de quatro experimentos realizados em duas câmaras.

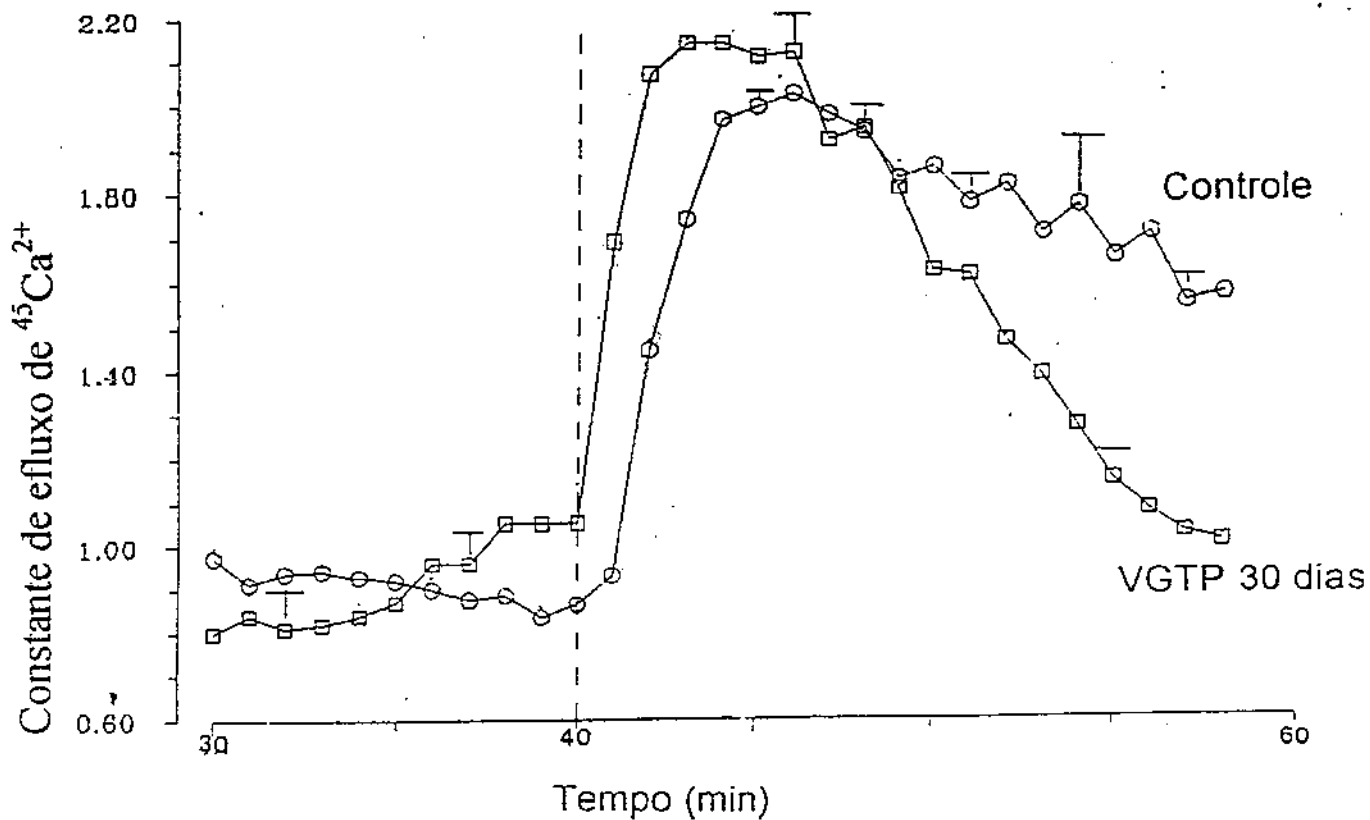


Figura 5- Efeito da adição de arginina (20 mM) sobre a constante de efluxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , causado por 8,3 mM de glicose, em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle e vagotomizados há trinta dias (VGTP 30 dias). As ilhotas foram isoladas e perfundidas em solução de Krebs-bicarbonato com 8,3 mM de glicose até o quadragésimo minuto. A linha tracejada indica o momento da introdução da arginina aos onze minutos após a fase de adaptação. Esta fase durou dez minutos. Cada ponto representa a média de dois experimentos realizados em duas câmaras, cada qual contendo cento e cinquenta ilhotas.

Tabela 2

Áreas sob a curva (médias  $\pm$  epm) do efluxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  durante o período experimental. Os valores (unidades arbitrárias) foram obtidos a partir das figuras 3, 4 e 5, e calculados pelo programa ORIGIN 2.8.

Efeitos	Controle	VGTP 15 dias	VGTP 30 dias
Glicose (16,7mM)	21,81 $\pm$ 5,67	12,06 $\pm$ 2,16***	12,66 $\pm$ 1,71***
Carbamilcolina (100 $\mu$ M)	17,76 $\pm$ 3,92	10,31 $\pm$ 2,04**	11,19 $\pm$ 2,01**
Arginina (20mM)	33,38 $\pm$ 5,58	-	31,45 $\pm$ 6,16*

Significância \* P<0,05 ; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001



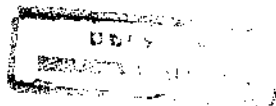
## DISCUSSÃO

Dentre os inúmeros fatores que regulam a secreção de insulina, destacam-se os hormônios, os íons, vários fármacos, os cofatores metabólicos e, principalmente, os nutrientes, como a glicose e alguns aminoácidos.

