



ANA CRISTINA VENDRAMETTO VARRONE GIACOMINI

EFEITOS AGUDOS E CRÔNICOS DA VAGOTOMIA SUBDIAFRAGMÁTICA SELETIVA SOBRE A PERMEABILIDADE AO K⁺ NA MEMBRANA DE ILHOTAS DE LANGERHANS, ARMAZENAMENTO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E RESPOSTA GLICÊMICA À INSULINA EM RATOS.

Tese submetida ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP- para obtenção do grau de *Mestre* em Ciências Biológicas, na área de Fisiologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Antônio Ari Gonçalves

Campinas - São Paulo

1994

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Ana Cristina Vendrametto Varrone Giacomini e aprovada pela Comissão Julgadora.



4226156

Dedico
Às grandes motivações de minha vida
Fernando e Luidia

AGRADECIMENTOS

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Fisiologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, e aos seus professores.

Aos professores Drs. **Maria Alice Hoffling, Antonio Carlos Boschero e Francesco Langone** pela análise prévia deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Pâncreas Endócrino pelo auxílio nos experimentos.

Aos estagiários Alexandre Taveira de Souza e Fabiana Pavan.

Aos técnicos José Ribeiro, Herval de L. Almeida e Léscio D. Teixeira pelos serviços prestados.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia, IB - UNICAMP.

Aos funcionários e pós-graduandos do laboratório de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas - UNICAMP.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica, IB - UNICAMP.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

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

Ao prof. **Antônio Ari Gonçalves** pela orientação, confiança e amizade.

Ao prof. **Francesco Langone** pela colaboração no estudo morfológico, pelo incentivo e amizade.

Ao amigo **Carlos A. Silva** pela grande contribuição na elaboração deste trabalho e principalmente pela amizade.

À Sra. **Maria do Rosário Cominatto** pela dedicação e afeto durante este período.

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

Aos familiares pelo carinho e solidariedade.

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Eletrofisiologia e Pâncreas Endócrino no Departamento de Fisiologia e Biofísica - Instituto de Biologia - **UNICAMP** e teve apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - *CNPq*.

INDICE

1) INTRODUÇÃO.....	01
2) OBJETIVOS.....	20
3) MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Animais.....	23
3.2 Cirurgia.....	24
3.3 Verificação morfológica da eficácia da vagotomia.....	24
3.4 Técnica de imuno-histoquímica.....	26
3.5 Dosagem de Ácido Ascórbico da glândula adrenal.....	29
3.6 Técnica de isolamento de ilhotas de Langerhans.....	30
3.7 Incubação com radioisótopos e perfusão.....	32
3.8 Soluções.....	34
3.9 Protocolos realizados com $^{86}\text{Rb}^+$	37
3.10 Determinação do Glicogênio	38
3.11 Teste de Tolerância à Insulina.....	39
3.12 Cálculos e tratamento estatístico.....	40
3.13 Reagentes, Radioisótopos e Tratamentos	41
4.) RESULTADOS.....	43
4.1 Verificação morfológica da eficácia da vagotomia.....	44
4.2 Dosagem de ácido ascórbico.....	51
4.3 Efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$	52
4.4 Determinação de glicogênio.....	65
4.5 Teste de tolerância à insulina.....	70

5.) DISCUSSÃO.....	76
6.) CONCLUSÕES.....	95
7.) RESUMO.....	97
8.) SUMMARY.....	100
9.) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

1. INTRODUÇÃO

A secreção de insulina pelas células β pancreáticas depende de uma complexa interação entre sinais metabólicos e neurais onde o estímulo neural pode modular a secreção desencadeada pelos estímulos metabólicos. Entre outros fatores, o sistema neurovegetativo através de suas divisões simpática e parassimpática desempenha papel importante na modulação da secreção de insulina desencadeada pelos estímulos metabólicos e, portanto, na manutenção da homeostasia glicêmica.

A participação do sistema nervoso no controle da glicemia vem sendo estudada, desde o século XIX, a partir dos experimentos pioneiros de Claude Bernard (*apud* CAMPFIELD *et al.*, 1984). Estudos desenvolvidos *in vivo*, através da estimulação dos nervos vago ou esplâncnico ou então, após lesões de áreas do hipotálamo ventromedial e lateral, têm demonstrado a importância da integridade dessas vias nervosas para a modulação do estímulo secretório (BERTHOUD & JEANRENAUD, 1979; TORDOFF & NOVIN, 1982; CAMPFIELD & SMITH, 1983; JEANRENAUD & JEANRENAUD, 1987; NIJIMA, 1986, 1989; BERTHOUD *et al.*, 1990).

O pâncreas é ricamente innervado por fibras do sistema nervoso simpático e parassimpático. As fibras nervosas, em sua

maioria não mielinizadas, penetram nas ilhotas pancreáticas acompanhando os capilares sanguíneos formando o plexo nervoso peri-insular (PURWAR, 1975; SMITH & PORTE, 1976; KAMEL *et al.*, 1979). Foi demonstrada também a presença de fibras vagais aferentes que conectam as ilhotas ao sistema nervoso central (NEUHUBER, 1989). Além desse suprimento nervoso extrínseco, corpos celulares semelhantes aos dos neurônios pós-ganglionares parassimpáticos foram observados no interior das ilhotas (SMITH & PORTE, 1976). Esses gânglios intrapancreáticos também são supridos pelos nervos vago e esplâncnico (PURWAR, 1975; SMITH & PORTE, 1976; KAMEL *et al.*, 1979; MILLER, 1981). É interessante observar que no rato do deserto, *Acomys cahirinus*, as ilhotas são desprovidas de qualquer estrutura nervosa visível. Esses ratos, quando mantidos em dieta semelhante aos ratos de laboratório, apresentam deficiência na secreção de insulina e intolerância à glicose (ORCI *et al.*, 1970; IONESCU & JEANRENAUD, 1988).

É sabido que a secreção de insulina mediada neuralmente (fase - cefálica) ocorre antes da absorção dos nutrientes, e é iniciada pela estimulação de receptores sensoriais na região da orofaringe e pelo estímulo olfatório e visual. Essas informações são integradas no sistema nervoso central de onde partem fibras vagais eferentes que estimulam a liberação de insulina. NIJIMA,

(1991 a, b, c) demonstrou que a estimulação da língua pelo sabor doce (D-glicose 5% ou sucrose 10%) causou aumento na atividade elétrica dos ramos pancreático e hepático do nervo vago e diminuição das descargas do nervo esplâncnico nos ramos da adrenal, pancreático e hepático. O estímulo pelo sabor salgado (NaCl 5%) resultou em efeitos opostos. Esse controle reflexo, pré-absortivo, das funções viscerais a partir da estimulação gustativa em ratos normais e em ratos decerebrados, foi bloqueado após a anestesia local da língua (NILJIMA, 1991a). Essa capacidade neurosensorial de detectar a glicose encontra-se prejudicada em diabéticos, e é explicada pela anormalidade da via aferente que se origina na língua, a qual está de acordo com a principal característica da síndrome de falta de responsividade à glicose (HALTER *et al.*, 1975).

O primeiro pico pré-absortivo de secreção de insulina, reflexamente induzido pela introdução do alimento na cavidade oral foi abolido em ratos diabéticos 15 dias após transplante pancreático na cápsula renal e em ratos normais submetidos à vagotomia truncular (LOUIS-SYLVESTRE, 1978 a). Esses resultados sugerem que o reflexo é provocado através da estimulação das células β pelo vago. Por sua vez, o segundo pico da secreção de insulina, desencadeado pela presença do alimento na porção gastroduodenal, não pode ser atribuído à estimulação

vagal direta das células β . Embora tenha sido abolido pela vagotomia truncular, foi mantido em ratos diabéticos após transplante de tecido pancreático; portanto mesmo ilhotas denervadas manifestaram a resposta (LOUIS-SYLVESTRE, 1978a).

Durante o processo de digestão e absorção dos alimentos os reflexos enteropancreáticos colinérgicos vagais, são importantes mediadores da secreção pancreática exócrina. A secretina liberada em resposta ao HCl^- por sua vez, é a maior reguladora pós-prandial da secreção de bicarbonato pelo pâncreas. Seus efeitos são potencializados pela inervação extrínseca (vagal) e intrínseca (intrapancreática) e pela liberação de outros hormônios como a colecistoquinina (SINGER, NIEBEL & LAYER, 1987). A secreção pancreática induzida pela acidificação duodenal foi significativamente inibida pela atropina ou pela vagotomia (MEI, 1991).

Foi demonstrado em animais normais, que o sistema nervoso simpático exerce um tônus inibitório sobre a secreção de insulina, enquanto que o sistema nervoso parassimpático não apresenta tônus estimulatório (JEANRENAUD & JEANRENAUD, 1987). Todavia, lesões bilaterais no hipotálamo ventromedial (VMH), revertem esta situação, ocorrendo ativação parassimpática com conseqüente hiperinsulinemia (BERTHOUD & JEANRENAUD,

1979; JEANRENAUD & JEANRENAUD, 1987) e desenvolvimento de obesidade (INOUE & BRAY, 1977; JEANRENAUD & JEANRENAUD, 1987). Ambos os efeitos podem ser devidos ao aumento da atividade elétrica do ramo pancreático vagal pois, foram revertidos pela secção desse ramo (BERTHOUD & JEANRENAUD, 1979; INOUE & BRAY, 1977).

A vagotomia bilateral subdiafragmática rompe o equilíbrio existente entre as vias que controlam a glicemia através da inervação autonômica, liberando as células das ilhotas do controle central efetuado pelos núcleos dorsal motor do vago e trato solitário, os quais estão sob influência de grupamentos neuronais do hipotálamo ventromedial e lateral (NIIJIMA, 1986 ; NIIJIMA *et al.*, 1988; DORETTO, 1989).

A via aferente que alcança o sistema nervoso central origina-se a partir dos receptores de nutrientes localizados desde a orofaringe até o intestino delgado. Foi demonstrado que a administração de glicose intraperitoneal (i.p.) é um estímulo muito mais eficaz para desencadear a secreção de insulina do que a infusão intravenosa (i.v.) devido à estimulação de glicorreceptores hepáticos, intestinais e pancreáticos (NIIJIMA, 1969, 1982; MEI, 1978). A administração de D-glucose na veia porta reduziu a atividade aferente do ramo hepático e aumentou a atividade eferente do ramo pancreático do nervo vago em cobaias *in situ*

(NIJIMA, 1969). Com base nesses dados e em estudos posteriores, foi sugerida a existência de um circuito neural que modularia a liberação de insulina através de aferentes vagais hepáticos e de eferentes vagais pancreáticos (SAKAGUCHI & YAMAGUCHI, 1979).

A sugestão de RUSSEK (1963) de que os sinais gerados pelos receptores hepáticos relacionados com a concentração de glicose no sangue venoso portal seriam conduzidos para o sistema nervoso central através do nervo vago, foi comprovada posteriormente em estudos eletrofisiológicos (SAKAGUCHI & YAMAGUCHI, 1979; NIJIMA, 1969, 1982; LEE & MILLER, 1985; NAGASE *et al.*, 1990). De acordo com LEE & MILLER (1985), as fibras aferentes do nervo vago exercem inibição tônica sobre os grupamentos neuronais superiores do sistema neuroendócrino. A estimulação elétrica do ramo hepático do nervo vago resultou na diminuição progressiva da concentração de insulina plasmática. Por outro lado, a secção deste ramo resultou cronicamente em aumento na concentração plasmática de insulina, o qual foi revertido após 20 minutos, pela secção do ramo celíaco. Em contraste, a análise aguda após a secção do ramo hepático do nervo vago demonstrou diminuição nos níveis plasmáticos de insulina portal (LEE & MILLER, 1985).

Os dados da literatura indicam que os nervos hepáticos

podem ter função permissiva na expressão completa dos efeitos da insulina pois, na ausência de inervação hepática, a insulina exerce efeito menor sobre o fígado, tornando-o menos eficiente no armazenamento de glicose sob a forma de glicogênio. A estimulação desses nervos em ratos normais tem efeitos sinérgicos com a insulina causando rápida diminuição na saída de glicose hepática e, aumentando a deposição de glicogênio (MONDON & BURTON, 1971; GARDERMANN & JUNGEMANN, 1986). A ativação da glicogênio sintetase ocorre mais rapidamente após estimulação direta do nervo vago do que somente pela presença de insulina (SHIMAZU, 1974). A vagotomia bilateral reduziu a deposição de glicogênio hepático em ratos, enquanto a administração de acetilcolina permitiu a restauração dos níveis normais de armazenamento (MONDON & BURTON, 1971). Portanto, o efeito da insulina sobre a regulação glicêmica é marcadamente reduzido na ausência da inervação do plexo hepático anterior (XIE *et al.*, 1993) ou de estimulação colinérgica (SHIMAZU, 1974).

A neuropatia parassimpática foi sugerida como um fator que contribui para a resistência à insulina em diabéticos não obesos e em ratos cirróticos (LAUTT, 1979; OKAZAKI *et al.*, 1992). No diabetes Tipo II (não obeso) o evento patológico inicial é a neuropatia parassimpática hepática (HOSKING *et al.*, 1978). Nesta

patologia, a saída da glicose do fígado resulta em hiperglicemia pós-prandial, que por sua vez leva ao hiperinsulinismo e como consequência, à redução da sensibilidade periférica à insulina, característica clássica do diabetes Tipo II (HOSKING, 1978; LAUTT, 1979; DE FRONZO *et al.*, 1992). Como resultado dessa linha de raciocínio especulativo foi sugerido que a hiperglicemia pós-prandial poderia ser evitada com a administração de drogas colinérgicas para reestabelecer a disfunção parassimpática hepática (HOSKING, 1978; LAUTT, 1979).

Apesar da enorme quantidade de informações que se tem a respeito da modulação nervosa na secreção de insulina, ainda há controvérsias na caracterização da (s) via (s) eferente (s) e aferente (s) às células secretoras da ilhota. Na região abdominal subdiafragmática o nervo vago está representado por dois troncos, o anterior (direito) e o posterior (esquerdo). O tronco anterior percorre a parede anterior do esôfago e se divide formando os ramos hepático, anterior gástrico e, em alguns casos, o celíaco acessório. O tronco posterior percorre a porção posterior do esôfago e se ramifica dando origem aos ramos celíaco e posterior gástrico (POWLEY *et al.*, 1983; BERTHOUD *et al.*, 1983; PRECHTL & POWLEY, 1985; BERTHOUD *et al.*, 1990).

Em animais intactos, a estimulação do tronco vagal cervical direito ou do esquerdo provoca aumento dos níveis de insulina e

glicose plasmática (BERTHOUD *et al.*, 1983; 1990). BERTHOUD *et al.* (1983) verificaram que resposta obtida após a estimulação do tronco vagal cervical direito foi abolida pela transecção bilateral do vago subdiafragmático. Por outro lado, a resposta obtida após a estimulação cervical esquerda foi abolida pela transecção do ramo hepático subdiafragmático.

Vários estudos sugeriram que o ramo celíaco (pancreático) é o principal ramo que inerva as células β pancreáticas (WOODS & BERNSTEIN, 1980; BERTHOUD *et al.*, 1983; LEE & MILLER, 1985). Entretanto, BERTHOUD *et al.*, (1990), utilizando estimulação elétrica do vago cervical, estudaram a mediação dos ramos vagais sobre a indução da secreção de insulina e de glucagon, em ratos, e não encontraram alterações significativas após a estimulação das fibras que se projetavam para os ramos celíaco e celíaco acessório. A resposta de ambos os hormônios foi dependente da integridade dos ramos gástricos (posterior e anterior) e do ramo hepático .

O estudo do mecanismo de secreção de insulina tem apresentado muitos progressos ao longo dos últimos 20 anos, levando ao esclarecimento de muitos dos eventos que ocorrem nas etapas iniciais (MALAISSE *et al.*, 1984; BOSCHERO *et al.*, 1984; ATWATER *et al.*, 1989). Estes estudos foram desenvolvidos principalmente com ilhotas de Langerhans isoladas as quais

representam uma preparação agudamente denervada, embora persistam terminações nervosas no interior das mesmas. Aparentemente, estas terminações não parecem afetar significativamente as etapas iniciais do processo de acoplamento entre o estímulo e a secreção.

As principais etapas que levam à secreção de insulina induzida pela glicose têm sido identificadas. A glicose, modifica a permeabilidade iônica (BOSCHERO *et al.*, 1977; MALAISSE *et al.*, 1978; GYLFE *et al.*, 1978; CARPINELLI & MALAISSE, 1981; SEHLIN & FREINKEL, 1983; ATWATER *et al.*, 1984; DAWSON *et al.*, 1985; SCOTT *et al.*, 1985), o padrão metabólico (para revisão, MALAISSE *et al.*, 1984), e o acoplamento intercelular (ORCI, 1976; EDDLESTONE *et al.*, 1984; MEDA *et al.*, 1984) estimulando a secreção de insulina pelas células β .

