



8º Congresso de Pós-Graduação

SENSIBILIDADE DAS CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS FRENTE À VAGOTOMIA E ESTIMULAÇÃO COM ARGININA

Autor(es)

EDER JOAO DE ARRUDA

Co-Autor(es)

LUCIANO JULIO CHINGUI
ANDRÉ ALVES LICO MASCARIN
ANDRÉ LUIS LÂMORA QUAST

Orientador(es)

CARLOS ALBERTO DA SILVA

1. Introdução

A insulina é um hormônio hipoglicemiante que tem seu processo secretório, deflagrado por uma seqüência de eventos iniciados pelo metabolismo da glicose e/ou de outros nutrientes. Em suma, a forma de ativação envolve o bloqueio dos canais de potássio sensíveis ao ATP (KATP), mudança do estado elétrico das células beta, despolarização da membrana e consequente ativação dos canais de Ca²⁺ sensíveis à voltagem, culminando assim, com a exudação dos granulos de insulina (BERTRAM, SHERMAN e SATIN, 2007; LEIBIGER, BRISMAR e BERGGREN, 2010).

Condições em que a dinâmica insulínica esteja alterada, como no diabetes mellitus, podem desencadear complicações degenerativas de fundo neurológico (neuropatias), que atacam principalmente o ramo autonômico parassimpático (KOSTYUK, 1997).

O controle nervoso das funções pancreáticas é efetuado por ramificações parassimpáticas pré-ganglionares do nervo vago, que inervam as células das ilhotas (BERGGREN e LEIBIGER, 2006; DEMURO e OBICI, 2006). No aspecto anatomofuncional, o núcleo motor dorsal do nervo vago, supre a inervação pré-gangliônica para o pâncreas, de modo que a função secretomotora seja exercida por um controle central, que se apresenta em consonância com o trato solitário associado a grupamentos neuronais do hipotálamo ventromedial e lateral (BUETTNER e CAMACHO, 2008).

É importante salientar que o desaparecimento da fase cefálica do processo de secreção de insulina, configura-se como um dos sinais precoces do estabelecimento do diabetes. O primeiro pico (pré-absortivo) da liberação de insulina, reflexamente induzido pelo alimento na cavidade oral é abolido pela vagotomia troncular (LOUIS-SYLVESTRE, 1978). Nesse sentido, vale ressaltar que a vagotomia é um procedimento cirúrgico usado no controle de úlceras duodenais ou piloroplastia mas, o fato de que a cirurgia pode alterar o efeito trófico da inervação sobre as ilhotas pancreáticas, ainda não tem seus mecanismos elucidados.

2. Objetivos

A proposta deste estudo foi investigar os efeitos da vagotomia subdiafragma seletiva, a curto e médio prazo (15 e 30 dias), sob a permeabilidade ao Ca²⁺ na presença do secretagogo arginina.

3. Desenvolvimento

Foram utilizados ratos Wistar, de 3 meses de idade, com peso de 290 ± 15 g. Os animais foram mantidos em ciclo fotoperiódico de 12h claro/escuro em temperatura controlada de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ com água e ração “ad libitum”. A separação dos grupos experimentais ($n=4$) seguiu-se em; controle e submetidos à vagotomia seletiva do ramo pancreático. Após anestesia com pentobarbital sódico (50mg/Kg de peso,ip), a região abdominal foi tricotomizada e passou por assepsia para que o procedimento de vagotomia fosse realizado. A cirurgia consistiu em, uma incisão no abdômen logo abaixo do externo, para expor a porção do esôfago abaixo do hiato esofágico, no intuito de evidenciar os troncos vagais posteriore e anteriores, bem como suas ramificações: gástricas, hepática, celíaca (pancreática) e celíaca acessória.

As ilhotas foram isoladas por meio da colagenase (EC3.4.24.3) [14]. Subsequentemente, essas ilhotas foram incubadas em solução de Krebs (mM; $\text{Na}^+=139,0$; $\text{K}^+= 5,0$; $\text{Ca}^{2+}= 2,6$; $\text{Mg}^{2+}=1,0$; $\text{Cl}^-=123,6$; $\text{HCO}_3^-=24,0$) acrescida de 0,5% (m/v) de albumina bovina, sendo o pH equilibrado em 7,4 através de gaseamento com carbogênio. Depois de isoladas, 200 ilhotas foram depositadas em câmara forrada com filtro de acetato de celulose (SCWP 01300, 8 μm , Millipore, França). O sistema de perfusão foi constituído por um banho-maria no intuito de manter a constância da temperatura ($36 \pm 2^\circ\text{C}$) e da pressão das soluções de perfusão impelida por uma bomba peristáltica de 2 canais (Minipuls 2, Gilson Medical Electronics, França), tendo como finalidade o impulsionamento das soluções perfusoras em direção a câmara contendo ilhotas. As soluções de Krebs controle e experimental, que perfundiram alternadamente em banho-maria, foram continuamente gaseadas. O efluente foi coletado a cada dois minutos, em frascos apropriados para a contagem de radioatividade. O fluxo foi ajustado para 1 ml/minuto. Os dados referentes à defasagem entre a mudança de posição das válvulas (torneiras) e o início da troca das soluções nas câmaras foram devidamente computados na elaboração dos gráficos.