O controle neural da secreção da insulina assume papel muito importante na regulação da secreção, modulando a atividade das células  $\beta$  antes, durante e após a ativação do mecanismo secretor. A antecipação de resposta das ilhotas, aumentando a secreção de insulina antes do aumento de glicose no fluxo sanguíneo pancreático é chamada de fase cefálica da secreção de insulina. Em indivíduos sadios, o controle dessa situação reflete a atividade conjunta dos sistemas nervoso simpático e parassimpático. A inervação parassimpática desempenha papel estimulatório, usualmente chamado potencializador, através dos receptores muscarínicos, elevando a secreção de insulina estimulada pela glicose. Por outro lado, a divisão simpática exerce ação inibidora da secreção (WOLLHEIM et al, 1981).

O desaparecimento da fase cefálica da secreção é uma das ocorrências mais precoces no estabelecimento do diabetes, havendo inúmeras evidências indicativas de que alterações da função vagal estão envolvidas (LOUIS-SYLVESTRE et al, 1981, NIIJIMA, 1991; HERATH et al, 1999).

A participação da neuro- regulação no processo secretório de insulina tem sido objeto de estudo em humanos submetidos a vagotomia troncular (TANAKA et



al, 1990; YAMAZAKI, 1989) e é muito importante de ser considerada o seu comprometimento em indivíduos submetidos a cirurgias em áreas ou próximas ao pâncreas, fígado e estômago. Diversos autores têm avaliado a participação do ramo celíaco vagal, suas relações com o sistema hepato-portal, bem como o envolvimento das vias vagais eferentes na regulação da secreção de insulina (NAGASE et al 1993). A modulação da secreção de insulina pelo sistema nervoso parassimpático foi demonstrada por meio de estimulação elétrica direta do tronco vagal ou dos ramos do vago posterior por BERTHOUD et al (1990), comparando as respostas com a estimulação de outros ramos vagais.

Nesta abordagem, procedemos à remoção do controle parassimpático sobre o pâncreas e analisamos seus efeitos de curto e médio prazo (oito e trinta dias). Os valores mais elevados de glicemia aos cinco minutos foram obtidos de ratos vagotomizados oito e trinta dias, embora as diferenças não tenham sido significativas ( $P > 0,05$ ). Por outro lado, houve uma discrepância na tendência da remoção de glicose no grupo trinta dias, cujo valor final (sessenta minutos) seguiu a tendência do grupo oito dias, também diferindo do grupo controle ( $P < 0,01$ ). Embora a análise global dos resultados mostrados na figura 1 não demonstrem diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) na tolerância à glicose (GTT) entre os oito e trinta dias de vagotomia, os valores de glicemia ao final do teste (sessenta minutos) mostram que a desnevação pancreática contribuiu para a manutenção da glicemia elevada. Outra forma de avaliar os efeitos da vagotomia foi calcular a constante aparente ( $K_a$ ), a qual fornece uma medida da velocidade da remoção de glicose pelos tecidos. Os valores de  $K_a$  foram:  $0,004 \pm 0,002$  para o grupo

vagotomizado há oito dias,  $0,012 \pm 0,002$  para o vagotomizado há trinta dias, sendo significativamente menores que as constantes do grupo controle ( $K_a = 0,024 \pm 0,002$ ). Em humanos, níveis glicêmicos elevados duas horas após a refeição final têm sido interpretados como um sinal de alerta quanto às alterações da função pancreática. Neste sentido, os valores finais do GTT em ratos vagotomizados poderiam ser interpretados como indicativos de alteração na função reguladora da glicemia, o que mereceria mais estudos. No caso dos humanos, tem sido assinalado que a precocidade nesta detecção teria grande importância no tratamento de futuras complicações (Diabetes Council Committee Research Group, 1995). Também é preocupante o fato de que a desnervação pancreática possa eliminar a ritmicidade circadiana (DELATTRE et al, 1999) e a variação diurna do processo secretório, sem abolir totalmente a função da célula  $\beta$  (LOUIS-SYLVESTRE, 1978; STRUBBE, 1992).

O perfil da resposta à insulina (ITT) mostrou dois tipos de respostas. Nos animais- controle, as variações glicêmicas induzidas pela injeção de insulina são paralelas aos grupos vagotomizados entre o décimo quinto e quadragésimo quinto minutos, mostrando diminuição da glicemia até o trigésimo minutos, voltando a se elevar entre o quadragésimo quinto e sexagésimo minuto. Nos grupos operados, a redução (de cinco a trinta minutos) foi equivalente ao controle, porém continuou baixando até o sexagésimo minuto. Nos animais íntegros, a velocidade de remoção ( $K_a$ ) de glicose até o trigésimo minuto foi  $0,074 \pm 0,014$ , enquanto para os operados foi:  $0,072 \pm 0,008$  aos oito dias e  $0,060 \pm 0,005$  aos trinta dias (ambos

P>0,05). Estes valores mostram que a resposta à insulina nos ratos com desnervação pancreática está aumentada em relação ao controle, indicando maior sensibilidade à insulina na periferia e/ou no fígado.