A glicose penetra na célula β através de um transportador presente na membrana, designado GLUT2 (BELL *et al.*, 1990; THORENS *et al.*, 1990), é fosforilada pela glicoquinase e então é metabolizada. Como resultado desse processo, ocorre aumento da razão ATP / ADP levando ao fechamento dos canais K^+ sensíveis ao ATP (K^+ -ATP) e à despolarização da membrana (COOK & HALES, 1984; ASHCROFT, 1988). Esta resulta na abertura dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem e no início da atividade elétrica. O aumento do influxo de Ca^{2+} leva ao aumento da

concentração intracelular desse íon ($[Ca^{2+}]_i$), o qual *per se*, ou associado à segundos-mensageiros provoca migração e extrusão dos grânulos secretores para o meio extracelular (exocitose) através de um mecanismo efetor, composto por componentes sub-celulares representados pelos microtúbulos, microfilamentos e pela própria membrana celular da célula β (BOSCHERO *et al.*, 1984; MALAISSE *et al.*, 1984; ATWATER *et al.*, 1989; ASHCROFT & RORSMAN, 1989; LEAHY *et al.*, 1992). A ocorrência de um defeito em alguma parte dessa cascata de eventos pode, teoricamente, causar falta de responsividade à glicose ligada à hiperglicemia (LEAHY *et al.*, 1992).

O potencial de membrana da célula β é determinado principalmente pela atividade dos canais de K^+ sensíveis ao ATP (K^+ -ATP). Esses canais são bloqueados pelos nutrientes metabolizados pela célula β (glicose, leucina) e certos agentes farmacológicos (sulfoniluréias, tolbutamida e glibenclamida). Os barbituratos também diminuem a atividade dos canais K^+ -ATP (KOSLOWSKI *et al.*, 1989; GONÇALVES & ATWATER, 1991). Outros bloqueadores de canais K^+ , não específicos incluem, entre outros, a quinina, a tetraetilamônia, a esparteína, e anestésicos locais (para revisão, ASHCROFT & RORSMAN, 1989).

Por outro lado, a abertura dos canais K^+ -ATP inibe a secreção de insulina. O agente mais potente que promove esse

efeito é a diazoxida, uma sulfonamida utilizada como anti-hipertensivo. Esta reverte os efeitos da glicose sobre o potencial de membrana induzindo a abertura dos canais de K^+ -ATP (PETERSEN & FINDLAY, 1987; KOSLOWSKI *et al.*, 1989).

Em concentrações de glicose não estimulatórias (abaixo de 2,8 mM), a célula β permanece eletricamente silente, apresentando potencial de membrana próximo ao potencial de equilíbrio do K^+ (-70 mV) (ATWATER *et al.*, 1978 a). O aumento da glicose para concentrações supralimiais (acima de 7mM), fecha os canais K^+ -ATP, provocando despolarização suficiente para atingir o limiar de potencial de ação (-40mV) e iniciar a atividade elétrica típica ("bursts"). A fase da despolarização do potencial de ação a partir do platô, resulta da ativação de canais de Ca^{2+} do tipo L (RORSMAN & TRUBE, 1986; ATWATER *et al.*, 1989). A repolarização do potencial de ação envolve a ativação de canais de K^+ sensíveis à voltagem (retificadores) e canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} . Enquanto a repolarização do "burst" envolve principalmente a inativação dos canais de Ca^{2+} (L) e provavelmente os canais de K^+ (Ca^{2+}) (ATWATER *et al.*, 1989). As correntes de Na^+ também parecem desempenhar importante função na geração do potencial de ação em células β de cães (PRESSEL & MISLER, 1990) e provavelmente em ratos e camundongos (GONÇALVES *et al.*, 1993, 1994).

Foi verificado, que na presença de 11,1 mM de glicose, durante as fases da atividade elétrica, há oscilação entre valores de alta resistência à entrada de corrente ($1,2 \times 10^8 \Omega$) antes de cada "burst" e baixa resistência ($0,9 \times 10^8 \Omega$) durante a fase ativa, na base do potencial de ação (ATWATER *et al.*, 1978 a ; ATWATER *et al.*, 1982). O aumento de resistência à entrada de corrente em células β de camundongos, observada após a adição de glicose, deve-se à diminuição da condutância da membrana ao K^+ (ATWATER *et al.*, 1978 a) em virtude do fechamento dos canais de K^+ (principalmente os sensíveis ao ATP) (ATWATER *et al.*, 1989; ASHCROFT, 1988; MISLER *et al.*, 1989). A redução da condutância corresponde aos efeitos da glicose e de outros segretagogos metabolizáveis, diminuindo o efluxo de ^{42}K ou $^{86}Rb^+$, observado por vários pesquisadores em ilhotas de Langerhans isoladas de ratos ou camundongos (SEHLIN & TÄLJEDAL, 1975; BOSCHERO *et al.*, 1977; MALAISSE *et al.*, 1978; BOSCHERO & MALAISSE, 1979; HENQUIN, 1978; CARPINELLI & MALAISSE, 1981; HENQUIN & MEISSNER, 1984; CROGHAN *et al.*, 1985; GONÇALVES *et al.*, 1986 a, b) e as oscilações correspondem à diminuição repentina da permeabilidade ao K^+ , seguida por aumento na condutância à outros íons (Na^+ e Ca^{2+}).

A modulação da secreção de insulina induzida pela glicose é

feita por agentes potencializadores (hormônios, neurotransmissores e agentes farmacológicos). Dentre eles, estão incluídos: o glucagon, a acetilcolina, a bombesina, o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), o peptídeo inibidor gástrico (GIP) e os agonistas purinérgicos. Nenhum deles é capaz de estimular a secreção de insulina na ausência de nutrientes segretagogos ou de Ca^{2+} extracelular (ASHCROFT & RORSMAN, 1989). Tem sido sugerido que a entrada de Ca^{2+} assim como a mobilização de estoques intracelulares desse íon, são parte integral da sequência de eventos (GAGERMAN *et al.*, 1978; WOLLHEIM *et al.*, 1980). Posteriormente, HERMANS *et al.*, (1987) mostraram que a estimulação da secreção de insulina pela acetilcolina não era resultado da mobilização de Ca^{2+} celular, mas sim da despolarização da membrana e ativação dos canais de Ca^{2+} .

Tem sido proposto que a hidrólise de fosfolipídios da membrana representa um sistema modulatório chave para a resposta insulínica aos diferentes segretagogos. A etapa inicial é a ativação da enzima fosfolipase C, a qual converte o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) à inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ mobiliza Ca^{2+} de estoques intracelulares, ativando o sistema Ca^{2+} - calmodulina que por sua vez ativa proteínas quinases. O DAG causa translocação da proteína quinase C (PKC) para a membrana celular (GANESAN *et*

al., 1990), a qual fosforila outras proteínas. O resultado final é o processo de migração e extrusão de grânulos secretórios contendo insulina (LEAHY *et al.*, 1992).

Em ilhotas de camundongos, a atividade elétrica, que reflete os efeitos iniciais dos secretagogos de insulina, somente foi potencializada pela carbamilcolina quando em presença de 8 mM de glicose (SANTOS & ROJAS, 1989). Em concentrações sublimiares de glicose, a acetilcolina, ou seu análogo mais estável a carbamilcolina, despolariza a membrana da célula β mas não inicia a atividade elétrica e a secreção de insulina. Em ilhotas isoladas de ratos e perfundidas com agonistas colinérgicos o aumento na secreção somente ocorreu em presença de glicose (IVERSEN, 1973; CAMPFIELD & SMITH, 1980).

SANTOS & ROJAS, (1989) verificaram que a adição de acetilcolina produziu uma alteração multifásica no padrão da atividade elétrica consistindo de um curto período de atividade de "burst" constante, seguida por redução na atividade elétrica e então por uma fase de intensa atividade de "burst". Após a remoção da acetilcolina ocorreu hiperpolarização da membrana plasmática e diminuição da frequência de "burst", recuperando o padrão anterior à aplicação do agonista. A nicotina não teve efeito sobre a atividade elétrica induzida pela glicose; enquanto que a muscarina mimetizou o efeito observado com a aplicação de acetilcolina.

Com isso, foi demonstrado que a acetilcolina atuava sobre receptores muscarínicos.

Recentemente, foi demonstrada a existência de 4 tipos de receptores muscarínicos : M1, M2, M3 e M4 (BONNER *et al.*, 1987). Foi demonstrada a presença de receptores M3 na célula β e nas células acinares do pâncreas exócrino (VERSPOHL *et al.*, 1990). Esta conclusão é reforçada pelo fato que em diferentes linhagens de células de mamíferos, os subtipos M1 e M3 são acoplados ao sistema de mensageiro de fosfoinosítídeos da mesma forma à aquela encontrada na célula β . BOSCHERO *et al.*, (1994) verificaram a presença de receptores M1 e M3 nas ilhotas pancreáticas. Todavia os dados farmacológicos obtidos por esses autores indicaram que somente o M3 desempenha papel relevante na secreção de insulina.

Embora seja amplamente aceito o fato da secreção de insulina e a atividade elétrica estimulada pela acetilcolina ocorrerem via ativação de receptores muscarínicos, os mecanismos detalhados pelos quais a ativação desses receptores desencadeia a liberação do hormônio e as alterações iônicas na membrana ainda permanecem obscuros. Sabe-se que seus efeitos sobre a atividade elétrica e sobre a secreção de insulina são dependentes da presença de Na^+ extracelular e são abolidos pela atropina, sugerindo-se que a ativação dos receptores muscarínicos abre canais de Na^+

(ASHCROFT & RORSMAN, 1989).

É possível atribuir o efeito excitatório da acetilcolina à inibição da permeabilidade ao K^+ por receptores muscarínicos pois a exposição à acetilcolina foi acompanhada por aumento na resistência à entrada de corrente, de forma semelhante à exposição a bloqueadores de canais de K^+ (SANTOS & ROJAS, 1989)

MATHIAS *et al.*, (1985) verificaram que a carbamilcolina causa, de forma dose-dependente, aumento rápido no efluxo de $^{86}Rb^+$, enquanto que os nutrientes segretagogos usualmente diminuem o efluxo. Os autores atribuíram esse efeito à uma modalidade de canal de K^+ dependente do Ca^{2+} . Esse fato foi comprovado pelos resultados de BORDIN *et al.*, (1994) os quais mostraram que a presença de glicose (11,2mM) e de um agonista colinérgico (oxotremorina-m 0,1 e 10 μ M) provocou aumento na frequência de "bursts" nas células β e no efluxo de $^{86}Rb^+$ em ilhotas isoladas. Ambos os efeitos foram bloqueados por caribdotoxina, um bloqueador específico da permeabilidade ao K^+ dependente de Ca^{2+} (K^+ - Ca^{2+}).

As alterações nos fluxos iônicos transmembrana causados pela acetilcolina ou carbamilcolina (5 à 500 mM), provavelmente não requerem a participação de GMPc e AMPc (GAGERMAN *et al.*, 1978). MATHIAS *et al.*, (1985) sugeriram que a glicose e a carbamilcolina causa rápida e mantida ativação da fosfolipase A_2

em ilhotas intactas. Propuseram que a ativação da fosfolipase A₂ especialmente em ilhotas expostas à carbamilcolina, pode ser resultado da hidrólise de fosfolipídeos a qual resulta no acúmulo de ácido fosfatídico. Os agentes colinérgicos podem mobilizar Ca²⁺ de organelas intracelulares, não mitocondriais ou seja, através da geração de inositol 1,4,5-trifosfato a partir do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (MATHIAS *et al.*, 1985).

A interrupção do ramo vagal que inerva o pâncreas pode induzir a longo prazo, a alterações na sensibilidade das ilhotas à acetilcolina, possivelmente pela supressão funcional dos receptores a esse neurotransmissor (CAMPFIELD *et al.*, 1984). Os efeitos dos agonistas colinérgicos sobre os fluxos de ⁸⁶Rb⁺ e ⁴⁵Ca²⁺ (MATHIAS *et al.*, 1985; HENQUIN, 1978), sugerem que o controle nervoso da secreção de insulina pode ser intermediado por alterações na permeabilidade iônica das ilhotas de Langerhans e, por conseguinte, a denervação crônica poderia alterar a sensibilidade das ilhotas de Langerhans aos segretagogos e causar um desequilíbrio na regulação glicêmica.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos agudos e crônicos da vagotomia subdiafragmática seletiva sobre a sensibilidade das ilhotas de Langerhans à glicose e à carbamilcolina (*in vitro*), bem como, os efeitos dessa denervação sobre o armazenamento de glicogênio hepático e a sensibilidade à insulina (*in vivo*).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratos albinos Wistar, machos, de 2 a 4 meses de idade, procedentes do Biotério Central da Unicamp foram mantidos no Departamento de Fisiologia e Biofísica, com ração comercial (Labina-Purina) e água *ad libitum* sob período de 12:12 horas luz/escuro a 23° C até serem utilizados nos experimentos.

Os ratos foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais: ratos controle e ratos submetidos à vagotomia seletiva dos ramos hepático ou pancreático. Esses ratos foram utilizados para o estudo dos efeitos agudos e crônicos da vagotomia através de análises de curto (15 e 30 dias de recuperação pós-cirúrgica) e longo prazo (60 dias de período pós-cirúrgico). Esses efeitos foram estudados sobre os seguintes aspectos:

- efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ (substituto dos íons K^+) em ilhotas isoladas (15, 30 e 60 dias de pós-operatório).
- determinação da reserva de glicogênio no tecido hepático (15 e 60 dias de pós-operatório).
- teste de tolerância à insulina (15 dias de pós-operatório).

Um grupo de ratos submetidos à vagotomia do tronco anterior e outro de ratos normais expostos ao estresse físico por natação, foram utilizados para dosagem de ácido ascórbico das glândulas adrenais para observar os níveis de estresse desses ratos.

3.2. Cirurgia

Todos os ratos foram mantidos em jejum durante a noite anterior à cirurgia. Sob anestesia com pentobarbital sódio (50mg/Kg de peso) foi feita a tricotomia e assepsia com álcool na região abdominal. A seguir foi feita uma incisão no abdômem logo abaixo do esterno, expondo a porção do esôfago abaixo do hiato esofágico para evidenciar os troncos vagais, posterior e anterior, e as suas ramificações: gástricas, hepática, celíaca (pancreática) e celíaca acessória (Figura 1). Após a secção do ramo desejado, a incisão abdominal foi suturada com fio de algodão (5-0) e a assepsia dessa região foi feita com merthiolate (Lilly). A seguir foram administrados (0,2ml) de pentabiótico para animais de pequeno porte (Fontoura-Wyeth), via intramuscular em cada pata posterior. Os ratos operados retornaram ao biotério e foram tratados com terramicina (Pfizer) oral durante 5 dias.

3.3. Verificação morfológica da eficácia da vagotomia

Esta análise foi realizada com o objetivo de verificar se a porção do vago seccionada havia regenerado e assim comprovar a

eficácia da técnica cirúrgica. Um grupo de 6 ratos normais e outro de 7 ratos vagotomizados foi separado para o estudo morfológico da região esofágica subdiafragmática. Após serem privados de alimento por 12 horas, estes ratos foram anestesiados com hidrato de cloral (0,8 ml/350 gr de peso) e submetidos à tricotomia da região abdominal. A seguir foi feita a dissecação da região abdominal até o diafragma e, após o pneumotórax, o coração foi exposto. Após a abertura do ventrículo esquerdo com uma tesoura, foi inserida uma cânula até atingir a aorta. Essa cânula estava conectada à uma bomba de perfusão (Masterflex, easy-load, mod. 7518-10, Chicago, IL.) que, num primeiro momento, perfundiu o animal com 500 ml de solução salina 0,9% contendo anticoagulante Liquemine (Roche) e, em seguida, com 300 ml de solução de formol 10% por cerca de 15 minutos. Ao término desse procedimento, foi separado um bloco contendo diafragma, esôfago e estômago o qual foi mantido em Formol 10% por 24 horas. Após esse período o esôfago foi dissecado sob microscópio cirúrgico e dividido nas porções seguintes: cranial, média e caudal (Figura 1).

Após inclusão de cada uma das porções em parafina (Paraplast, Monoject - 83103, St. Louis, Mo.), foram obtidos cortes transversais de 5µm de espessura com auxílio de um micrótomo (Bio Cut, mod. 1130, Reichert-Jung, Alemanha). Os cortes destinados ao estudo histológico preliminar foram montados em lâminas de vidro recobertas com albumina e corados pela técnica Hematoxilina-Eosina.

3.4. Técnica de Imuno-histoquímica

A identificação dos neurofilamentos nos cortes obtidos da região esofágica, foi realizada através dos procedimentos habituais de imuno-histoquímica, empregando-se a técnica da Estreptavidina-biotina-peroxidase (ABC peroxidase) descritos por HSU *et al.*, (1981). As principais etapas estão descritas abaixo:

Os cortes de 5 μm de espessura foram montados em lâminas previamente tratadas com solução de organosilano a 2% (3-aminopropil-trietoxi-silano) em acetona e mantidos à temperatura ambiente até o momento da reação. Os cortes foram desparafinizados em banho de xilol em estufa a 60°C (15 minutos) seguido de 2 banhos de xilol (1 minuto cada) à temperatura ambiente. A hidratação foi realizada logo a seguir em gradiente decrescente de álcool, permanecendo 2 minutos em cada concentração: três banhos de álcool absoluto, um em álcool 80% e outro em álcool 50% ; todos em temperatura ambiente. Após estas etapas, os cortes foram lavados três vezes com H₂O destilada .

Em sequência, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena através da incubação por 15 minutos a 37°C em solução 3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30%) em metanol. Após a lavagem em água corrente e destilada, os cortes foram colocados em solução tampão citrato, pH 6,0 em forno microondas a 70°C

durante 5 minutos, por 2 vezes seguidas.