Na primeira fase do efluxo (controle) as ilhotas foram perfundidas com solução de Krebs contendo 8,3 mM de glicose. Sequencialmente após 10 minutos de perfusão foi introduzida a solução de Krebs acrescida de 20 mM de arginina. Na análise estatística os comportamentos do efluxo do radioisótopo pré e pós administração da arginina foram comparados através da análise de variância, seguida pelo teste de Tukey, $p<0,05$.

4. Resultado e Discussão

Uma série de mudanças em fluxos iônicos são eventos iniciais na cadeia de reações que levam ao processo secretório da insulina induzida por glicose. As modificações envolvem inicialmente variações do efluxo de K^+ e de Ca^{2+} . Assim, estudou-se os efeitos da arginina sobre o efluxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ na presença de glicose 8,3 mM em ilhotas isoladas de ratos controle e vagotomizados 15 e 30 dias. No grupo controle (íntegro), 5 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 5 minutos, o efluxo decaiu aos 11 minutos seguintes (0,03 % por minuto), permanecendo assim até o final da perfusão.

No grupo vagotomizado 15 dias, a resposta à arginina modificou-se em relação ao grupo controle. Nos 5 minutos iniciais após a introdução de 20 mM arginina, a elevação foi mais lenta se comparado ao grupo controle, havendo a seguir uma rápida redução na permeabilidade ao $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nos minutos seguintes, sendo a razão do decaimento do efluxo de 0,09% por minuto ($P<0,05$). Por sua vez, no grupo vagotomizado 30 dias, a resposta a arginina foi expressivamente comprometida e evidente nos primeiros 6 minutos de introdução da arginina, com 12% abaixo na fase do platô, além de apresentar uma razão de decaimento de 0,40% por minuto ($P<0,01$) como mostra a figura 1.

O controle neural da secreção da insulina é um dos sistemas reguladores do processo secretório, visto a modulação da atividade das células beta antes, durante e após a ativação do mecanismo de secreção insulínica. Nesse sentido, o desaparecimento da fase cefálica da secreção, tem como efeito a precocidade nas ocorrências do diabetes. Isso se fundamenta em evidências que indicam alterações na função vagal frente uma vagotomia (BUETTNER e CAMACHO, 2008; GAUTAM et al., 2006).

A neuroregulação tem participação direta no processo secretório de insulina e ainda, tem sido objeto de estudo em humanos submetidos à vagotomia troncular, com atenção em indivíduos submetidos a cirurgias realizadas em áreas próximas ao pâncreas, fígado e estômago. (TANAKA et al., 1990; DEMURO e OBICI, 2006)

Na abordagem adotada pelo presente trabalho, procedeu-se a remoção do controle parassimpático sobre o pâncreas, com base no fato de que a desnervação pancreática pode eliminar a ritmicidade circadiana, bem como a variação diurna do processo secretório das células beta pancreáticas, considerando-se que a secreção de insulina está intimamente relacionada com as variações da condutância iônica e da concentração de Ca^{2+} das células beta conforme demonstrado por Tanaka et al, (1990).

Recentemente foi demonstrado que a vagotomia modifica o fluxo do $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas de ratos, visto que nessa análise destaca-se que a avaliação se deteve a responsividade a glicose (SILVA et al., 2009). Por outro lado, cabe reiterar que o aminoácido arginina também estimula a secreção de insulina (TANAKA et al., 1990).

Uma análise primorosa sob o efeito da arginina no processo de secreção insulínica sugere que, este aminoácido pode ter ação

complementar na dinâmica de despolarização da membrana sendo desencadeada pela glicose (SMITH et al., 1997). Esta captação é mediada por um transportador de aminoácidos catiônicos da família mCAT2A (CLOSS e al., 1993).

Sabe-se que o eixo potencializador da arginina sobre a ação da glicose, depende de alterações na concentração de cálcio, sendo instigante o fato que exista relação com o aumento na produção de óxido nítrico (NO) pela célula beta. Contudo, um estudo publicado na década de 90, não evidenciou aumento na concentração de Ca²⁺ intracelular, necessário para a ativação da secreção de insulina em baixa concentração de glicose (5,6 mM) (SMITH et al., 1997).

Por outro lado, os resultados atuais mostram que na fase pós-vagotomia, houve rompimento das relações funcionais no controle das funções pancreáticas, frente ao estímulo induzido pela arginina, visto que houve aumento do efluxo do ⁴⁵Ca²⁺ em ilhotas perfundidas com 8,3 mM de glicose e 20 mM de arginina. Assim, pode-se atestar que o aminoácido arginina ativa correntes de cálcio para o interior da célula beta.