As alterações precoces nas respostas ao GTT e ITT podem ser devidas a efeitos iniciais na secreção de insulina, causados pela desnervação pancreática. Sabe-se que a acetilcolina participa da modulação da secreção de insulina. Estudos eletrofisiológicos do processo secretório das células  $\beta$  revelaram que a acetilcolina provoca alterações características na atividade elétrica das células  $\beta$  (GAGERMAN et al, 1978; SANTOS & ROJAS, 1989). Quando a acetilcolina é adicionada ao meio contendo 11 mM de glicose, a célula  $\beta$  se despolariza até atingir um platô, a partir do qual são deflagrados potenciais elétricos em alta frequência, os quais acompanhados, ou não, de curtos períodos de hiperpolarização, que representam a fase silente da atividade elétrica. É sabido que o aumento da atividade elétrica provocada pela acetilcolina envolve a interação do neurotransmissor com receptores muscarínicos subtipo  $M_1$  e  $M_3$  (BERTRAM et al, 1995; ROJAS et al, 1990; BOSCHERO et al, 1995)

A secreção de insulina está intimamente relacionada às variações da condutância iônica e da concentração de  $Ca^{2+}$  das células  $\beta$ . A compreensão do mecanismo de secreção de insulina avançou muito nos últimos vinte anos, em especial quanto aos eventos que se seguem ao estímulo por glicose. A glicose modifica o padrão metabólico na célula  $\beta$ , os fluxos iônicos (ASHCROFT &

RORSMAN, 1989, HENQUIN, 1992, GEMBAL et al, 1993, SMITH et al, 1997) e o acoplamento intercelular (EDDLESTONE et al, 1984, MEDA et al, 1984).

Mudanças do efluxo de  $K^+$  e de  $Ca^{2+}$  são eventos iniciais da cadeia de reações que levam à secreção de insulina estimulada pela glicose (ATWATER et al, 1984; DAWSON et al, 1985). A glicose, assim como a carbamilcolina, promove aumento do efluxo de  $^{45}Ca^{2+}$ , em virtude da troca do  $^{45}Ca^{2+}$  acumulado no interior das células pelo  $^{40}Ca^{2+}$  que entra como consequência do estímulo (HERCHUELZ et al, 1980). Em nosso estudo, a secção do ramo pancreático vagal provocou alterações da permeabilidade da membrana ao  $^{45}Ca^{2+}$ , tornando-a não responsiva à glicose. Em experimentos anteriores, também o efluxo de  $^{86}Rb^+$  (usado como substituto do  $^{39}K^+$ ) em presença de glicose foi afetado em ratos com vagotomia posterior (GIACOMINI et al, 1994). Na ausência da inervação parassimpática devem ter ocorrido alterações em alguma das etapas iniciais do acoplamento estímulo-secreção, dependente da glicose, as quais precedem o aumento da permeabilidade ao  $Ca^{2+}$  e redução da permeabilidade ao  $K^+$

Também a resposta das ilhotas ao estímulo com carbamilcolina foi abolido pela vagotomia pancreática. Estudos anteriores (MATHIAS et al, 1985, SANTOS & ROJAS, 1989) demonstraram os efeitos da carbamilcolina em células  $\beta$  de ratos e de camundongos íntegros. Nelas, tanto a acetilcolina quanto a carbamilcolina provocaram alterações da permeabilidade da membrana, aumentando o efluxo de  $^{45}Ca^{2+}$  (MATHIAS et al, 1985) e a atividade elétrica (SANTOS & ROJAS, 1989), em presença de glicose em concentração próxima ao limiar de estimulação.

Ambos os resultados são compatíveis com os nossos controle. Todavia, a interpretação dos efeitos causados pela carbamilcolina sobre os fluxos iônicos e a atividade elétrica divergiram entre esses autores. Para MATHIAS et al (1985), o rápido e transiente aumento do efluxo de  $^{86}\text{Rb}^+$  poderia ser devido ao aumento da permeabilidade ao  $\text{K}^+$ , decorrente da despolarização da membrana ( $\text{PK}_{(\text{V})}$ ) ou consequência do aumento da concentração de cálcio livre no citosol ( $\text{PK}_{(\text{Ca})}$ ). Em oposição, SANTOS & ROJAS (1989) sugeriram que a carbamilcolina inibiu a permeabilidade ao  $\text{K}^+$ , o que explicaria o aumento da resistência à entrada de corrente (elétrica) em células beta de camundongos.

Outra alternativa para o aumento do efluxo de  $^{86}\text{Rb}^+$  e de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , estimulados pela acetilcolina, poderia envolver a participação dos canais de  $\text{Na}^+$ . Retirando  $\text{Na}^+$  da solução extracelular, HENQUIN et al (1988) aboliram os efeitos da acetilcolina sobre a atividade elétrica e sobre esses fluxos iônicos, sugerindo que a acetilcolina deve aumentar a permeabilidade ao  $\text{Na}^+$  e favorecer a despolarização da célula beta. De fato, canais de  $\text{Na}^+$  estão presentes em células beta (HIRIART & MATTESON, 1988; PLANT, 1988, SORIA et al, 1991 e são sensíveis ao estímulo por secretagogos de insulina (GONÇALVES et al, 1993, 1994, MARANGONI et al, 1995).