Após 10 minutos de resfriamento, os cortes foram incubados durante 20 minutos, à temperatura ambiente e em câmara úmida, com soro normal de cavalo (Vector pk 002) - diluição 1:10, para bloquear os sítios inespecíficos de reação e assim, evitar que o anticorpo primário se ligasse a antígenos inespecíficos, eliminando, dessa forma, a reação de fundo.

A reação antígeno-anticorpo primário foi obtida durante a incubação com o anticorpo primário anti-neurofilamento (Monoclonal Anti-Neurofilament 200) na diluição 1:40. A incubação foi realizada em câmara úmida durante toda a noite, a 4°C.

A seguir, as lâminas foram lavadas 3 vezes em solução tampão fosfato a 37°C. Foi então adicionado o anticorpo secundário biotilado e os cortes incubados por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. O anticorpo secundário utilizado foi o anti-IgGs de camundongo, coelho e cabra produzido em suíno, Biogenex-Multilink na diluição 1:200. Ao término da incubação, foram feitas 3 lavagens em solução tampão fosfato a 37°C. Após secagem, foi adicionado o complexo Estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABComplex) diluído 1:50 em solução tampão fosfato e incubados por 30 minutos em câmara úmida a 37°C. Após esse período, as lâminas foram colocadas em solução tampão

fosfato e foram coradas com DAB (3,3 tetra-hidrocloroeto diamino-benzidina), cromógeno de cor marrom que se precipita, no local onde ocorre a reação. Em seguida os cortes foram lavados em água corrente, passados em água destilada e contracorados com Hematoxilina de Mayer por 30 a 60 segundos. Após passagem em água amoniacal e em água corrente e destilada, os cortes foram desidratados e montados.

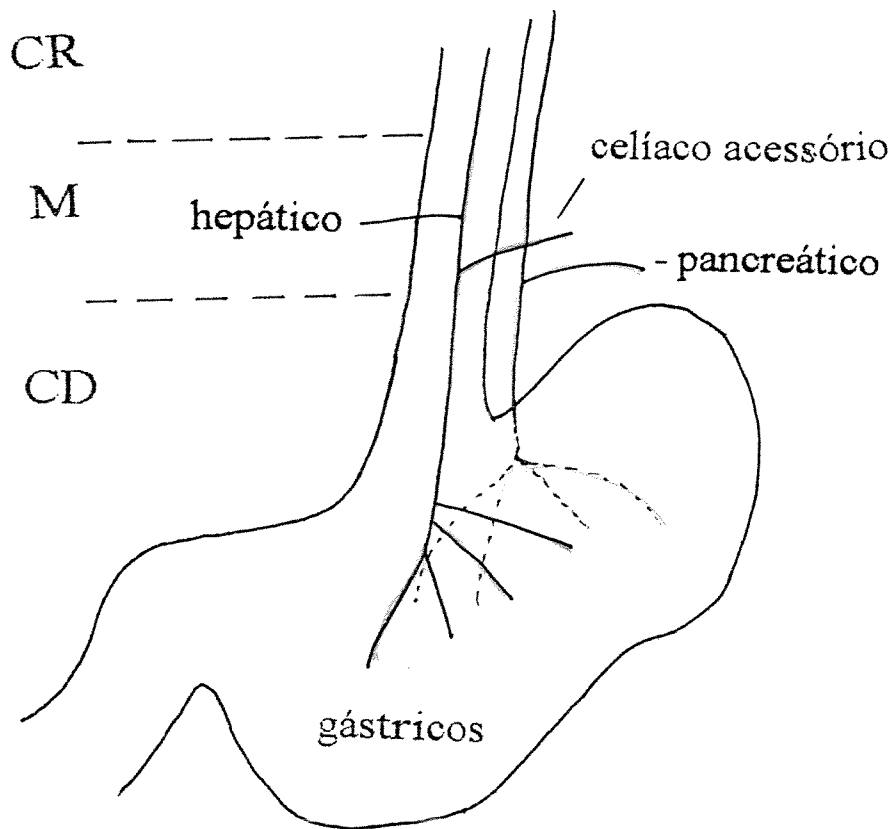


Figura 1: Representação da inervação subdiafragmática do nervo vago e das divisões cranial (CR), média (M) e caudal (CD). A inervação posterior está representada em azul e a anterior em vermelho.

3.5. Dosagem de Ácido Ascórbico da glândula adrenal

A dosagem da concentração de ácido ascórbico nas glândulas adrenais tem sido empregada para avaliar o índice de estresse em animais submetidos à exercícios ou outras manipulações. Considerando o envolvimento do ácido ascórbico na esteroidogênese (KITABCHI & WILLIAM, 1975) foi realizado a dosagem desse composto para verificar se a manipulação durante os procedimentos cirúrgicos da vagotomia provocava estresse nos ratos e, com isso poder avaliar os demais resultados eliminando essa variável. Os ratos foram distribuídos nos seguintes grupos: 1. controle ; 2. estresse por 50 minutos de natação e 3. vagotomizados.

Os ratos foram mortos por concussão cerebral seguida de decapitação. A seguir as glândulas adrenais foram retiradas, e, individualmente pesadas e maceradas, com 1 ml de ácido perclórico 0,4 N. Ao extrato obtido foi acrescentado 5 ml de ácido metafosfórico 2,5%. O ácido ascórbico foi determinado colorimetricamente pelo método proposto por MIDLIN & BUTLER (1938), que se baseia na extinção da cor da solução de 2,6 diclorofenolindofenol, devido à sua oxidação pelo ácido ascórbico. Após filtragem, foi retirada uma alíquota de 500 µl de

cada amostra para ser diluída em 500 ml de ácido metafosfórico e 1 ml da solução corante. Essas amostras foram lidas em espectrofotômetro (Spektromom, mod. 195 D, Alemanha) em 520 nm. Os valores obtidos foram calculados juntamente com os valores da curva padrão de ácido ascórbico conforme a equação dada por MIDLIN & BUTLER (1938):

$$[\mu\text{g}/\text{mg de tecido}] = \frac{\text{Br} - \text{amostra} \times \text{soma } [p] \times \text{diluição} \times 100}{\text{soma } (\text{Br} - p) \times \text{Peso da adrenal}}$$

onde, Br = absorbância do tubo branco;

p = absorbância do padrão.

3.6. Técnica de isolamento de ilhotas de Langerhans

Para as medidas do efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ utilizamos ilhotas de Langerhans isoladas de ratos de acordo com LACY & KOSTIANOVSKY (1967) com modificações.

Os ratos foram mortos por concussão cerebral seguida de decapitação. A seguir, o abdomen foi aberto para expor o fígado e o pâncreas. O ducto biliar foi canulado (cânula de polietileno)

próximo ao hilo do fígado e ligado na sua posição distal adjacente ao duodeno. Através de cânula foram injetados cuidadosamente 8,0 ml de solução de Hanks enriquecida com glicose (2,8 mM) que, fluindo em sentido retrógrado, através dos ductos pancreáticos, promoveu a divulsão do tecido acinoso. Uma pequena modificação no método de isolamento de ilhotas foi introduzida por medida de economia. Na solução de Hanks usada para a divulsão do tecido exócrino, foi acrescentada 0,75 mg/ml de colagenase (tipo p). A seguir o pâncreas foi removido da cavidade abdominal, colocado numa placa de Petri e limpo das porções gordurosas e dos gânglios linfáticos. O tecido foi transferido para um frasco e reduzido a fragmentos de aproximadamente 0,5 mm³ com auxílio de uma tesoura. Os fragmentos foram colocados em tubo de ensaio e colocados em banho-maria a 37°C durante aproximadamente 14 minutos, sob constante agitação. Nos 8 minutos iniciais, o conteúdo do tubo foi movimentado pela passagem de carbogênio (95% O₂ + 5% CO₂) e o restante do tempo por agitação manual. Neste período o tubo foi observado para determinar o momento final da fase de digestão com a colagenase. Após a incubação o material foi lavado 5 vezes com solução de Hanks para a remoção da colagenase, das enzimas digestivas liberadas durante a incubação e também fragmentos celulares. Um período de aproximadamente 2 minutos entre as lavagens foi necessário para decantação do material.

As ilhotas, completamente separadas do tecido acinoso, foram coletadas uma a uma, sob lupa, por aspiração com auxílio de uma pipeta Pasteur, previamente estirada e siliconizada.

3.7. Incubação com radioisótopo e Perfusão

O $^{86}\text{Rb}^+$ foi utilizado neste trabalho para a análise da permeabilidade ao K^+ como substituto desse íon. Tal procedimento justifica-se por motivos técnicos, uma vez que o $^{42}\text{K}^+$, ideal como traçador do $^{39}\text{K}^+$, apresenta meia vida muito curta (12,5 horas), o que dificulta sua utilização. O uso do $^{86}\text{Rb}^+$ como substituto do K^+ tem sido largamente utilizado (STIEVE & HARTUNG, 1977; SEHLIN & TÄLJEDAL, 1975), sendo a razão de efluxo e a permeabilidade de ambos muito semelhante (BOSCHERO & MALAISSE, 1977; CROGHAN, DAWSON, SCOTT & BANGHAM, 1984; GONÇALVES, CARNEIRO & BOSCHERO, 1986).

Após o isolamento, dois grupos contendo cerca de 150 ilhotas cada, foram transferidos para tubos de ensaio contendo 1ml de solução de Hanks enriquecida com glicose (2,8 mM) e albumina. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados, ao meio de incubação, 190 μl de solução de Krebs-Ringer contendo

2,8 mM de glicose e 10 µl de $^{86}\text{RbCl}$ (15 a 30 µCi / ml) . As ilhotas foram incubadas durante 90 minutos a 37° C, pH 7,4 equilibrado durante os 10 minutos iniciais com carbogênio (95% O_2 + 5% CO_2) . Após o período de incubação, as ilhotas foram lavadas três vezes com solução de Krebs-Ringer não radioativa e transferidas para uma câmara de perfusão (volume 0,3 ml) forrada com um filtro de acetato de celulose, com poros de diâmetro igual a 8 mm (Millipore Corp., Bedford, Mass.). Essas câmaras foram conectadas a um sistema de perfusão que consiste de dois recipientes, sendo um deles preenchido com a solução perfusora da condição inicial (solução de Krebs-Ringer com ou sem glicose 5,6 mM) e o outro contendo a solução perfusora experimental (glicose 16,7 mM ou glicose 5,6 mM + carbamilcolina 100 µM). Esses recipientes foram ligados, por intermédio de cateteres de polietileno à uma torneira de duas vias. As soluções foram mantidas a 37°C e continuamente equilibradas com carbogênio para a manutenção do pH 7,4. O fluxo do sistema foi de 1ml / min impulsionado por uma bomba peristáltica (Holter Pump S. 900, Extracorporal Med. Speo. Inc., King Prussia, Pa).

A perfusão foi iniciada imediatamente após a transferência das ilhotas para as câmaras e a conexão das mesmas ao sistema. A solução perfusora foi proveniente do primeiro reservatório, do 1º ao 50º minuto; do segundo reservatório, do 52º ao 70º minuto e

Solução de trabalho:

Solução A - 36,8ml

Solução B - 63,2ml

Solução Tampão Fosfato:

Na ₂ HPO ₄	1,4g
KH ₂ PO ₄	0,43g
NaCl.....	7,0g
H ₂ O.....	1000ml

Solução corante :

DAB.....	40mg
Solução Tampão Fosfato.....	100mg
H ₂ O ₂	40ml

O ajuste do pH das soluções tampão foi feito com a adição de ácido clorídrico.

Para o isolamento das ilhotas, foi utilizada uma solução hidrossalina, elaborada por HANKS & WALLACE (1949), com a seguinte composição:

Solução de Hanks:

NaCl.....	24g
KCl.....	1,2g
CaCl ₂ 2H ₂ O.....	556mg
MgSO ₂ 7H ₂ O.....	600mg
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O.....	363mg
KH ₂ O PO ₄	180mg
NaHCO ₃	1,05g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O.....	87,97mg
H ₂ O destilada (qsp).....	1000ml

À essa solução foi adicionada glicose (2,8 mM) e colagenase (0,75 mg/ml).

Para a incubação, lavagem e perfusão das ilhotas foi utilizada a solução de Krebs-Ringer bicarbonato. Na solução de incubação e lavagem das ilhotas foram acrescentadas glicose (2,8 mM) e albumina bovina fração v, 2% (m/v). À solução usada para incubação foi acrescentado $^{86}\text{Rb}^+$ e à solução perfusora, na condição experimental, foi adicionada glicose (5,6 mM ou 16,7mM) e/ou carbamilcolina 100 μM .

Solução de Krebs-Ringer bicarbonato:

NaCl.....	26,8860g
NaHCO ₃	8,0650g
KCl.....	1,4912g
MgCl ₂ . 6H ₂ O.....	0,8134g
CaCl ₂ 2H ₂ O.....	0,5810g
H ₂ O destilada (qsp).....	1000ml

3.9. Protocolos realizados com ⁸⁶Rb⁺:

Resposta à glicose :

1. Condição inicial - solução sem glicose .
2. Condição experimental - solução de glicose 16,7 mM
3. Retorno - solução sem glicose.

Resposta à carbamilcolina :

1. Condição inicial - solução de glicose 5,6 mM.
2. Condição experimental - solução de glicose 5,6 mM + carbamilcolina 100 μM.
3. Retorno - solução glicose 5,6 mM.

3.10. Determinação do Glicogênio

As dosagens de glicogênio foram realizadas por volta de 8 horas da manhã, final do período absorptivo (JUNGERMANN & KATZ, 1989; CURI, 1990). Os ratos foram mortos por concussão cerebral e em seguida as amostras de 500 mg do fígado foram coletadas. Cada amostra foi homogenizada e digerida em solução de KOH 30% a quente. O glicogênio foi precipitado a partir do material digerido através de duas passagens em álcool absoluto. Entre uma fase e outra de precipitação, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 15 min. A quantidade de glicogênio na amostra foi determinada pelo reativo fenol sulfúrico pelo método proposto por LO SIU & TAYLOR (1970). As amostras, juntamente com os tubos branco e padrões, foram lidas em espectrofotômetro (Spektromom 195 D, Alemanha) em 490 nm. O cálculo para encontrar o valor da concentração foi :

$$[\text{mg} / 100 \text{mg}] = \frac{\text{diluição}}{\text{massa}} \times \frac{1}{\text{vol.}} \times 0,1 \times \alpha \times \lambda \text{ da amostra}$$

onde:

0,1 - fator de correção;

vol. - 0,05 ml

$$\alpha = \frac{\sum p}{\sum \lambda}$$

p = padrões

λ = absorbância

3.11. Teste de tolerância à insulina

Os ratos foram anestesiados com 0,7 ml de Ketamine (i.p.) (Ketalar- Parke Davis) em seguida foi feita uma incisão no membro posterior para a localização da veia femural. Com uma seringa foi retirada uma amostra de sangue e em seguida foi aplicado 0,25ml de insulina (100 μ U) intraperitoneal. Após a administração da insulina, as amostras foram coletadas a cada 5 minutos (T5, T10, T15, T20, T25 e T30) e centrifugadas por 5 min a 40 rpm. Após a centrifugação, o plasma foi transferido para outro tubo com auxílio de uma pipeta Pasteur e a glicose medida conforme o método da Glicose Oxidase. Os tubos (padrão, branco e amostras) foram colocados em banho maria a 37° C durante 10 minutos. Em seguida, foi feita a leitura da absorbância em 505nm em espectrofotômetro (Espektromom 195 D, Alemanha). O cálculo

utilizado para a determinação da concentração de glicose foi o seguinte :

$$f = \frac{100}{\lambda \text{ do padrão}}$$

ONDE : f = FATOR

λ = ABSORBÂNCIA

$$[\text{Glicose}] = f \times \lambda$$

3.12. Cálculos e Tratamento Estatístico

Para analisar a magnitude da variação do efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$, foram calculados valores teóricos a partir dos valores obtidos. A partir dos valores do intervalo 32-50 minutos foi realizada uma extrapolação da curva de regressão exponencial a fim de calcular os valores esperados para o intervalo 52-70 minutos. Para o

intervalo 72-90 minutos os valores de efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ foram calculados a partir dos valores do intervalo 52-70 minutos. A significância entre os valores obtidos e esperados foi avaliada através do teste t de Student, admitindo como significativos valores de p menores que 5%.

Os valores de 50% de remoção da glicose no teste de tolerância à insulina, foram encontrados a partir da equação da reta de regressão linear (VIEIRA, 1991).

Para verificar as diferenças entre os valores dos três grupos (controle, vagotomia hepática e vagotomia pancreática) assim como a diferença entre as médias dos mesmos, foi calculada a análise de variância seguida pelo teste de Tukey. Foram admitidos como significativos valores de p menores que 5% (VIEIRA, 1991).

A diferença entre 2 grupos e a variação em função do tempo no mesmo grupo, foram comparadas através do teste t de Student (VIEIRA, 1991).

3.13. Reagentes, radioisótopos e anticorpos

Todos os sais, bem como a D-glicose e demais substâncias adicionadas ao meio de isolamento e/ou incubação foram de grau

analítico de pureza (P.A.). Os radioisótopos e reagentes e suas respectivas fontes são as seguintes :

- Colagenase P : Boehringer Mannheim GmbH, W. Germany.
- $^{86}\text{RbCl}$, frascos de polietileno: New England Nuclear Research Products, Boston, Ma, USA.
- Multi - Link, Swine immunoglobullins to goat,mouse, rabbit immunoglobulin : Dakopatts a/s, Denmark.
- StreptABComplex : Dako, Carpinteria, CA, USA.
- Albumina bovina fração V; Carbamilcolina; 3-aminopropil-trietoxi-silano ; 3,3 tetra-hidrocloroeto diamino-benzidina; Monoclonal Anti-Neurofilament 200 - Sigma Company, St. Louis, Mo, USA.