As ilhotas isoladas 15 e 30 dias após vagotomia, elucidaram 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 se comparado ao efluxo observado no grupo controle, fato sugestivo de que a vagotomia também afeta a sensibilidade das ilhotas mediante à estimulação combinada, glicose-arginina.

5. Considerações Finais

Os dados encontrados nesse estudo revelam que a vagotomia modifica a resposta das células beta ao secretagogo arginina, fato este que possivelmente afeta a permeabilidade da membrana, devido à ausência do trofismo mediado pela inervação vagal.

Referências Bibliográficas

BERGGREN, P.O.; LEIBIGER, I.B. Novel aspects on signal-transduction in the pancreatic B-cell. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.** v. 16, n. 1, p. 7-10, 2006

BERTHOUD, H.R.; FOX, E.A.; POWER, T.L. Localization of vagal preganglionics that stimulate insulin and glucagon secretion. **Am J physiol.** v. 258, p.160-168, 1990.

BERTRAM, R.; SHERMAN, A.; SATIN, L.S. Metabolic and electrical oscillations: partners in controlling pulsatile insulin secretion. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 293, n. 4 p. E890-900, 2007.

BUETTNER, C.; CAMACHO, R.C. Hypothalamic control of hepatic glucose production and its potential role in insulin resistance. **Endocrinol Metab Clin North Am.** v. 37, n. 4, p. 825-40, 2008.

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. **Journal of Biological Chemistry.** v. 268, p. 7538-7544, 1993.

DEMURO, G.; OBICI, S. Central nervous system and control of endogenous glucose production. **Curr Diab Rep.** v. 6, n. 3, p. 188-93, 2006.

GAUTAM, D.; JEON, J.; LI, J.H.; HAN, S.J.; HAMDAN, F.F.; CUI, Y.; LU, H.; DENG, C.; GAVRILOVA, O.; WESS, J. Metabolic roles of the M3 muscarinic acetylcholine receptor studied with M3 receptor mutant mice: a review. **J Recept Signal Transduct Res.** v. 28, n. 1-2, p. 93-108, 2008.

KOSTYUK, P.G. Investigations of calcium homeostasis mechanism in nerve cells and their alterations during brain pathology. **Fiziol. Zn. Im. I. M. Sechenova.** v. 83, n. 5-6, p. 2-18, 1997.

LEIBIGER, I.B.; BRISMAR, K.; BERGGREN, P.O. Novel aspects on pancreatic β -cell signal-transduction. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 396, n. 1, p. 111-115, 2010.

LOUIS-SYLVESTRE J. Feeding and metabolic patterns in rats with truncular vagotomy or with transplanted-cells. **Am J Physiol.** v. 92, p. 119-125, 1978.

SILVA, C.A.; PARDI, A.C.R.; ARRUDA, E.J.; GRASSI, D.O.; SEVERI, M.T.M.; GONÇALVES, A.A. Vagotomia modifica o

efluxo do cálcio nas ilhotas pancreáticas. **Medicina** (Ribeirão Preto). v. 42, n. 2, p. 135-140, 2009.

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 of Physiol**. v. 449, n. 3, p. 625-635, 1997.

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 adminisyrtration of atropine. **Endocrinology**. v. 127, p. 2017-2023, 1990.

Anexos

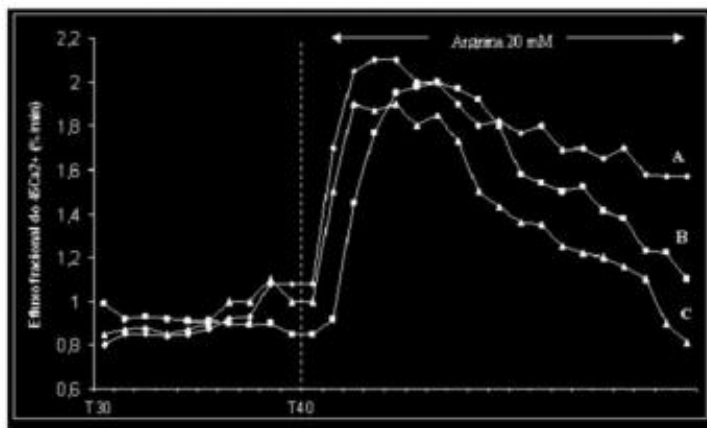


Figura 1. Efeito da adição de arginina (20mM) sobre a constante de efluxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, induzida por 3,3mM de glicose, em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle (A) e vagotomizados pós-operatório de 15 (B) e 30 dias (C). Após adaptação, as ilhotas foram perfundidas por solução de Krebs-bicarbonato com 3,3mM de glicose até o 40º minuto (T40). A linha vertical interrompida indica o início da perfusão com arginina. Cada ponto representa a média de 4 câmaras, cada qual, contendo 200 ilhotas.