Os presentes resultados, assim como os de GIACOMINI et al (1994), mostram que a vagotomia pancreática, a curto e médio prazo, afeta a permeabilidade da membrana ao  $\text{Ca}^{2+}$  e ao  $\text{K}^+$ , sugerindo que a sensibilidade à carbamilcolina (aqui utilizada em substituição à acetilcolina para obter maior duração do efeito) desapareceu em virtude da previsível diminuição de seus

receptores na membrana. Todavia, como a sensibilidade à glicose também foi abolida é possível que ambas as formas de estímulo compartilhem ou ativem alguma etapa inicial do mecanismo de secreção de insulina que antecede às modificações das permeabilidades iônicas da membrana.

Por sua vez, a arginina também pode estimular a secreção (TANAKA et al, 1990; TRABELSI & LAVOIE, 1996). Este efeito poderia ser devido ao complemento da despolarização da membrana iniciada pela glicose (CHARLES et al, 1982; HENQUIN, 1992) ou à ativação de uma corrente para o interior da célula (SMITH et al, 1990; 1997). Esta captação é mediada por um transportador de aminoácidos catiônicos da família mCAT2A (SMITH, 1997), também expresso em ilhotas pancreáticas de camundongos (CLOSS et al, 1993).

Nosso estudo mostrou aumento do efluxo do  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em ilhotas perfundidas com 8,3 mM de glicose e 20 mM de arginina (Figura. 5), corroborando dados da literatura (TRABELSI & LAVOIE, 1996). As ilhotas isoladas trinta dias após vagotomia mostraram um perfil de efluxo diferente daquelas isoladas de ratos com a inervação pancreática íntegra. Para o mesmo estímulo a resposta à arginina teve duração mais curta que a do grupo controle, fato sugestivo de que a vagotomia também afeta a sensibilidade das ilhotas à estimulação combinada, glicose-arginina.

Estes dados, complementam nossos resultados anteriores, mostrados na figuras 3 e 4. Nelas, pode ser observado que a resposta ao estímulo por glicose ou por glicose e carbamilcolina em célula  $\beta$  de ratos vagotomizados foi alterada,

reduzindo o aumento do efluxo que ocorre em ilhotas de ratos controle quando estimuladas por agentes secretagogos ou potencializadores da secreção. É possível que a permeabilidade da membrana esteja alterada pela ausência do trofismo mediado pela inervação vagal.



## SUMÁRIO

A participação do sistema nervoso parassimpático na modulação da secreção de insulina manifesta-se claramente durante a fase cefálica a qual se segue ao estímulo iniciado pelo estímulo sensorial provocado pelo alimento na boca. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos, a curto e médio prazo, que a vagotomia subdiafragmática seletiva do ramo pancreático poderia provocar na permeabilidade da membrana plasmática ao  $Ca^{2+}$ . Para avaliar os efeitos da vagotomia usamos os secretagogos: glicose e arginina e a potencialização pela carbamilcolina sobre os efeitos de glicose. Adicionalmente estudamos os efeitos sistêmicos que esta desnervação poderia provocar sobre a tolerância à glicose e à insulina. Antes de avaliar os efeitos da vagotomia (após 8 e 30 dias) verificamos que a resposta característica da fase cefálica, estava ausente, resultando em aumento da glicemia.

No teste de tolerância a glicose, os níveis glicêmicos de jejum nos ratos controle e 8 e 30 dias após a vagotomia não diferiram. Decorridos 30 minutos de administração da sobrecarga de glicose (1 g/kg de peso corporal), não foram observadas diferenças entre os níveis glicêmicos entre dos grupos controle e vagotomizados 8 e 30 dias. Entretanto, no grupo controle, os valores da glicemia retornaram ao nível basais 60 minutos após a sobrecarga de glicose. Os ratos vagotomizados, avaliados 8 e 30 dias após a vagotomia, mantiveram níveis glicêmicos maiores que o grupo controle ( $P < 0,001$ ;  $P < 0,01$ ,  $n = 4$  para os 3 grupos experimentais).

O teste de tolerância à insulina (30  $\mu$ U/100g de peso, i.v) provocou redução da glicemia em todos os grupos, até o 30ºmin ( $P>0,05$ ), todavia, a resposta mudou. Enquanto a glicemia do grupo controle atingiu o nível glicêmico inicial, nos vagotomizados, a resposta diferiu quanto ao tempo ( $P<0,001$ ). Os grupos vagotomizados não diferiram entre si ( $P>0,05$ ).

Os estudos de efluxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  foram realizados em ilhotas de ratos controle ou desnervadas isoladas por digestão com colagenase. As ilhotas isoladas de ratos 15 e 30 dias após a vagotomia do ramo pancreático não responderam ao estímulo com 16,7 mM de glicose e também apresentaram alteração na sensibilidade à carbamilcolina (CCh 100  $\mu$ M) adicionada à solução contendo 5,6 mM de glicose. A resposta à arginina (20 mM) em presença de 8,3 mM de glicose foi reduzida sensivelmente ( $P<0,05$ ).