4. RESULTADOS

4.1. Verificação morfológica da eficácia da vagotomia:

O exame sob microscópio cirúrgico da região subdiafragmática do esôfago, onde se realizou a vagotomia, revelou a presença de tecido cicatricial na região em todos os ratos. Este exame foi realizado imediatamente antes de cada experimento e da retirada do espécime para o processamento histológico.

A técnica de imunohistoquímica empregada foi eficaz na marcação dos neurofilamentos nos troncos vagais e de suas ramificações presentes na região esofágica. Em todos os ratos normais a imunomarcação foi positiva em ambos os troncos vagais (figuras 2 e 3).

Nos ratos submetidos à vagotomia bilateral, a imunomarcação foi negativa no tecido nervoso remanescente no coto caudal em todos os animais após o tempo de sobrevivência considerado.

Nos animais submetidos apenas à vagotomia anterior, a imunomarcação foi sempre negativa no coto distal desse nervo e, positiva no tronco posterior. Em alguns cortes histológicos obtidos imediatamente acima da região onde foi feita a vagotomia, pode-se observar a ocorrência de imunomarcação de neurofilamentos

entremeados de maneira desorganizada com tecido fibroso circundante, sugerindo a formação de um neuroma de amputação (figuras 4, 5 e 6). Entretanto, nos cortes obtidos de regiões mais distais (coto caudal), a imunoreatividade foi sempre negativa (figura 7). Nesses cortes pode-se observar o aumento de celularidade causado, provavelmente, pela multiplicação das células de Schwann e dos fibroblastos.

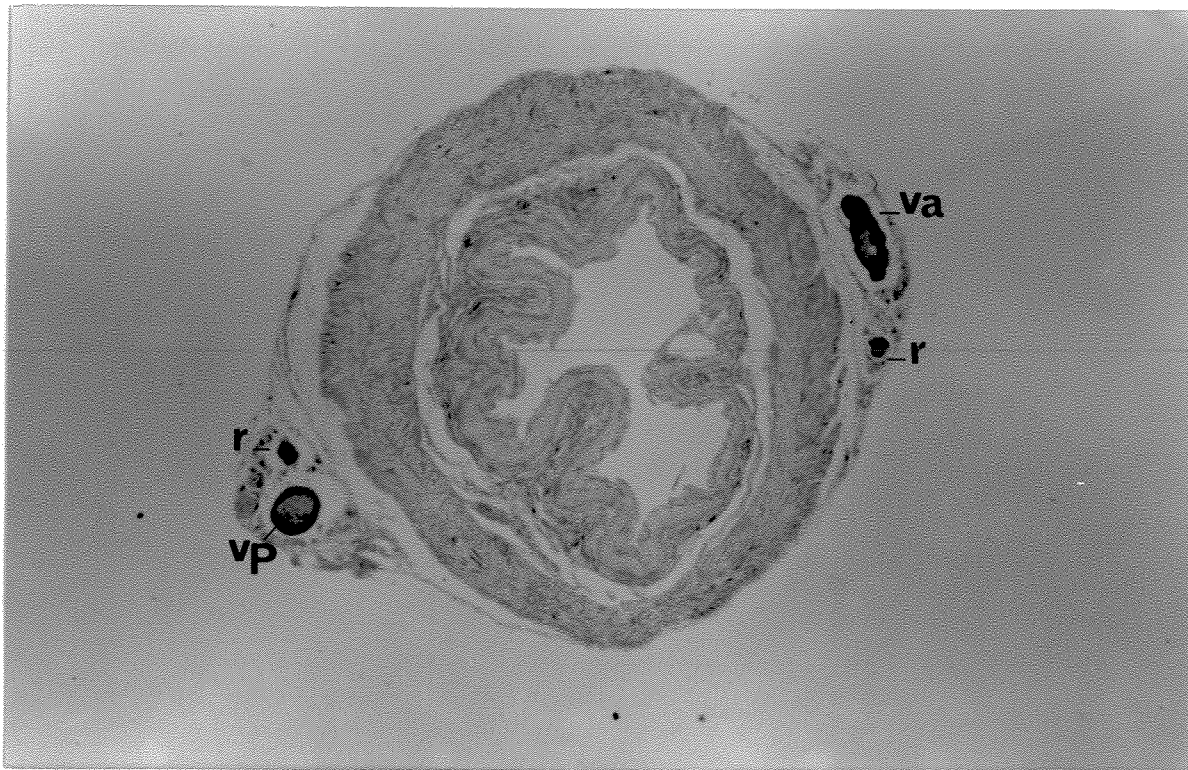


Figura 2: Corte transversal do esôfago de rato normal (controle) correspondente à região subdiafragmática onde foi feita a vagotomia nos ratos experimentais. Observe a presença de imunoreatividade positiva para neurofilamentos nos troncos vagais anterior (va), posterior (vp) e respectivos ramos (r). ABC peroxidase; contracoloração com hematoxilina de Meyer (Aumento 40X).

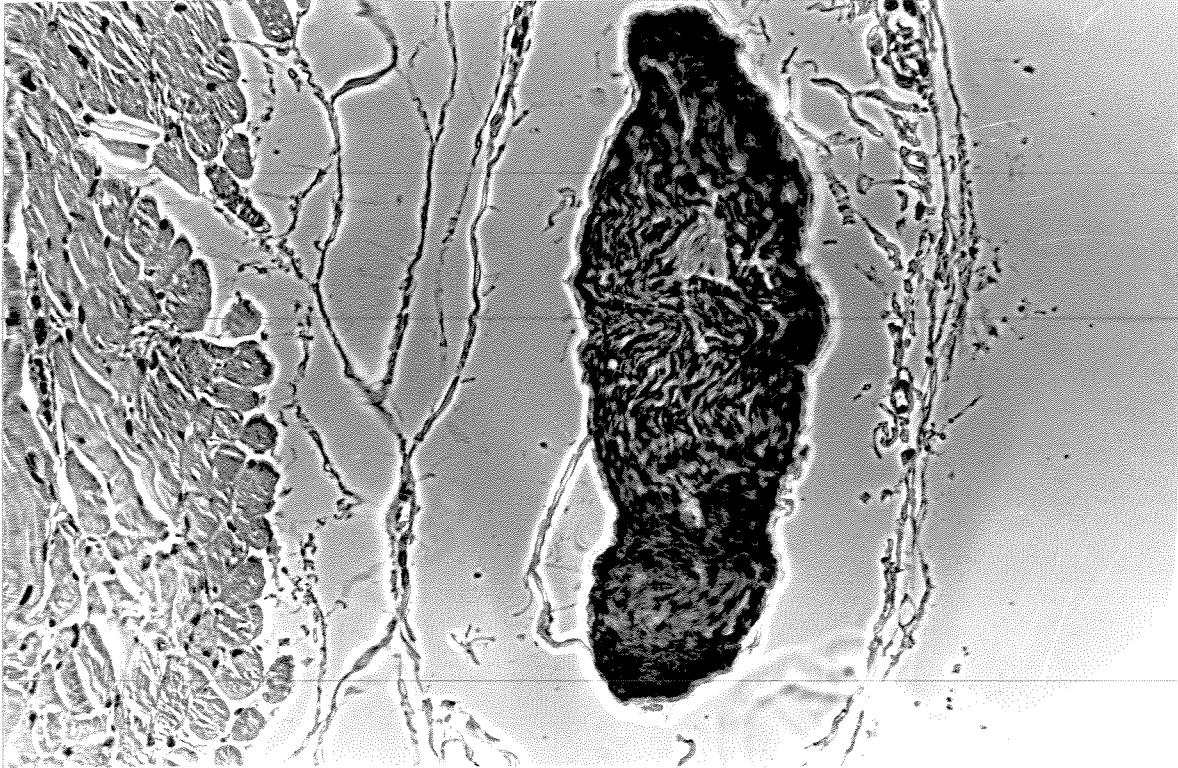


Figura 3: Detalhe do corte apresentado na figura 2, observado em microscopia de contraste de fase, mostrando a intensa imunoreatividade para neurofilamentos presente no tronco vagal anterior. (Aumento 292 X).

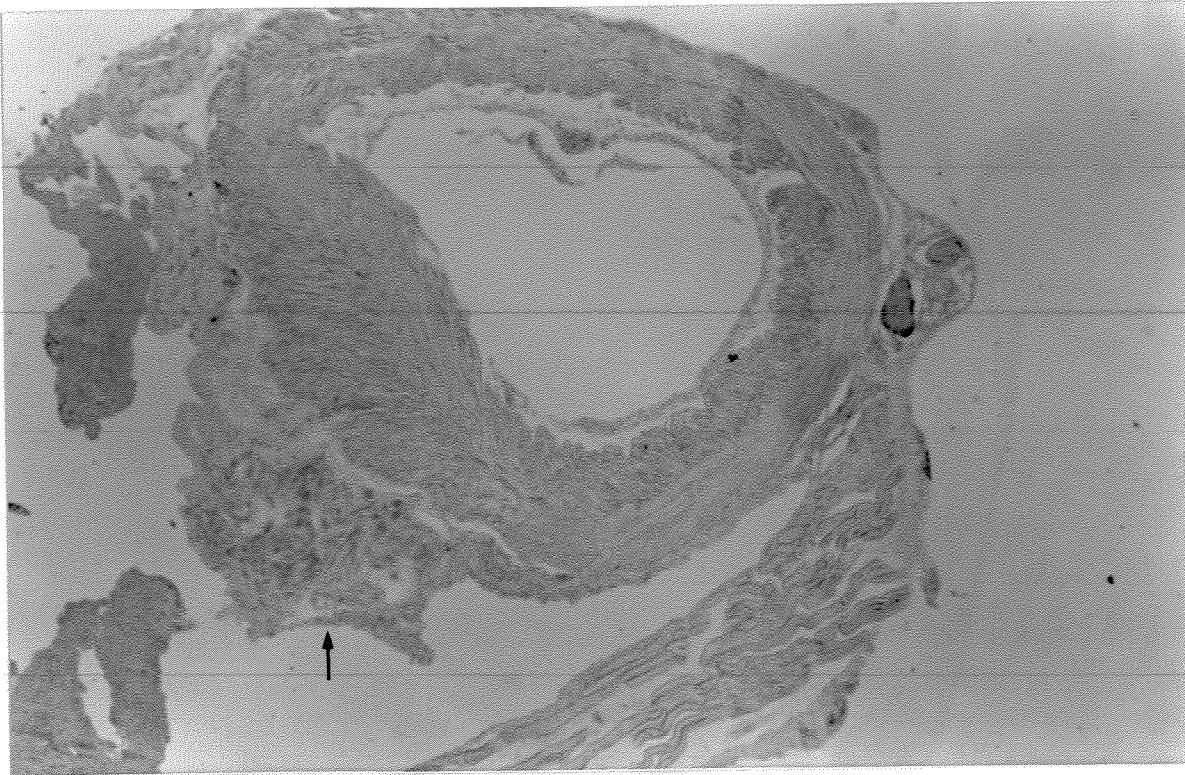


Figura 4: Corte transversal de esôfago de rato, 60 dias após vagotomia anterior. O corte corresponde à região proximal do local onde foi feita a vagotomia. No local correspondente ao coto cranial pode-se observar a presença de imunomarcção de alguns neurofilamentos entremeados, de maneira desorganizada, com tecido fibroso circundante, sugerindo a formação de um neuroma de amputação (seta). Em contraste, no tronco vagal posterior (vp) a imunomarcção de neurofilamentos é intensa e evidencia a organização morfológica normal do nervo. ABC peroxidase; contracoloração com hematoxilina de Meyer. (Aumento 40 X).

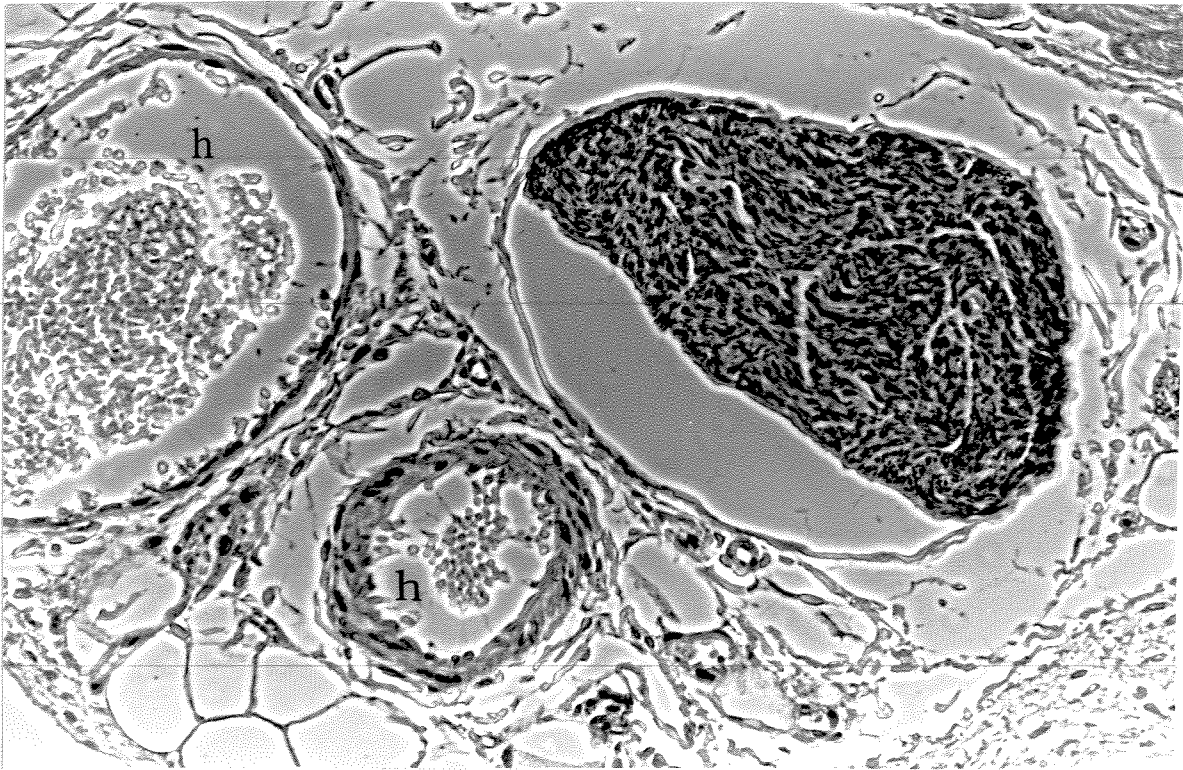


Figura 5: Detalhe do corte apresentado na figura 4, observado em microscopia de contraste de fase, mostrando a região correspondente ao tronco vagal posterior. Observe a intensa imunoreatividade presente no nervo e a ausência de reação para peroxidase endógena nas hemáceas (h), presentes nos vasos sanguíneos. Aumento 292 X

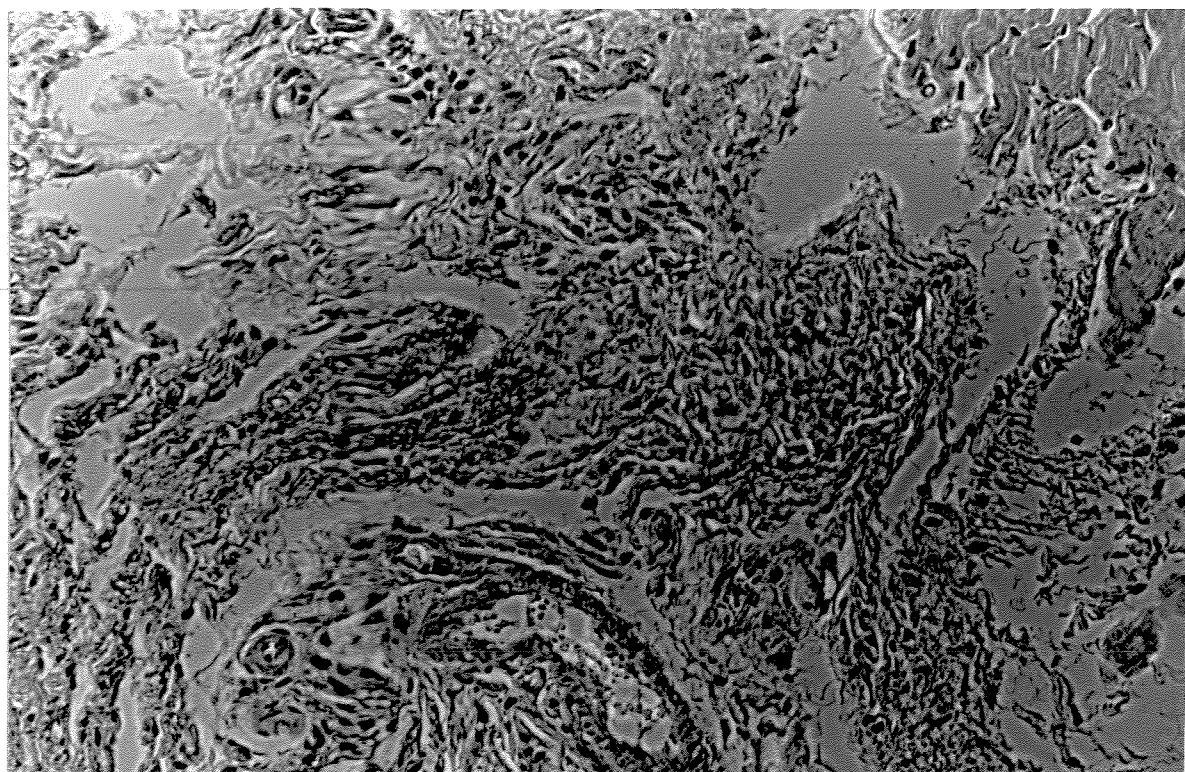


Figura 6: Detalhe do corte apresentado na figura 4, observado em microscopia de contraste de fase, mostrando a região correspondente ao coto cranial do tronco vagal anterior. Observe a imunomarcção de apenas alguns neurofilamentos entremeados de maneira desorganizada com tecido fibroso circundante sugerindo a formação de um neuroma de amputação. (Aumento 320 X).