Nossos resultados sugerem que o nervo vago (ramo pancreático) contribui facilitando a resposta das células beta pancreáticas à estimulação por glicose e arginina. Este efeito poderia estar associado à modulação da resposta destes secretagogos pelo neurotransmissor acetilcolina, modulador da secreção de insulina.

## ABSTRACT

The cephalic phase is an important event for the regulation of the glycemia, and may disappear very early in the development of diabetes. It anticipates the response of the  $\beta$  cells to the increment of glycemia during the meals, and is mediated by the parasympathetic system (pancreatic vagus).

The purpose of this work was to study the effects of pancreatic vagotomy on the systemic responses to glucose (GTT), insulin (ITT), and on the  $\beta$  cell membrane permeability to  $\text{Ca}^{2+}$ .

The experiments were performed on vagotomized rats (pancreatic branch) after being checked for the absence of the cephalic phase of secretion, 8 or 30 days after surgery.

In the absence of the parasympathetic control, the glycemia was not altered after 12 h fasting levels of ( $P>0,05$ ). However, the handling of an overload of glucose (1g/kg of body weight) was affected by vagotomy. While, at the 30<sup>th</sup> min, control and 30 days vagotomized rats did not differ in blood glucose, the 8 days vagotomized group maintained a very high level of glycemia throughout the experimental period ( $P<0.05$ ). At the end of the test period (60<sup>th</sup> min), glycemia of the experimental groups differed ( $P< 0.01$ ) from the control group. The constant of apparent ( $K_a$ ) removal of glucose from the 5<sup>th</sup> to the 30<sup>th</sup> test was  $0.024 \pm 0,002$ ,  $0.004 \pm 0,002$  and  $0.012 \pm 0,002$  for control, 8 and 30 vagotomized rats ( $n = 4$ ), respectively.

Insulin administration induced reduction in blood glucose in all groups till the 30<sup>th</sup> min, with values of  $K_a$  of  $0.074 \pm 0,014$  (n=3),  $0.072 \pm 0,008$  (n = 4) and  $0.061 \pm 0,005$  (n = 4) for control, 8 and 30 days vagotomized rats, respectively. However, vagotomized rats showed an altered systemic response to insulin, since they continued hypoglycemic while control rats tended to return to control values at the 60<sup>th</sup> min ( $P < 0.001$ , n = 4).

The effect of pancreatic vagotomy on the  $Ca^{2+}$  permeability to glucose or combined stimulation by glucose plus arginine or carbamylcholine was estimated using  $^{45}Ca^{2+}$  to trace the  $Ca^{2+}$  efflux in collagenase isolated islets. The denervation of islets diminished the sensitivity of  $\beta$ -cell to glucose (16,7 mM), or to its combination with carbamylcholine (100  $\mu$ M) or arginine (20 mM).

The present results showed that vagotomy alters the events (GTT and  $Ca^{2+}$  efflux) related to insulin secretion, changing the response to glucose or to the potentiation by arginine or carbamylcholine. It is speculated that this low sensibility is consequence of effects of denervation upon glucose metabolism. Also, these results suggest that the vagus nerve exerts a trophism on pancreatic  $\beta$ -cell.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHROFT, F.M. Adenosine 5'-triphosphate sensitive potassium channels. **Rev. Neurosci.**, 11:97-135, 1988.

ASHCROFT, F.M. & RORSMAN, P.: Electrophysiology of the pancreatic B-cell. **Prog. Biophys. and Mol. Biol.**, 54: 87-143, 1989.

ATWATER ; GONCALVES, A. A.; HERCHUELZ, A.; LEBRUN, P; MALAISSE, W.J.; ROJAS, E.; e SCOTT, A. Cooling dissociate glucose-induced insulin release from electrical activity and cation fluxes in rodent pancreatic islets. **J.Physiol.**, 348:615-627, 1984.

BENNETT. J.C & PLUM, F. **CECIL, Tratado de Medicina Interna**. Ed Guanabara Koogan, 20º ed., vol II, 2647p., 1997.

BERTHOUD, H. R., FOX, E.A & POWLEY, T. L, Localization of vagal pregaglionic that stimulate insulin and glucagon secretion **Am. J. Physiol.** 258:160-168, 1990.

BERTHOUD, H.R.; NIIJIMA, A. A.; SAUTER, J.F. & JEANRENAUD, B. Evidence for a role of gastric, coeliac and hepatic branches in vagally stimulated insulin secretion in rat. **J. Auton. Nerv. Syst.**, 7:97-110, 1983.

BERRIDGE, M.J. Intracellular signalling through inositol triphosphate and diacylglycerol. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, 36: 447-456, 1986.

BERTRAM, R., BUTTE, M.J., KIEMEL, T., SHERMAN, A. Topological and phenomenological classification of bursting oscillations. **Bull. Math. Biol.** 57 (3): 413-39, 1995.

BOSCHERO, A. C. GLASMAN, M. S.; CARNEIRO, E. M.; BORDIN, S.; PAUL, I.; ROJAS, E. & ATWATER, I. Potentiation of glucose-induced insulin release from rat pancreatic islet by oxotremorine-m involves M3 muscarinic cholinergic receptor. **Am. J. Physiol.** 268: E 336-E342, 1995.

CHARLES, S., TAMAGAWA, T. HENQUIN, J. C. A single mechanism for the stimulation of insulin release and Rb efflux from rat islets by cationic amino acids. **Biochemical J.** 208,0301-308, 1982.

CLOSS, E.I., ALBRITTON, L. M., KIM, J.W. & CUNNINGHAM, J.M. Identification of a low affinity, high capacity transporter of cationic amino acids in mouse liver. **J. Biol. Chem.**, 268: 7538-7544, 1993.

DAWSON, C. M.; CROGHAN, P. C.; SCOTT, A. M. & BANGHAN, J. A. Direct comparison of  $K^+$  and  $Rb^+$  efflux in normal mouse islets. **Diabetologia**, 27: 267 a, 1985.

De FRONZO, R.A. The triunvirate: Beta- cell, muscle, liver. **Diabetes** 37: 667-687, 1988.

DELATTRE, E.; CIPOLLA-NETO, J. & BOSCHERO. A. C. Diurnal variations in insulin secretion and  $K^+$  permeability in isolated rat islet. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** 26: 505-510, 1999.

Diabetes Control and Complications Trial Reserch Group. **An. Med. Interne**. 122: 561-568, 1995.

DORETTO, D. *Fisiopatologia Clinica do Sistema Nervoso* .Atheneu, R.J, 1989.

EDDELESTONE, G. T.; GONÇALVES, A.A.; BANGHAN, J. A. & ROJAS, E. Electrical coupling between cells in islets of Langerhans from mouse. **J. Membr. Biol.**, 77: 1-14,1984.

FROHMAN, L. A., EZDINLI, E.Z. & JAVID, R. Effect of vagotomy and vagal stimulation on insulin secretion. **Diabetes**, 16: 443 – 448, 1967.

GAGERMAN, E.; IDAHL, L. A.; MEISSNER, H. P. & TALJEDAL, I-B., Insulin release,  $\text{cGMP}$ ,  $\text{cAMP}$  and membrane potential in acetylcholine-stimulated islets. **Am. J. Physiol.**, 235: 493-500, 1978.

GEMBAL, M.; DETIMARY, P., GILON, P., GAO, Z.Y. & HENQUIN, J.C. Mechanism by which glucose can control insulin release independently from its action adenosine triphosphate-sensitive  $\text{K}^+$  channels in mouse B cells. **J. Clin. Invest.** 91(3): 871-870, 1993.

GIACOMINI, A.C.V.V.; da Silva, C.A. & GONÇALVES, A. A. Permeabilidade ao  $\text{K}^+$  na membrana de ilhotas de Langerhans após vagotomia subdiafragmática seletiva. **Anais IX Reunião Anual FESBE**, 313<sup>A</sup>, 1994.

GONÇALVES, A.A.;da SILVA. Adenosina altera a permeabilidade da membrana da célula B pancreática. **Resumos II Congresso Paranaense de Diabetes, Maringá**, p.18, 1993.

HALL, WH; SANDERS, L.L. READ, R.C. Effect of vagotomy and pyloroplasty: The oral glucose tolerance test. **Gastroenterology**, 64: 217-222, 1973.



HALTER, J.; KULKOSKY, P.; WOODS, S.; MAKOUS, W.; CHEN, M & PORTE Jr.,  
D. Afferent receptors, taste perception, and pancreatic endocrine function in  
man. **Diabetes**, 24: 414, 1975.

HANKS, J.H. & WALLACE, R. E. Relation of oxygen and temperature in  
preservation of tissues by refrigeration. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, 71: 196-200,  
1949.

HENQUIN, J.C & NENQUIN, M. The muscarinic receptor subtype in mouse  
pancreatic B-cell. **FEBS LETT**, 236: 89-92, 1988.

HENQUIN, J.C. The biophysical events involved in the stimulation of insulin  
release by arginine. In **Guanidino Compounds in Biology and Medicine**,  
ed. De Deyn, P.P., Marescau, B., Stalon, V. & Quureshi, I. A., pp. 109-116.  
John Libbey and Company Ltda, London. 1992.

HERATH, C. B.; REYNOLDS, G.W.; MACKENZIE, D. D.; DAVIS, S.R.; HARRIS,  
P.M. Vagotomy suppress cephalic phase insulin release in sheep. **Exp.**  
**Physiol**, 84: 3, 559-569, 1999.

HERCHUELZ, A.; COUTURIER, E.. & MALAISSE, W.J. Regulation of calcium  
fluxes in pancreatic islets: glucose-induced calcium exchange. **Am. J. Physiol.**  
238: 96-103, 1980.

HIRIART, M.;MATTENSON.D.R.; Na channels and two types of Ca channels in rat pancreatic B-cells identified with the reserve hemolytic plaque assay. **J. Gen Physiol**, 91, 617-639, 1988.