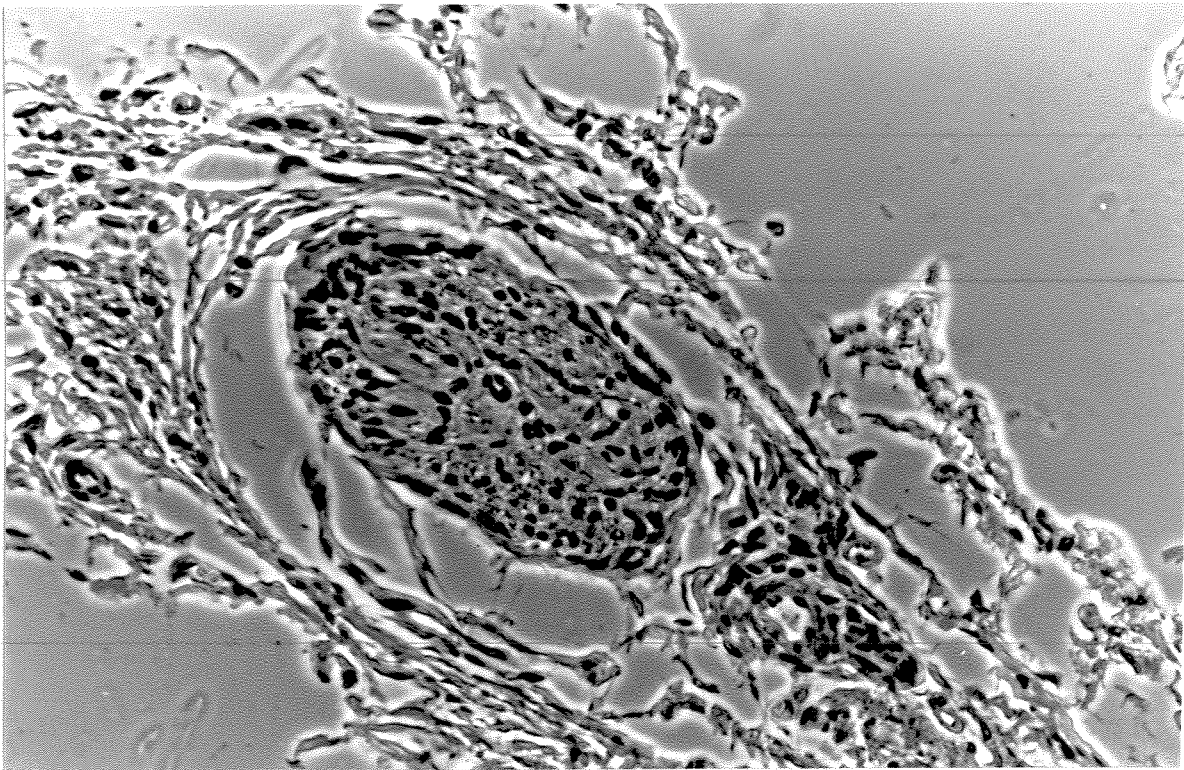


Figura 7: Corte transversal do coto caudal do tronco do vago anterior de rato, 60 dias após a vagotomia, observado ao microscópio de contraste de fase. A imunoreatividade para neurofilamentos é negativa e, pode-se observar uma grande quantidade de células de Schwann, que se multiplicaram no decorrer do fenômeno de degeneração Walleriana, e fibroblastos. ABC peroxidase; contracoloração com hematoxilina de Meyer. (Aumento 475 X)

4.2. Dosagem de Ácido Ascórbico

A concentração de ácido ascórbico verificada nas glândulas adrenais (figura 8) de ratos vagotomizados após 15 dias de cirurgia foi próxima aos valores normais (2,3 a 3 mg/100mg) e, mostrou-se semelhante à concentração encontrada no grupo controle. No grupo de ratos submetidos à estresse físico por 50 minutos de natação foi verificada redução drástica na concentração de ácido ascórbico.

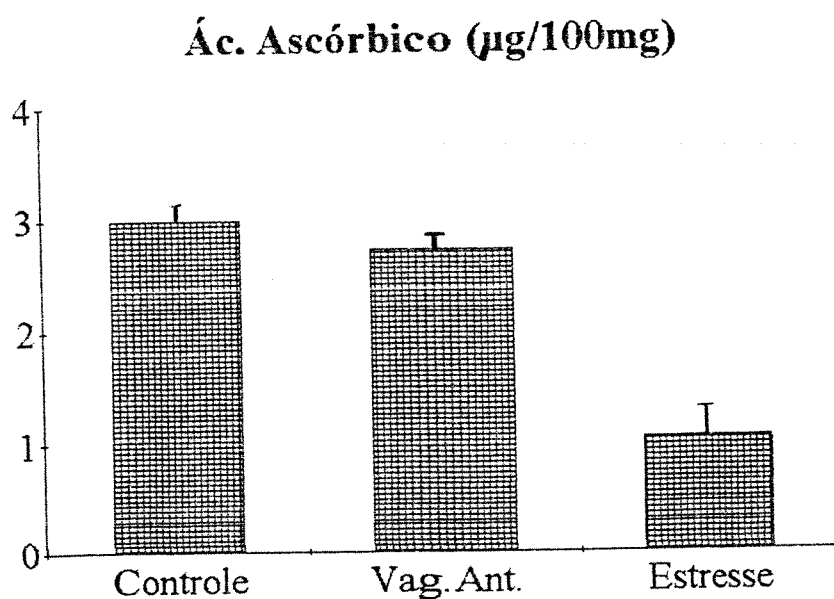


Figura 8 : Concentração de ácido ascórbico da glândula adrenal de ratos controle, ratos submetidos ao estresse por natação e de ratos vagotomizados. Os dados representam a média \pm EPM de 6 ratos.

4.3. Efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$

4.3.1. Resposta à glicose 16,7 mM :

A.) Vagotomia do ramo pancreático:

A resposta à concentração estimulatória (16,7 mM) de glicose foi verificada em ilhotas isoladas de ratos submetidos à vagotomia do ramo pancreático (15, 30 dias de pós-operatório) e foi comparada com a resposta de ratos controle (figura 9).

Após 20 minutos iniciais de perfusão com solução de Krebs-Ringer sem glicose a razão de efluxo diminuiu constantemente nos três grupos de ratos (controle, vagotomia do ramo pancreático, 15 e 30 dias). O efluxo médio neste período foi de $3,99\% \text{ min}^{-1}$ em ratos controle, $3,58\%$ no grupo de ratos vagotomizados (15 dias) e de $3,86\%$ no grupo de 30 dias. Após a mudança para a solução perfusora contendo 16,7 mM de glicose, a razão do efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ declinou significativamente (tabela I) nos ratos controle, sendo o efluxo médio desse período $1,95\% \text{ min}^{-1}$ (declínio de 51,13% em relação ao período anterior). Nos grupos de ratos vagotomizados também ocorreu um declínio mas, de forma menos acentuada sendo os valores médios do período, $2,51\% \text{ min}^{-1}$ e $2,43\% \text{ min}^{-1}$ nos ratos vagotomizados com 15 e 30 dias

respectivamente. A porcentagem de variação em relação ao período anterior foi 29,88% nos vagotomizados (15 dias) e 37,04% nos vagotomizados (30 dias). O retorno à solução perfusora sem glicose provocou aumento na razão do efluxo dos três grupos. O efluxo médio neste período foi de 2,87% min⁻¹ nos ratos controle, 2,47% min⁻¹ nos vagotomizados (15 dias) e, 2,96% min⁻¹ nos de 30 dias.

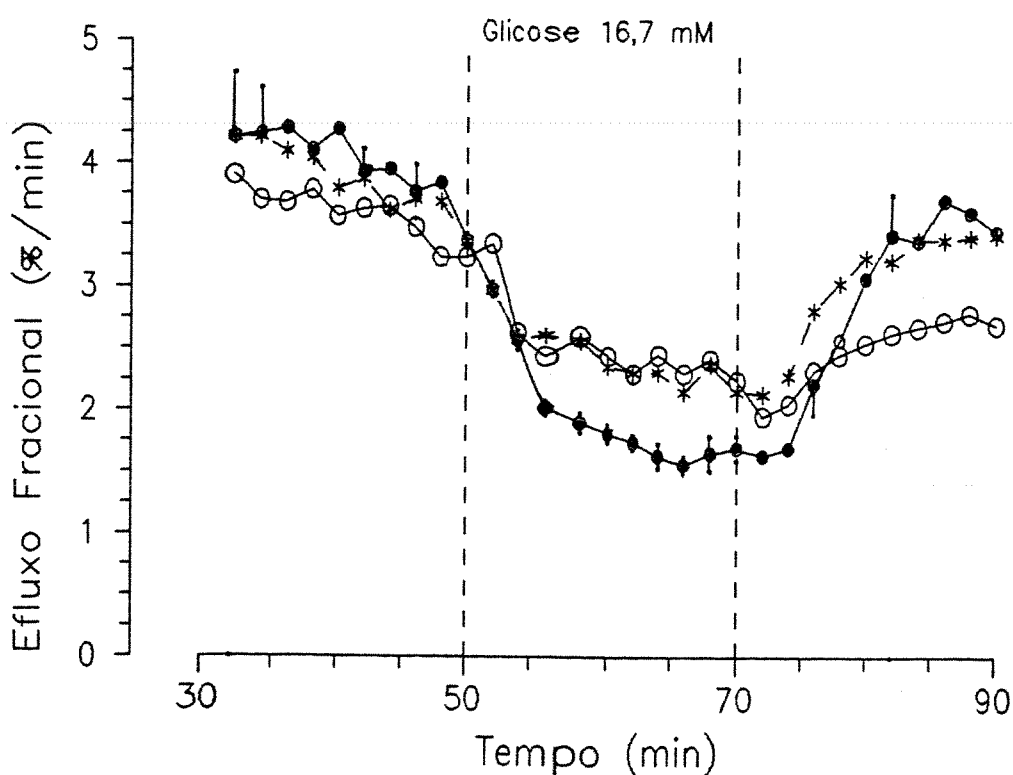


Figura 9: Efeito da adição de glicose sobre a dinâmica do efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle (-●-●-●-) e de ratos submetidos à vagotomia pancreática com 15 (-○-○-○) e 30 (-*-*-*) dias de pós-operatório. As ilhotas foram perfundidas por solução de Krebs-bicarbonato sem glicose até o 50º minuto. As linhas verticais interrompidas indicam o momento de introdução e retirada da glicose 16,7 mM. Cada ponto representa a média de experimentos realizados em 2 ou 3 câmaras, cada qual contendo 100 a 150 ilhotas. As barras representam o EPM.

TABELA I - Efeito da adição de glicose 16,7 mM sobre a perfusão do $^{86}\text{Rb}^+$ em ilhotas de ratos controle

Tempo	esperado	observado	t	p
52	3,54	2,98	9,84	< 0,05
54	3,47	2,57	12,04	< 0,05
56	3,40	2,02	23,91	< 0,05
58	3,32	1,90	17,68	< 0,05
60	3,25	1,81	20,91	< 0,05
62	3,19	1,74	25,12	< 0,05
64	3,12	1,63	15,21	< 0,05
66	3,05	1,56	21,62	< 0,05
68	2,99	1,65	9,69	< 0,05
70	2,93	1,69	12,64	< 0,05
72	1,37	1,63	1,66	< 0,05
74	1,29	1,69	2,47	< 0,05
76	1,21	2,21	4,0	< 0,05
78	1,14	2,57	3,80	< 0,05
80	1,07	3,07	6,90	< 0,05
82	1,01	3,42	7,31	< 0,05
84	0,95	3,37	6,34	< 0,05
86	0,89	3,70	5,27	< 0,05
88	0,84	3,60	6,45	< 0,05
90	0,79	3,45	4,33	< 0,05

B.) Vagotomia hepática:

Em ratos submetidos à vagotomia do ramo hepático (60 dias de pós-operatório), foi verificado que a resposta à glicose foi semelhante à do grupo controle, embora a magnitude dessa resposta tenha sido diferente (figura 10). Em ambos os grupos a razão de efluxo declinou constantemente nos 20 minutos de perfusão com solução sem glicose. O efluxo médio neste período foi de $3,99\% \text{ min}^{-1}$ em ratos controle e $3,03\% \text{ min}^{-1}$ nos ratos submetidos à vagotomia hepática crônica. Após a mudança para a solução perfusora contendo $16,7 \text{ mM}$ de glicose, a razão do efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ declinou significativamente (tabelas I e II), exceto nos minutos finais do período (tabela II). A redução do efluxo em relação à condição inicial foi de $51,12\%$ em ratos controle e de $40,26\%$ em ratos vagotomizados sendo o efluxo médio desse período foi $1,95\% \text{ min}^{-1}$ e $1,81\% \text{ min}^{-1}$ respectivamente. O retorno à solução perfusora sem glicose provocou um aumento lento na razão do efluxo dos dois grupos. O efluxo médio neste período foi de $2,87\% \text{ min}^{-1}$ nos ratos controle e de $2,37\% \text{ min}^{-1}$ nos ratos vagotomizados. As tabelas I e II representam os valores observados, bem como, os valores esperados de efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$, a partir da introdução à condição experimental e do retorno à condição inicial.

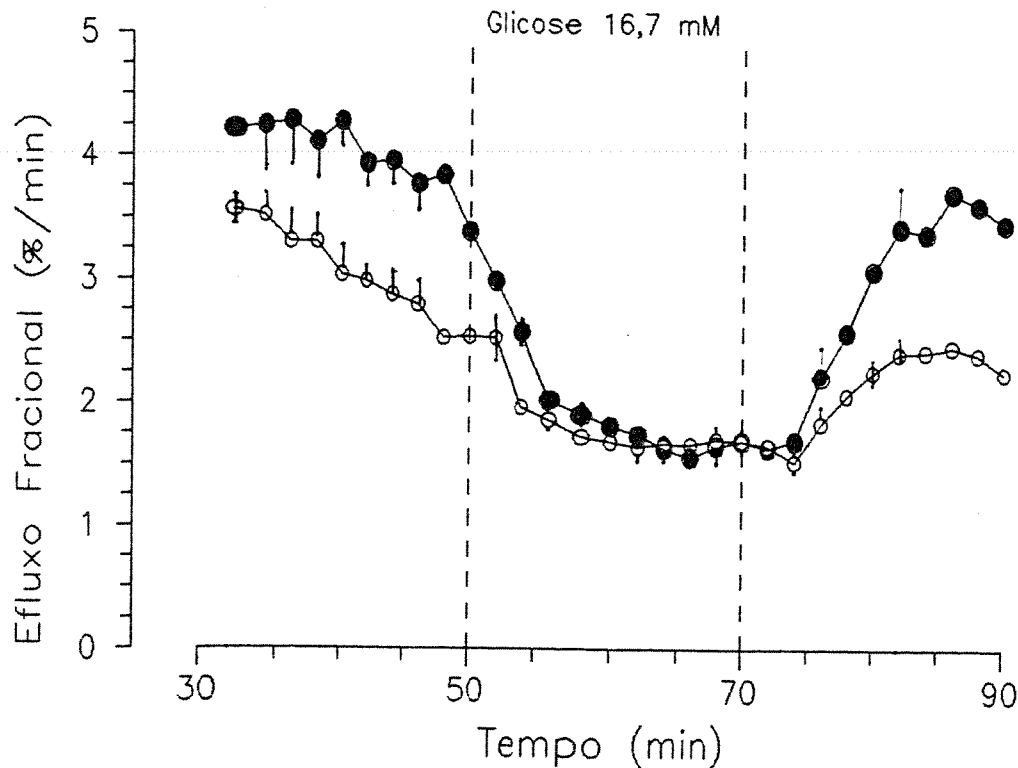


Figura 10: Efeito da adição de glicose sobre a dinâmica do efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle (-●-●-) e de ratos submetidos à vagotomia hepática crônica, com período pós-operatório de 60 dias (-o-o-). As ilhotas foram perfundidas por solução de Krebs-bicarbonato sem glicose até o 50^o minuto. As linhas verticais interrompidas indicam o momento de introdução e retirada da glicose 16,7 mM. Cada ponto representa a média de experimentos realizados em 3 ou 4 câmaras, cada qual contendo 100 a 150 ilhotas. As barras representam o EPM.

TABELA II - Efeito da adição de glicose 16,7 mM sobre a perfusão do $^{86}\text{Rb}^+$ em ilhotas de ratos submetidos à vagotomia hepática.

Tempo	esperado	observado	t	p
52	2,41	1,96	10,14	<0,05
54	2,32	1,86	5,76	<0,05
56	2,22	1,72	2,24	<0,05
58	2,14	1,68	4,18	<0,05
60	2,05	1,64	3,61	<0,05
62	1,97	1,67	3,38	<0,05
64	1,89	1,66	3,15	<0,05
66	1,82	1,70	1,10	<0,05
68	1,74	1,69	0,49	N.S.
70	1,67	1,65	0,27	N.S.
72	1,50	1,65	1,31	<0,05
74	1,45	1,52	0,77	N.S.
76	1,41	1,83	9,28	<0,05
78	1,36	2,06	8,65	<0,05
80	1,32	2,25	8,81	<0,05
82	1,28	2,40	8,59	<0,05
84	1,24	2,41	7,29	<0,05
86	1,20	2,45	8,59	<0,05
88	1,16	2,39	4,89	<0,05
90	1,12	2,24	6,94	<0,05

N.S. - Não significativo.

4.3.2. Resposta à carbamilcolina:

A.) Vagotomia do ramo pancreático :

Na condição inicial, glicose 5,6 mM na solução de Krebs-Ringer, a média da razão do efluxo foi $2,34\% \text{ min}^{-1}$ nos ratos controle (figura 11). A mudança para a condição experimental, solução perfusora contendo carbamilcolina ($100 \mu\text{M}$) e glicose (5,6 mM), provocou uma elevação rápida até o minuto 54, mantendo um platô até o final do período (média do platô= $2,99\% \text{ min}^{-1}$). Após o retorno à condição inicial a razão de efluxo declinou rapidamente à níveis próximos da condição inicial (média de $2,13\% \text{ min}^{-1}$). Em ratos submetidos à vagotomia pancreática crônica (figura 11) o efluxo médio de $^{86}\text{Rb}^+$ nas ilhotas de Langerhans na condição inicial foi de $2,31\% \text{ min}^{-1}$. Neste período, a razão do efluxo declinou de forma lenta e constante. Após a mudança para a condição experimental, a razão de efluxo se manteve constante à uma média de $2,05\% \text{ min}^{-1}$. O retorno à condição inicial provocou ligeira mudança ($2,12\% \text{ min}^{-1}$) no valor médio do efluxo.

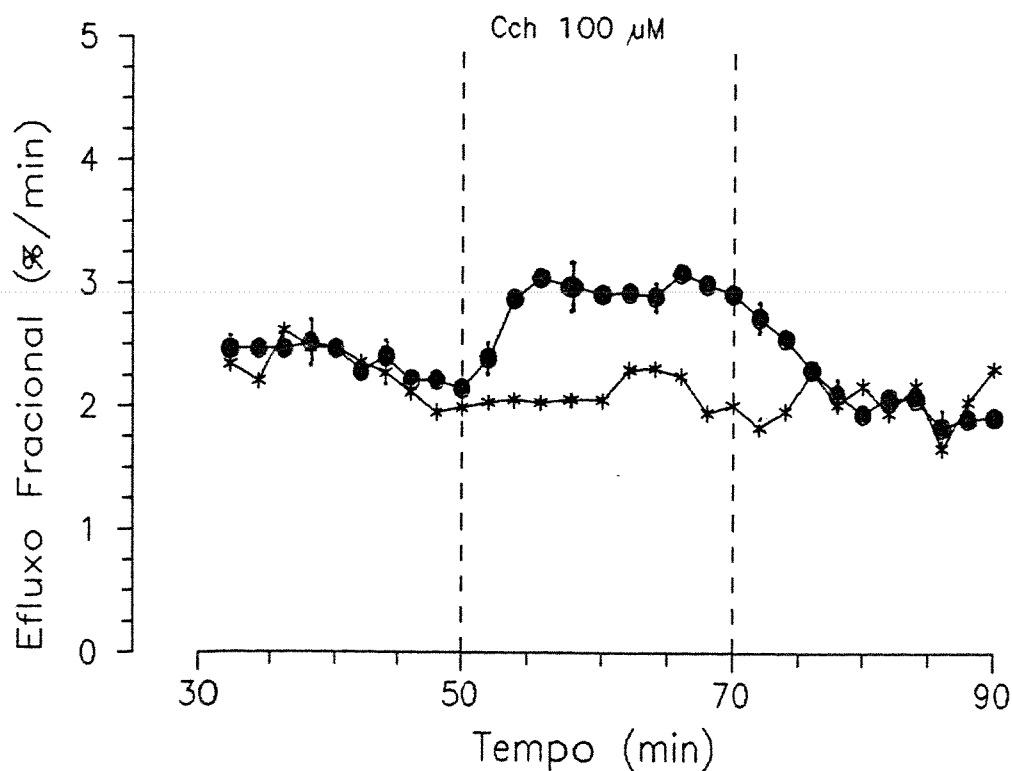


Figura 11: Efeito da carbamilcolina (100 μM) sobre a razão do efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle (-●-●-) e de ratos submetidos à vagotomia pancreática crônica (-*-*), 60 dias de período pós-operatório. As ilhotas foram perfundidas por solução de Krebs-bicarbonato contendo 5,6mM de glicose, durante toda a perfusão. As linhas interrompidas indicam o momento de introdução e de retirada da carbamilcolina. Cada ponto representa a média de experimentos realizados com 2 a 5 câmaras, cada qual contendo 100 a 150 ilhotas.

TABELA III- Efeito da carbamilcolina (100 μ M) na presença de 5,6 mM de glicose sobre a perfusão do $^{86}\text{Rb}^+$ em ilhotas de ratos controle.

Tempo	esperado	observado	t	p
52	2,12	2,39	1,94	< 0,05
54	2,09	2,87	5,99	< 0,05
56	2,05	3,04	6,87	< 0,05
58	2,01	2,97	10,62	< 0,05
60	1,98	2,91	10,34	< 0,05
62	1,95	2,92	7,47	< 0,05
64	1,91	2,89	8,70	< 0,05
66	1,88	3,08	9,22	< 0,05
68	1,85	2,99	7,07	< 0,05
70	1,81	2,91	6,25	< 0,05
72	3,09	2,72	3,22	< 0,05
74	3,13	2,55	4,07	< 0,05
76	3,17	2,30	4,75	< 0,05
78	3,21	2,10	9,20	< 0,05
80	3,25	1,94	14,66	< 0,05
82	3,29	2,07	8,54	< 0,05
84	3,33	2,06	17,80	< 0,05
86	3,37	1,83	24,68	< 0,05
88	3,41	1,90	17,85	< 0,05
90	3,46	1,91	11,95	< 0,05

B.) Vagotomia do ramo hepático

A figura 12, mostra semelhança no padrão de resposta de efluxo nos grupos de ratos controle e vagotomizados (60 dias) quanto à resposta à carbamilcolina. Nos ratos controle (tabela III), na condição inicial (glicose 5,6 mM na solução perfusora de Krebs-Ringer), a razão do efluxo foi em média 2,34% min⁻¹. A mudança para a condição experimental (glicose 5,6 mM + carbamilcolina 100 µM) provocou uma elevação rápida (4^o min) para o valor médio de 2,99% min⁻¹ (platô). Após o retorno à condição inicial, a razão do efluxo declinou rapidamente mantendo média de 2,13% min⁻¹. Em ratos submetidos à vagotomia hepática a razão do efluxo na condição inicial foi em média 2,31% min⁻¹. A mudança para a condição experimental promoveu elevação rápida e significativa (tabela IV) para o valor médio de 2,73% min⁻¹ (platô). Esse valor manteve-se constante até o retorno à condição inicial, quando decaiu rapidamente para um valor médio de 2,14% min⁻¹. As tabelas III e IV mostram os valores observados bem como os valores esperados a partir da mudança para condição experimental (52^o ao 70^o min) e após o retorno à condição inicial (72^o ao 90^o min). Em ambos grupos os valores observados foram estatisticamente diferentes dos valores esperados, exceto nos minutos 52 e 72 (tabela IV).

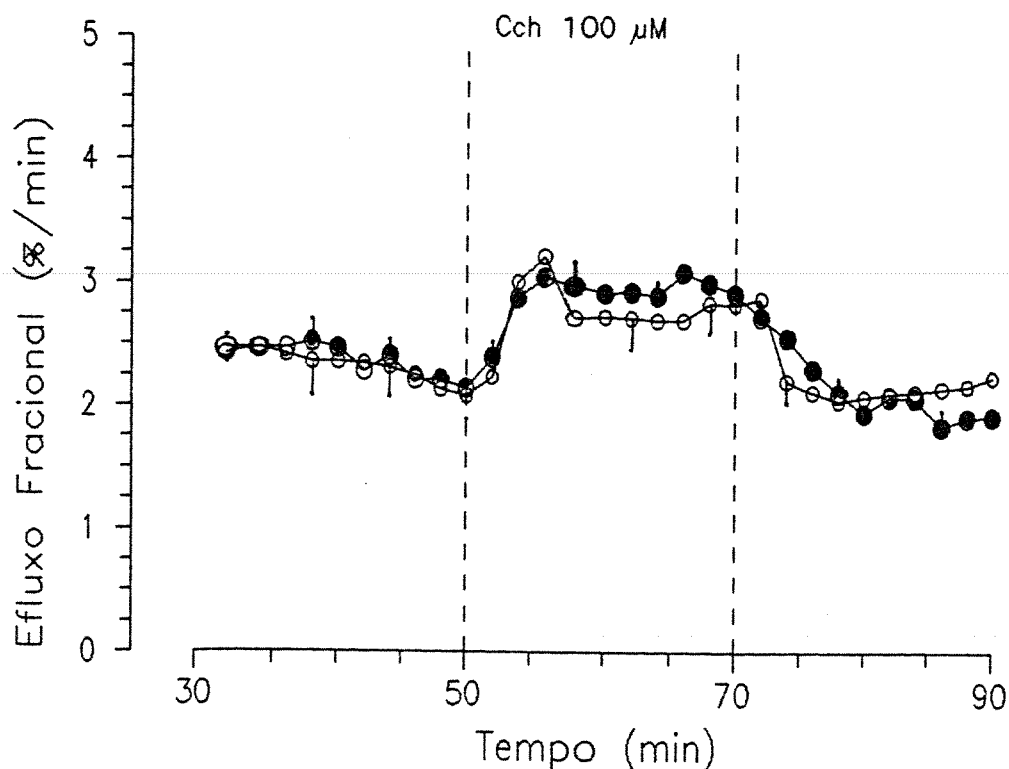


Figura 12: Efeito da carbamilcolina ($100 \mu\text{M}$) sobre a razão do efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle (-●-●-) e de ratos submetidos à vagotomia hepática crônica (-O-O-), 60 dias de período pós operatório. As ilhotas foram perfundidas por solução de Krebs-bicarbonato contendo $5,6\text{mM}$ de glicose, durante toda a perfusão. As linhas interrompidas indicam o momento de introdução e de retirada da carbamilcolina. Cada ponto representa a média de experimentos realizados com 4 ou 5 câmaras, cada qual contendo 100 a 150 ilhotas. As barras representam o EPM.

TABELA I V- Efeito da carbamilcolina (100 μM) na presença de 5,6 mM de glicose sobre a perfusão do $^{86}\text{Rb}^+$ em ilhotas de ratos submetidos à vagotomia hepática.

Tempo	esperado	observado	t	p
52	2,10	2,23	0,98	N.S.
54	2,06	3,0	7,17	< 0,05
56	2,03	3,21	6,19	< 0,05
58	1,99	2,71	2,49	< 0,05
60	1,96	2,72	3,02	< 0,05
62	1,93	2,71	3,17	< 0,05
64	1,89	2,69	4,94	< 0,05
66	1,86	2,69	5,14	< 0,05
68	1,83	2,83	4,14	< 0,05
70	1,80	2,82	3,07	< 0,05
72	2,82	2,87	0,10	N.S.
74	2,83	2,20	3,75	< 0,05
76	2,85	2,11	4,00	< 0,05
78	2,86	2,04	5,32	< 0,05
80	2,87	2,07	5,77	< 0,05
82	2,89	2,01	3,68	< 0,05
84	2,90	2,11	3,32	< 0,05
86	2,92	2,14	2,74	< 0,05
88	2,93	2,16	4,84	< 0,05
90	2,94	2,23	2,76	< 0,05

N.S. - Não significativo.

4.4. Determinação de glicogênio

A concentração de glicogênio hepático (figura 13) foi modificada após a vagotomia. Na fase aguda (15 dias de pós-operatório), foi observada uma redução de 41,79% no grupo de ratos submetidos à vagotomia hepática e de 25,58% no grupo submetido à vagotomia pancreática em relação ao grupo controle (tabela V). Essas alterações foram significativas (tabelas VI e VII).

De modo semelhante, após 60 dias de cirurgia, a concentração de glicogênio hepático (figura 13) nos ratos submetidos à vagotomia hepática exibiu uma diminuição de 52,6%, significativa em relação ao controle (tabelas VIII e IX). Essa alteração, não foi significativa quando comparada aos ratos hepato-vagotomizados após 15 dias de cirurgia ($p < 0,05$).

Todavia ratos submetidos à vagotomia pancreática exibiram, após 60 dias, uma elevação de 31,8% na reserva de glicogênio hepático, significativa em relação às concentrações verificadas no grupo controle e hepato-vagotomizado (tabelas VIII e IX) e nos ratos submetidos à vagotomia pancreática com 15 dias de pós-operatório ($p < 0,05$).

Tabela V - Concentração de glicogênio hepático (mg / 100g) de ratos controle e ratos vagotomizados com 15 e 60 dias de pós-operatório.

Ratos	15 dias	60 dias
Controle (n=6)	4,81 ± 0,15	4,81 ± 0,15
Vagotomia Hepática (n=4)	2,80 ± 0,19	(n=8) 2,28 ± 0,21
Vagotomia Pancreática (n=5)	3,58 ± 0,26	(n=6) 6,34 ± 0,70

Os valores acima são a média ± EPM dos grupos de ratos controle e de ratos vagotomizados.

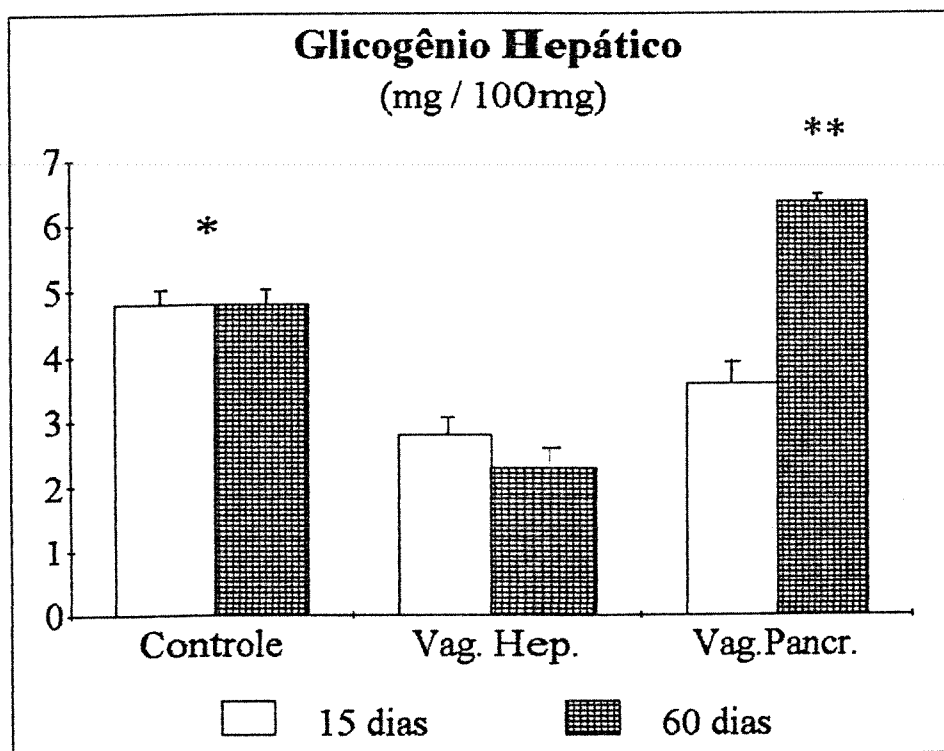


Figura 13 : Concentração de glicogênio hepático (mg/100g) em ratos controle, ratos vagotomizados (15 e 60 de pós-operatório). As colunas representam a média \pm EPM de valores de 6 à 8 ratos.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos Vag. Pancr. (15 e 60 dias) e Vag. Hep. (15 e 60 dias); ** $p < 0,05$ em relação ao grupo Vag.Hep. (15 dias).

TABELA VI - Determinação do glicogênio - Análise de variância dos resultados obtidos de ratos controle, ratos submetidos à vagotomia hepática e pancreática, 15 após a cirurgia.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	3	10,31	5,15	25,75
Resíduos	12	2,44	0,2	
Total	14	12,75		

O valor de F é significativo ao nível de 5%.

TABELA VII- Teste de Tukey entre as médias dos valores obtidos a partir de ratos vagotomizados (15 dias) e de ratos controle.

Pares	Valor Absoluto	Diferença	DMS
Cont. / Pancr.	/ 4,81 - 3,57 /	1,24	0,58
Cont. / Hep.	/ 4,81 - 2,8 /	2,01	0,62
Pancr. / Hep	/ 2,8 - 3,57 /	0,77	0,65

A diferença entre as médias é significativa ao nível de 5%.