HOSKING, D. J.; BENNETT, T. & HAMPTON, J. R. Diabetic autonomic neuropathy. **Diabetes** 27: 1043-1054, 1978.

HYLLIENMARK, L.M, BRISMAR, T. & LUDVIGSSON, J. Subclinical nerve dysfunction in children and adolescents with IDDM. **Diabetologia**, 38: 685-692, 1995.

IONESCU, E., ROHNER-JEANRENAUD, F., BERTHOUD, H.R. & JEANRENAUD, B. Increases in plasma insulin levels in response to electrical stimulation of the dorsal motor nucleus of the vagus nerve. **Endocrinology**, 112(3): 904-910, 1983.

JEANRENAUD, F.R & JEANRENAUD, B.Interactions entre le système nerveux central, le pancréas endocrine et le métabolisme. **Ann. Endocrinol**, 48: 400-406, 1987.

JUNGERMANN, K. Zona liver cell heterogeneity. **Enzyme**, 46: 1-32, 1992.

KOSTYUK, P.G. Investigations of calcium homeostasis mechanisms in nerve cells and their alterations during brain pathology. **Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova**, 83(5-6): 2-18,1997.

KREBS, H.A. & HENSELEIT, K. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. **Physiol. Chem Phys. Med.** , 210: 33-66,1932.

LACY, P. E. & KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, 16:35-38, 1967.

LAUTT, W.W. Hepatic parasympathetic neuropathy as cause of maturity onset diabetes? **Gen. Pharmacol.** 11: 343-345, 1979.

LAUTT, W.W. Hepatic nerves: a review of their function and effects. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 58: 105-123, 1980.

LEAHY, J.L. Natural history of B-cell dysfunction in NIDDM. **Diabetes care**, 13:: 992-1010, 1990.

LEFEBVRE, P. & LUYCKX, As provas funcionais em diabetologia. **Andrei** , 142., 1982.

LOUIS-SYLVESTRE. J., Preabsorptive insulin release and hypoglycemia in rats.  
**Am. J. Physiol** 230:56-60, 1976.

LOUIS-SYLVESTRE. J., Feeding and metabolic patterns in rats with truncular vagotomy or with transplanted-cells. **Am. J. Physiol.** 235:2, E119- E125, 1978.

LOUIS-SYLVESTRE. J., GIACHETTI, I. & LEMAGNEN, J. A non invasive test for the completeness of vagotomy to the pancreas. **Physiol. & Behav.**, 26: 485-488. 1981.

MALAISSSE ; HUTTON, J.C.; CARPINELLI, A. R.; HERCHUELZ, A.;SENER, A.  
The stimulus-secretion coupling of aminoacid-induced insulin release, metabolism and cationic effects of leucine. **Diabetes**, 29:431-437, 1980.

MALAISSSE; CARPINELLI, A. R. & SENER, R. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Timing of early metabolic, ionic and secretory events. **Metabolism**,30:527-532, 1981.

MATHIAS, P.C.F; CARPINELLI, A.R; BILLAUDUEL, B; GARCIA- MORALES, P.; VALVERDE, J & MALAISSSE, W.J. Cholinergic stimulation of ion fluxes in pancreatic islets. **Biochem. Pharmacol.**, 34: 3451-3457, 1985.

MARANGONI, S., TOYAMA, M.H., ARANTES, E. C., GIGLIO, J. R., DA SILVA, C.A., CARNEIRO, E.M., GONÇALVES, A. A. & OLIVEIRA, B. Amino acid sequence of TsTX-V, an alpha-toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom, and its effect on K<sup>+</sup> permeability of beta-cells from isolated rat islets of Langerhans. **Biochim. Biophys Acta** 13; 1243 v.3: 309-14, 1995.

MEDA, P., ATWATER, I.; GONÇALVES, A. A.; BANGHAN, J. A.; ORCI, L. & ROJAS, E.: The topography of the electrical synchrony among b-cells in mouse islet of Langerhans. **Q.J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.**, 69:719-735, 1984.

MUECHLER, M. Family of glucose- transporter genes. Implications for glucose homeostasis and diabetes. **Diabetes**, 39: 6-11, 1990.

NAGASE, H., Inoue. S., TANAKA.K., TAKAMURA. Y., NIIJIMA.A. Hepatic glucose-sensitive unit regulation of glucose-induced insulin secretion in rats. **Physiol. & Behav.** 53:139-143, 1993.

NIIJIMA, A. Neural controle of blood glucose level . **JPN. J. Physiol.** 36: 826-841, 1986.

NIIJIMA, A.: KANNAN, H. & YAMASHITA, H. Neural control of blood glucose homeostasis: Effect of microinjection of glucose into hypothalamic nuclei on

efferent activity of pancreatic branch of vagus nerve in rat. **Brain Res. Bull.**, 20: 811-816, 1988.

NIIJIMA, A. Nervous regulation of metabolism. **Prog in Neurobiol.** 33: 135-147, 1989.

NIIJIMA, A. Effects of taste stimulation on the efferent activity of the pancreatic vagus nerve in the rat. **Brain Res. Bull.** 26: 161-164, 1991 a.

NIIJIMA, A. Effects of taste stimulation on the efferent activity of the autonomic nerves in the rat. **Brain. Res. Bull.**, 26: 165-167, 1991b.