TABELA VIII - Determinação do glicogênio - Análise de variância dos resustados obtidos de ratos controle, ratos submetidos à vagotomia hepática e pancreática 60 após a cirurgia.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	59,27	29,63	27,95
Resíduos	17	18,02	1,06	
Total	19	77,20		

O valor de F é significativo ao nível de 5%.

TABELA IX- Teste de Tukey entre as médias dos valores obtidos a partir de ratos vagotomizados (60 dias) e de ratos controle.

Pares	Valor Absoluto	Diferença	DMS
Cont. / Pancr.	/ 4,81 - 6,34 /	1,53	1,24
Cont. / Hep.	/ 4,81 - 2,28 /	2,53	1,16
Pancr. / Hep.	/ 2,28 - 6,34 /	4,06	1,16

A diferença entre as médias é significativa ao nível de 5%.

4.5. Teste de Tolerância à Insulina

A Tabela X mostra a variação na concentração de glicose plasmática em função do tempo após a administração de insulina intraperitoneal em ratos intactos e denervados em estado pós-prandial. Os dados encontrados apresentaram correlação negativa ($r = -0,94$ no grupo controle; $r = -0,96$ e $-0,99$ nos vagotomizados do ramo hepático e pancreático, respectivamente). No estado inicial ($T = 0$) a concentração de glicose foi significativamente diferente (tabelas XI e XII) nos três grupos ($p < 0,05$), sendo os ratos vagotomizados, hiperglicêmicos (figura 14). Nos 15 minutos iniciais a diminuição da glicemia foi de 44,9% nos ratos controle; 61,15% nos ratos submetidos à vagotomia pancreática e, 64,19% naqueles submetidos à vagotomia hepática. A concentração de glicose no 15º minuto, não foi significativamente diferente (tabelas XIII e XIV) nos três grupos ($p < 0,05$). A equação obtida da reta de regressão linear possibilitou encontrar o tempo correspondente à 50% de remoção da glicemia. No grupo controle o valor máximo de remoção de glicose (45,58 mg/ 100ml) não atingiu 50% e foi encontrado no tempo 15. Nos ratos vagotomizados, 50% da remoção de glicose ocorreu no 10º (vagotomia hepática) e 11º minuto (vagotomia pancreática).

A partir do 15^o minuto, pode-se verificar que o aumento na concentração de glicose também foi semelhante nos 3 grupos. Ao término do teste, a glicemia dos ratos controle já havia se restabelecido aos valores iniciais, ao passo que, nos ratos vagotomizados, não. Neste período a diferença entre as médias dos grupos não foi diferente (tabelas XV e XVI).

TABELA X - Concentração de glicose plasmática (mg / 100 ml) em função do tempo (minutos).

Ratos	Controle	Vagotomia Hep.	Vagotomia Pancr.
Tempo			
T0	91,17± 5,19	114,31±3,11 *	138,23±7,81 *
T5	64,8± 9,81	75,89±4,09	109,84±7,85
T10	55,4 ± 8,95	50,83±3,73	73,11±2,07
T15	50,24± 6,38	40,93±4,12 N.S.	53,70±4,15 N.S.
T20	52,81±4,4	49,18±3,67	67,42±5,33
T25	58,67± 2,3	57,03±7,16	78,97±3,89
T30	78,68± 12,33	66,18±8,07 N.S	94,73±7,41 N.S

Os valores acima são a média ± EPM dos grupos de ratos controle (n=5), ratos submetidos à vagotomia do ramo hepático (n=5) e ratos submetidos à vagotomia do ramo pancreático (n=5). N.S- não significativo; *-significativo (p<0,05).

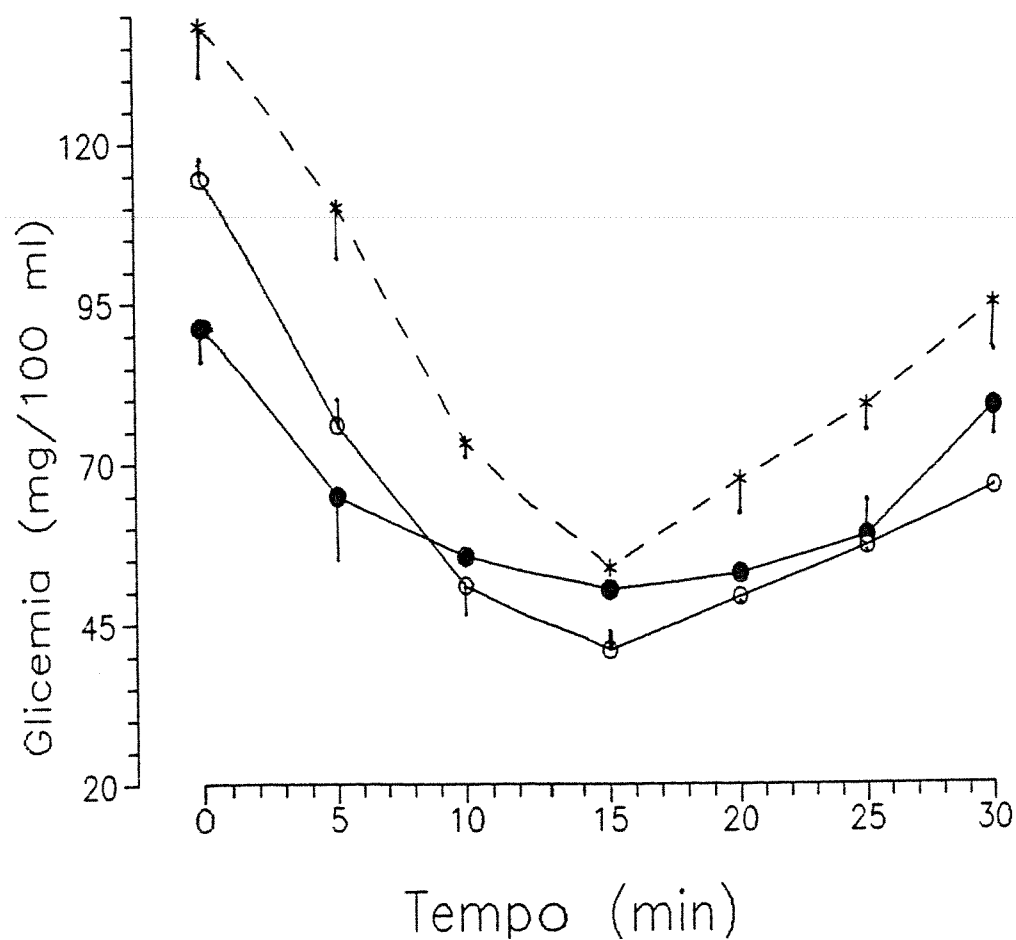


Figura 14 : Concentração plasmática de glicose após administração intraperitoneal de insulina ($100\mu\text{U}$) em ratos controle (●-●-), ratos submetidos à vagotomia pancreática (-*-*) e à vagotomia hepática (-o-o), após 15 dias de cirurgia. Cada ponto representa a média \pm EPM de 5 ratos.

TABELA XI - Análise de Variância dos dados obtidos a partir do teste de tolerância à insulina (T=0) de ratos controle, ratos submetidos à vagotomia hepática e pancreática, 15 dias após a cirurgia.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	5307,91	2653,95	16,31
Resíduos	12	1952,89	162,74	
Total	14	7260,8		

O valor de F é significativo ao nível de 5%.

TABELA XII- Teste de Tukey entre as médias dos valores obtidos a partir do teste de tolerância à insulina (T=0) realizados em ratos vagotomizados e ratos controle.

Pares	Valor Absoluto	Diferença	DMS
Cont. / Hep.	/ 91,17- 114,31 /	23,14	21,5
Cont. / Pancr.	/ 91,17 - 138,23 /	47,06	21,5
Hep. /Pancr.	/114,31 -138,23 /	23,92	21,5

A diferença entre as médias é significativa ao nível de 5%.

TABELA XIII - Análise de Variância dos dados obtidos a partir do teste de tolerância à insulina (T=15) de ratos controle, ratos submetidos à vagotomia hepática e pancreática, 15 dias após a cirurgia.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	41490,06	20745,03	16,31
Resíduos	12	39554,45	3296,2	
Total	14	1935,61		

O valor de F é significativo ao nível de 5%.

TABELA XIV- Teste de Tukey entre as médias dos valores obtidos a partir do teste de tolerância à insulina (T=15) realizados em ratos vagotomizados e ratos controle.

Pares	Valor Absoluto	Diferença	DMS
Cont. / Hep.	/ 50,24 - 40,93/	9,31	96,79
Cont. / Pancr.	/ 50,24 - 53,7 /	3,46	96,79
Hep. / Pancr.	/ 40,93 - 53,7 /	12,77	96,19

A diferença entre as médias é significativa ao nível de 5%.

TABELA XV - Análise de Variância dos dados obtidos a partir do teste de tolerância à insulina (T=30) de ratos controle, ratos submetidos à vagotomia hepática e pancreática, 15 dias após a cirurgia.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	97721,43	48860,71	6,81
Resíduos	12	86059,17	7171,5	
Total	14	183780,6		

O valor de F é significativo ao nível de 5%.

TABELA XVI- Teste de Tukey entre as médias dos valores obtidos a partir do teste de tolerância à insulina (T=30) realizados em ratos vagotomizados e ratos controle.

Pares	Valor Absoluto	Diferença	DMS
Cont. / Hep.	/ 78,68 - 66,18 /	12,15	142,77
Cont. / Pancr.	/ 78,68 - 94,13 /	15,45	142,77
Hep. / Pancr.	/ 66,18 - 94,13 /	25,95	142,77

A diferença entre as médias é significativa ao nível de 5%.

5. DISCUSSÃO

A vagotomia subdiafragmática, prática cirúrgica amplamente utilizada no tratamento de úlceras gástricas ou duodenais desde o início do século (ALVAREZ, 1948), foi abandonada em virtude de comprometer outras funções orgânicas, tais como: redução da liberação de ácido do estômago (QUIGLEY & LOUCKES, 1951; LEGROS & GRIFFITH, 1969), diminuição da motilidade gástrica (QUIGLEY & LOUCKES, 1951; FOX *et al.*, 1976), perda da coordenação antropiloroduodenal e da abertura do piloro (QUIGLEY & LOUCKES, 1951; HOLLE *et al.*, 1990). Esta técnica foi substituída pela vagotomia seletiva das células parietais, onde somente as células produtoras de ácido presentes no corpo e fundo do estômago são denervadas (HARMON, 1981).

A vagotomia foi o modelo experimental adotado para o estudos sobre participação do sistema nervoso parassimpático na sensibilidade das ilhotas de Langerhans aos segretagogos da insulina e no padrão metabólico de ratos vagotomizados visando estabelecer um paralelo diabetes mellitus e suas manifestações decorrentes.

Existem muitos testes, utilizados para avaliar a eficácia da vagotomia (LOUIS-SYLVESTRE, 1983). Algumas das avaliações são invasivas e incluem estudos de dissecação, estimulação de secreção gástrica usando solução de vermelho neutro como

indicador (LEGROS & GRIFFITH, 1969), transporte retrógrado de traçadores neurais (NEUHUBER, 1989; BERTHOUD *et al.*, 1990), verificação da motilidade gástrica (FOX *et al.*, 1976) ou da secreção de insulina após estimulação vagal cervical (BERTHOUD *et al.*, 1983). Dentre os testes não invasivos podem ser destacados o teste da fase cefálica da secreção de insulina (WOODS & BERNSTEIN, 1980; LOUIS-SYLVESTRE *et al.*, 1981) e características comportamentais como afagia, preferência por alimento de pequeno tamanho, perda de peso, perda do padrão alimentar e da ritimicidade da captação do alimento (LOUIS-SYLVESTRE, (1978 a; b). Entretanto tais parâmetros de avaliação se referem à vagotomia bilateral ou são específicos para testar a denervação de determinados ramos; alguns muito subjetivos.

A análise morfológica da região esofágica focalizando sua inervação tem sido utilizada em vários trabalhos (POWLEY *et al.*, 1983; PRECHTL & POWLEY, 1985, 1987; NANOBASHVILI *et al.*, 1994) e permite afirmar com segurança a eficácia da cirurgia. Além da comprovação da eficácia da técnica cirúrgica, a possibilidade de regeneração de nervos periféricos após lesão *in vivo* e *in vitro* (FAWCETT & KEYNES, 1990; KANJE, 1991) também nos motivou realizar a análise morfológica da região estudada. A regeneração vagal após a secção tem sido relatada em coelhos (BRIZZI & CIANI, 1981), cães (JEFFERSON *et al.*, 1967)

e em humanos (LOUP *et al.*, 1978). Em ratos foi verificada regeneração após 9 meses de período pós-operatório (POWLEY *et al.*, 1983). KANJE (1991) verificou taxa de regeneração do nervo vago, em cultura, da ordem de 1,4 mm por dia. Entretanto, NANOBASHVILI *et al.*, (1994) observaram degeneração de fibras vagais, 6 meses após vagotomia truncular em ratos.

As alterações na inervação esofágica em diabéticos parecem ocorrer em axônios de fibras parassimpáticas extrínsecas e intrínsecas ao esôfago, sendo que as maiores mudanças são verificadas nas células de Schwann (SMITH, 1974). A rede nervosa intrínseca do esôfago também é afetada em patologias como a doença de Chagas e a acalasia (WYNGAARDEN & SMITH, 1986). Pacientes com 3 anos de diabetes tratados com insulina apresentavam, na porção inferior da parede do esôfago, pequeno número de fibras com desmielinização segmental e um grande número de fibras mostrando degeneração Walleriana. Foi descrito também, irregularidade no calibre das fibras nervosas e presença de células não neuronais (linfócitos) nos gânglios nervosos, bem como, dilatação dos mesmos (SMITH, 1974).

Em estudos histoquímicos e de microscopia eletrônica em cães denervados crônica e seletivamente von HERWIG *et al.*, (1982) mostraram que a maioria das fibras apresentavam degeneração, perineurite, além de inflamação do gânglio intrapancreático.

A técnica cirúrgica empregada no presente trabalho foi eficaz na produção da vagotomia conforme atestaram os resultados morfológicos. O exame sob microscópio cirúrgico mostrou uma solução de continuidade da estrutura normal entre os cotos do nervo vago após o tempo de sobrevida considerados. As reações de imunoperoxidase mostraram que, mesmo nos locais onde havia se formado um tecido fibroso unindo os cotos dos nervos previamente seccionados, os axônios que eventualmente regeneraram deram lugar a um neuroma e não chegaram a atingir o coto caudal (figuras 4, 5 e 6). Invariavelmente, a imunoreatividade para neurofilamentos foi negativa no coto caudal em todos os animais estudados. Esta porção do nervo estava ocupada por um grande número de células de Schwann e fibroblastos (figura 7).

As etapas iniciais no processo de indução da secreção de insulina pela glicose consistem no reconhecimento da glicose e consequente diminuição na permeabilidade ao K^+ (ATWATER *et al.*, 1984; DAWSON *et al.*, 1985), que leva à despolarização da membrana plasmática e à subsequente ativação dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem, ao aumento transitório de Ca^{2+} citosólico e à ativação do sistema efetor que controla o acesso dos grânulos secretórios aos sítios de exocitose (MALAISSE *et al.*, 1984; HENQUIN & MEISSNER, 1984; BOSCHERO *et al.*, 1984; ATWATER *et al.*, 1989). A glicose, o mais potente segretagogo da

insulina, promove a diminuição do efluxo de K^+ de ilhotas de Langerhans isoladas e perfundidas (SEHLIN & TÄLJEDAL, 1975; BOSCHERO & MALAISSE, 1977; HENQUIN, 1978; BOSCHERO & MALAISSE, 1979). A concentração de glicose necessária para promover 50% da diminuição está em torno de 3 mM (HENQUIN, 1978). A despolarização da célula β está associada ao aumento na resistência oferecida pela membrana à entrada de corrente elétrica que é o equivalente à diminuição da permeabilidade ao K^+ como estudado através de medidas de fluxo unidirecional (ATWATER *et al.*, 1978 b; HENQUIN, 1978; ATWATER *et al.*, 1982; GONÇALVES *et al.*, 1986 a). O aumento na concentração de glicose é seguido por uma diminuição na razão do efluxo de $^{86}Rb^+$ das ilhotas perfundidas. Esta mudança na permeabilidade da célula β ao K^+ , contribui para o padrão bifásico da atividade elétrica e, da secreção de insulina (HENQUIN & MEISSNER, 1984).

O mecanismo básico responsável pela diminuição da permeabilidade das células β ao K^+ é determinado principalmente pelo aumento na taxa metabólica de glicose, que aumenta a geração de íons H^+ , aumentando a relação $NAD(P)H / NAD(P)^+$ e ATP / ADP que promovem a despolarização e aumentam a resistência à entrada de corrente (MALAISSE *et al.*, 1984). A descoberta dos canais de K^+ sensíveis ao ATP (COOK & HALES,

1984) permitiu estabelecer a relação entre o aumento da taxa metabólica induzida pela glicose e as modificações da permeabilidade da membrana ao K^+ . Embora o bloqueio dos canais de K^+ sensíveis ao ATP não seja, *per se*, suficiente para explicar a despolarização da membrana em altas concentrações de glicose, as modificações de permeabilidades são altas o suficiente para dar início ao processo de secreção. Este fato foi comprovado com os dados relativos ao uso de sulfoniluréias, drogas hipoglicemiantes usadas no tratamento do diabetes mellitus não insulino-dependente (NIDDM) que atuam diretamente sobre os canais K-ATP (STURGESS *et al.*, 1985).