PANTEN, U.; BURGFELD, J.; GOERKE, F.; RENNICKE, M.; SCHWANSTECHE, M.; WALLASCH, A.; ZUNKLER, B.J. & LENZEN, S. Control of insulin secretion by sulphonylureas, nateglinone and diazoxide in relation to their binding to the sulphonylurea receptor in pancreatic islets. **Biochem. Pharmacol.**, 38 v8:1217-1229, 1989.

PLANT, T.D.; Na<sup>+</sup> currents in cultured mouse pancreatic B-cells. **Pflügers Arch. J. Physiol.** 411, 429-435, 1988.

PIPELEERS, D.G. The biosociology of pancreatic B-cell. **Diabetologia**, 30 : 277-291, 1987.

PRECHTL, J.C. & POWLEY, T. L. Organization and distribution of the rat subdiaphragmatic vagus and associated paraganglia. **J. Comp. Neurol.** 235: 182-195, 1985.

PRENTKI, M., and MATSCHINSKY, F. M.  $Ca^{++}$ , cAMP, and phospholipid- derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. **Physiol. Rev.** 67: 1185-1249, 1987.

POWLEY, T.E.; PRECHTL, J.C.; FOX, E.A. & BERTHOUD, H.R. Anatomical considerations for surgery of the rat abdominal vagus distribution, paraganglia and regeneration. **J. Auton. Nerv. Syst.**, 9: 79-97, 1983.

ROJAS, E.; HIDALGO, J.; CARROLL P.B.; LI, M.X. & ATWATER, I. A new class of calcium channels activated by glucose in human pancreatic B-cells. **FEBS LETT.**, 261: 265-270, 1990.

RUSSEK, M. Participation of hepatic glucoreceptors in control of intake of food. **Nature**, 197: 79-80, 1963.

SANTOS, R.M. & ROJAS. E. Muscarinic receptor modulation of glucose-induced electrical activity in mouse pancreatic B-cell. **FEBS LETT.**, 249 v2: 411-417, 1989.

SCHIMIDT, H. H., WARNER, T.D., ISHII, K., SHENG, H. & MURAD, F. Insulin secretion from pancreatic beta-cells caused by L-arginine derived nitrogen oxides. **Science**, 255, 721-723. 1992.

SIAUD, P., PUECH, R., ASSENMACHER, I. & ALONSO G. Adrenergic innervation of the dorsal vagal motor nucleus : possible involvement in inhibitory control of gastric acid and pancreatic insulin secretion. **Cell Tissue Res.** 259: 535-542, 1990.

SMITH, P.A., RORSMAN, P. & ASHCROFT, F. M. Simultaneous recording of beta-cells electrical activity ATP- sensitive K- currents in mouse pancreatic beta-cell. **FEBS LETT.** 261, 187-190. 1990.

SMITH, P.A., SAKURA, H., COLES, B., GUMMERSON, N. PROKS, P. & ASHCROFT, F. M. Electrogenic arginine transport mediates stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic B cell. **J. Physiol.**, 449: v3 625-635, 1997.

SORIA, B.; CHANSON, M.; GIORDANO, E.; BOSCO, D., MEDA, P.; Ion channels of glucose-responsive and unresponsive beta-cells. **Diabetes** 40, 1069-1078, 1991.

STEFFENS, A. B. Influence of the oral cavity on insulin release in the rat. **Am. J. Physiol.** 230(5): 1411-1415, 1976.



STRUBBE. J.H. Effects of pancreas transplantation on insulin secretion in the rat during ingestion of varying glucose loads. **Diabetologia** 22 : 354-357, 1992.

TANAKA. K., INOUE.S, NAGASE, Y . TAKAMURA. Y. Modulation of arginine-induced insulin and glucagon secretion by the hepatic vagus nerve in the rat: effects of celiac vagotomy and administration of atropine. **Endocrinology** . 127: 2017-2023, 1990.

TAYLOR, S.I., ACCILI, D.& IMAI, I. Insulin resistance or insulin deficiency: which is the primary cause of NIDDM? **Diabetes**, 43: 735-740, 1994.

TRABELSI, F. & LAVOIE, J.M. Arginine-induced pancreatic hormone secretion during exercise in rats. **J. Appl. Physiol.** 81: 6, 2528-2533, 1996.

TRINDER, R. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with alternative oxygen acceptor. **Ann. Clin. Biochem.** 6: 24, 1969.

YAMAGUCHI.N. Sympathoadrenal system in neuroendocrine control of glucose: mechanisms involved in the liver, pancreas and adrenal gland under hemorrhagic and hypoglycemic stress. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** , 70 : 167-206, 1992.

YAMAZAKI. M., SAKAGUCHI. T. Pancreatic vagal functional distribution in the secretion of insulin evoked by portal infusion of D-glucose,. **Brain Res.**, 484 357-360, 1989.

WOLLHIEM, C. B. & SHARP, G.W.G. Regulation of insulin release by calcium. **Physiol. Rev.**, 61: 914-973,1981.

ZAR, J.H. Bioestatistical Analysis. 3°ed. 662p, 1996.