No presente trabalho, as ilhotas isoladas de ratos intactos (grupo controle) mostraram modificações do efluxo do $^{86}Rb^+$ semelhantes aos obtidos em trabalhos anteriores de nossos (GONÇALVES *et al.*, 1986 a; BOSCHERO *et al.*, 1987) e de outros grupos de pesquisa desta área (SEHLIN & TÄLJEDAL, 1975; HENQUIN, 1978; BOSCHERO & MALAISSE, 1979; CROGHAN *et al.*, 1985; CARPINELLI & MALAISSE, 1981). Nas ilhotas obtidas desses ratos, a introdução de glicose (16,7 mM) provocou diminuição na taxa de efluxo, reversível após sua remoção.

Por outro lado, as ilhotas de Langerhans isoladas 15 ou 30 dias após a vagotomia do ramo pancreático apresentaram alteração

na permeabilidade ao K^+ em relação as ilhotas de ratos controle (figura 9). A mudança para a solução de glicose 16,7 mM causou diminuição reversível no efluxo de $^{86}Rb^+$ nas ilhotas dos grupos de ratos controle e vagotomizados. Entretanto o valor médio de efluxo deste período foi maior nas ilhotas dos ratos vagotomizados, sugerindo uma diminuição de sensibilidade das células β à glicose.

No grupo de ilhotas isoladas de ratos submetidos à vagotomia hepática (figura 10), 60 dias após a cirurgia também foi verificada diminuição reversível na razão do efluxo em ambos os grupos. Embora as ilhotas tenham respondido à adição de glicose com níveis máximos de inibição da permeabilidade ao K^+ de forma semelhante ao controle, não se pode afirmar com certeza que a sensibilidade à glicose não esteja modificada. Nesse grupo de ilhotas foi verificado, na condição inicial, uma tendência da razão do efluxo ser menor que a do grupo controle. Como se trata de uma primeira abordagem neste sentido, ainda é difícil explicar as razões para tal variação. Não acreditamos que o ramo hepático possa exercer efeito direto sobre as ilhotas. Tal diferença poderia decorrer de efeitos locais do ramo pancreático (íntegro) sobre as ilhotas, uma vez que as aferências inibitórias hepáticas sobre o sistema nervoso central foram retiradas (NIIJIMA, 1982; LEE & MILLER, 1985). Entretanto, ainda não temos evidências para

explicar as causas dessa variação que provavelmente envolvem a diminuição do número de canais de K^+ abertos na condição inicial (glicose ausente).

Poucas informações são disponíveis acerca dos efeitos colinérgicos sobre o movimento iônico em células β pancreáticas. Embora a carbamilcolina apresente menor estimulação da secreção de insulina em ilhotas de ratos, em comparação à acetilcolina (GAGERMAN *et al.*, 1978), a mesma não é degradada pela enzima acetilcolinesterase existente nas ilhotas pancreáticas (GODFREY & MATSCHINSKY, 1975). No grupo de ratos controle, a carbamilcolina (100 μ M) provocou aumento significativo no efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ em perfusão de ilhotas isoladas (figuras 11 e 12) corroborando as observações sobre seus efeitos na secreção de insulina (GAGERMAN *et al.*, 1978; NENQUIN *et al.*, 1984; MATHIAS, 1985; PALAFOX *et al.*, 1985; HENQUIN & NENQUIN, 1988) e sobre a atividade elétrica de células β (GAGERMAN *et al.*, 1978; SANTOS & ROJAS, 1989).

Todavia, ilhotas isoladas de ratos 60 dias após a vagotomia pancreática (figura 11), mostraram aparente redução na sensibilidade à carbamilcolina (100 μ M). Entretanto nas ilhotas de ratos submetidos à vagotomia hepática (figura 12) não parece ter havido alteração crônica da sensibilidade das células β .

Os mecanismos responsáveis pela variação no efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$, induzido pela carbamilcolina ainda não estão devidamente esclarecidos. MATHIAS *et al.*, (1985) verificaram que o efeito da carbamilcolina ocorre de forma dose-dependente e causa aumento rápido no efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$, enquanto que os nutrientes segretagogos usualmente diminuem o efluxo. Os autores atribuíram o efeito dos agonistas colinérgicos à uma modalidade de canais de K^+ dependente do Ca^{2+} (MATHIAS *et al.*, 1985; BORDIN *et al.*, 1994).

Os agentes colinérgicos podem mobilizar Ca^{2+} de organelas intracelulares não mitocondriais através da geração de inositol 1,4,5-trifosfato a partir do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato. BORDIN *et al.* (1994) sugeriram que a ação despolarizante e prolongada da oxotremorina-m poderia refletir a ativação de uma corrente de K^+ sensível à liberação dos estoques de Ca^{2+} de compartimentos intracelulares.

Alguns autores atribuem o aumento no efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ pela carbamilcolina à redistribuição de K^+ intracelular, à abertura de canais de K^+ sensíveis à voltagem (CARPINELLI & MALAISSE, 1981); ou ainda à abertura de canais de K^+ sensíveis diretamente à ação muscarínica (HENQUIN & NENQUIN, 1988). Também é possível que haja alteração na permeabilidade ao Na^+ , promovendo despolarização da membrana (GONÇALVES *et al.*,

1994). Os resultados de HENQUIN *et al.* (1988) mostraram que a acetilcolina não despolariza a membrana na ausência de Na^+ e, a partir disso, sugeriram que o aumento do efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ poderia ser consequência do influxo de Na^+ e da despolarização da membrana (HENQUIN *et al.*, 1988).

O ramo pancreático parece exercer um trofismo sobre as ilhotas de Langerhans e em consequência da denervação da ilhota provocar mudança na permeabilidade da membrana aos íons K^+ que, em resposta à glicose, se manifesta a partir de 15 dias de período pós-operatório (GIACOMINI *et al.*, 1994). Todavia, não realizamos a análise morfológica das ilhotas estudadas. Porém, em cães denervados crônica e seletivamente, não foi verificada mudança no número de ilhotas e na proporção entre células α / β (HERWIG *et al.*, 1982). Estes autores verificaram alterações funcionais como a ocorrência de insulite e redução na quantidade de insulina e glucagon; e estruturais, ou seja, vasos sanguíneos intrapancreáticos dilatados, hiperêmicos, fibrose vacuolar; células acinares com degeneração dos vacúolos e aumento no retículo endoplasmático rugoso, do número de mitocôndrias e do complexo de Golgi.

CAMPFIELD *et al.* (1984), verificaram que a vagotomia bilateral subdiafragmática exerceu efeitos crônicos sobre a secreção de insulina em ilhotas de Langerhans isoladas de ratos.

Após 30 dias de interrupção vagal bilateral o aumento da secreção de insulina pela acetilcolina foi suprimido.

Quanto à manutenção da resposta normal à carbamilcolina (100 μ M) nos ratos submetidos à vagotomia hepática, pode-se explicar pela falta de influência trófica direta desse ramo sobre a ilhota. Esse fato é confirmado pela própria anatomia da inervação vagal subdiafragmática (LEGROS & GRIFFITH, 1969). Os dados encontrados na literatura, obtidos em experimentos realizados *in vivo*, atribuem ao ramo hepático uma função de indicador da concentração de glicose ao sistema nervoso central através da frequência de sua atividade aferente inibitória (NIJIMA, 1969; LEE & MILLER, 1985). Em decorrência do protocolo realizado (glicose 5,6mM na condição inicial), não foi possível verificar diferença entre os grupos, nessa condição, como ocorreu na resposta à glicose (figura 10).

Todavia, no presente trabalho, a vagotomia hepática provocou alterações no armazenamento de glicogênio hepático nos estágios agudos e crônicos (figura 13).

Em ratos, no final do período absorptivo (consumo de alimento mais frequente no período de escuro), o glicogênio é encontrado em grande quantidade em todos os hepatócitos com pequena variação correspondendo a um zoneamento metabólico (JUNGERMANN & KATZ, 1989). Considerando esse fato, avaliamos as concentrações de glicogênio no período matutino.

O fígado tem função central na manutenção da homeostasia da glicose. Após uma refeição, este órgão capta uma quantidade considerável de glicose que é direcionada à síntese de glicogênio e triglicérides. Por outro lado, no jejum, o fígado passa a liberar glicose proveniente da glicogenólise e gliconeogênese suprindo o organismo. A concentração de glicose no sangue é um estímulo primário para o organismo estimular a captação ou liberação de glicose pelo fígado. O limiar hepático à glicose pode ser definido como a concentração de glicose na qual o fígado assume característica que direciona a mobilização de glicose (SOSKIN, 1940, *apud* HERS, 1976).

A redução da concentração de glicogênio hepático no final do período absorptivo, verificada nos grupos de ratos, 15 dias após a vagotomia hepática ou pancreática pode ser atribuída a alterações na atividade das enzimas da cadeia glicolítica, responsáveis pela ativação da glicogênio sintetase (fosfatase), ou enzimas de conversão de glicogênio em glicose (fosforilase e glicose-6-fosfatase). Neste contexto, podemos sugerir que essas alterações podem ter sido decorrentes do comprometimento no controle exercido pelo sistema neurovegetativo que inerva os hepatócitos ou ainda pelo desajuste neuroendócrino que a cirurgia pode desencadear (XIE *et al.*, 1993)

O efeito observado após 15 dias de pós-operatório é semelhante ao que ocorre após a estimulação do nervo esplâncnico. Tem sido relatada a ocorrência de resposta hiperglicêmica e depleção da reserva de glicogênio após estimulação dos nervos esplâncnicos em bezerros e em outras espécies de animais (para revisão, NIJIMA, 1986). A estimulação dos nervos simpáticos de coelhos causou aumento rápido nas atividades da glicogênio fosforilase e glicose-6-fosfatase no fígado, seguido pelo aumento na concentração de glicose no sangue; enquanto que, estimulação parassimpática causou efeito supressor sobre essas enzimas e simultânea ativação da glicogênio sintetase, causando diminuição da glicemia (SHIMAZU, 1974).

A participação de um mecanismo hormonal regulador das funções hepáticas também é essencial para que o fígado atue como glicostato (HERS, 1976). A insulina participa da homeostasia glicêmica inibindo a glicogenólise e gliconeogênese hepática e estimulando a captação, utilização e armazenamento de glicose por outros tecidos sensíveis à insulina, tais como, músculo e tecido adiposo. Em contrapartida, quando a insulina é injetada num animal, causa redução na glicemia, que após um período, inicia uma intensa glicogenólise no fígado mediada pela ação dos hormônios contra-reguladores da insulina. Sabe-se que a depleção de glicogênio causa ativação parcial da glicogênio sintetase. Por

outro lado, a ativação dessa enzima ocorre poucas horas após a administração de insulina em ratos; portanto este efeito pode ser considerado indireto (HERS, 1976).

A intensa glicogenólise verificada nos ratos submetidos à denervação hepática pode ser comprovada pelos resultados de LAUTT & WONG (1978) que mostram aumento da deposição de glicogênio após estimulação da inervação hepática parassimpática em coelhos.

Segundo GARDEMANN & JUNGEMANN, (1986) os efeitos sobre o armazenamento de glicogênio hepático podem ser causados, principalmente, pela ação direta da inervação parassimpática e, somente em parte, mediada pela estimulação da secreção de insulina ou aumento da secreção de glucagon.

Sob condições normais, a insulina e os nervos hepáticos parassimpáticos atuam sinergicamente promovendo o armazenamento hepático de glicose e, atuando como antagonistas dos efeitos do glucagon (GARDEMANN & JUNGEMANN, 1986). A insulina *per se*, promove a ativação da glicogênio sintetase de maneira muito mais lenta do que na presença de agonistas colinérgicos (SHIMAZU, 1974). Com isso podemos supor que, mesmo após a retirada da aferência inibitória do ramo hepático sobre o sistema nervoso central (NIJIMA, 1982; LEE & MILLER, 1985), a insulina não foi eficiente em promover a síntese e armazenamento de glicogênio hepático no período pós-absortivo.

Considerando o sinergismo entre os nervos hepáticos parassimpáticos e a insulina (GARDERMANN & JUNGERMANN, 1986), podemos atribuir a redução na concentração de glicogênio hepático verificada 15 dias após a denervação pancreática à uma provável diminuição da secreção de insulina como resposta à denervação das células β . LAUTT & WONG, (1978) mostraram que a diminuição da liberação de glicose e aumento da síntese de glicogênio em fígados isolados e perfundidos não ocorreu na ausência da insulina. Nesses experimentos, a acetilcolina mas não a carbamilcolina produziu esses efeitos.

Após 60 dias de cirurgia os valores obtidos nos dois grupos de ratos vagotomizados diferiram entre si e em relação ao grupo controle. A concentração de glicogênio hepático, observada 60 dias após a vagotomia hepática permaneceu reduzida indicando que a ausência da inervação vagal alterou o armazenamento de glicogênio hepático.

O efeito observado após a vagotomia hepática parece com o que se observa nos estágios iniciais do diabetes não dependente de insulina (NIDDM), onde o maior problema está na perda da capacidade da insulina em promover a captação hepática de glicose e posterior síntese de glicogênio (DEFRONZO *et al.*, 1992). Muitos autores atribuem a hiperglicemia encontrada em

indivíduos portadores de NIDDM à intensa gliconeogênese, ou seja, produção de glicose a partir dos precursores lactato e piruvato (WOLLEN & BAILEY, 1988; DEFRONZO et al., 1992). A administração de agentes antihiperghlicemiantes (Metformina) que atuam na absorção intestinal de glicose, reduzindo sua captação e suprimindo a gliconeogênese têm sido indicados no tratamento de NIDDM (WOLLEN & BAILEY, 1988). A metformina também apresenta sinergismo com a insulina (WOLLEN & BAILEY, 1988) e aumenta o armazenamento de glicogênio hepático de ratos normais e diabéticos (da SILVA & GONÇALVES, 1994).

A concentração de glicogênio hepático verificada 60 dias após a vagotomia pancreática apresentou-se maior que os valores obtidos de ratos hepatovagotomizados e de ratos controle. Podemos sugerir que o retorno a valores normais do teor de glicogênio hepático, em função do tempo (60 dias), pode ser explicado pela possível utilização de outros mecanismos (neurais e/ou endócrinos) para o ajuste a um novo padrão metabólico.

A partir da secção dos ramos pancreático e hepático pode haver predominância da inervação simpática no pâncreas e no fígado, respectivamente. Dessa forma, pode-se sugerir um efeito dessa inervação sobre as células das ilhotas e sobre o fígado, resultando no aumento da glicogenólise e gliconeogênese. A estimulação dos nervos esplâncnicos no pâncreas causou secreção

de glucagon em gatos, cães e bezerras (BLOOM *et al.*, 1975; ESTERHUIZEN & HOWELL, 1970; KANETO *et al.*, 1975). EDWARDS & SILVER, (1970) verificaram depleção de glicogênio hepático e aumento da concentração plasmática de glicose, rapidamente após a estimulação dos nervos esplâncnicos.

Nossos dados estão de acordo com os obtidos por SHIMAZU, (1974) que mostrou que a estimulação do ramo hepático vagal ativou a glicogênio sintetase e sugeriu que a denervação poderia comprometer a atividade desta enzima.

No NIDDM, o aumento da produção hepática de glicose foi intimamente correlacionado ao grau de hiperglicemia no jejum. Estes resultados indicaram que em indivíduos NIDDM a excessiva saída de glicose hepática é um importante fator para o desenvolvimento de hiperglicemia no jejum (DEFRONZO *et al.*, 1992).

No estado pós-absortivo a concentração plasmática de insulina foi 2 a 3 vezes maior em indivíduos diabéticos. Pelo fato da hiperinsulinemia ser um poderoso inibidor da saída de glicose hepática, é evidente que a resistência à insulina esteja presente no estado pós-absortivo de diabéticos e, assim contribuindo para a saída excessiva da glicose hepática (DEFRONZO *et al.*, 1992).

Os resultados obtidos a partir do teste de tolerância à insulina realizados em ratos vagotomizados divergiram dos dados de XIE *et*

al., (1993). Estes autores demonstraram resistência à insulina em gatos submetidos à denervação do plexo nervoso hepático. Essa discrepância pode ser devida aos procedimentos empregados, pois estes foram realizados de forma extremamente aguda ou seja, minutos após a vagotomia. Podemos sugerir que deve existir um mecanismo adaptativo desenvolvido após 15 dias de cirurgia.

Em vista do controle da glicemia estar íntegro nos ratos normais, a remoção da glicose atingiu o valor máximo de decaimento (50,24 mg/100ml) aos 15 minutos. Este valor correspondeu à 44,9 % de remoção em relação ao valor inicial. Quanto ao grupo de ratos vagotomizados, foi observado que 50% da remoção da glicose ocorreu nos minutos 10 (ramo hepático) e 11 (ramo pancreático). Embora tenha sido verificado um aumento na velocidade de remoção de glicose nos ratos vagotomizados em relação ao grupo controle, é conveniente salientar que os valores iniciais de glicemia também foram maiores. Essa glicemia inicial aumentada pode ser atribuída a uma diminuição da secreção de insulina; conseqüentemente, as células-alvo na periferia estariam mais sensíveis à insulina.

No presente trabalho, a falta da dosagem de insulina tanto *in vitro* quanto *in vivo* dificultou a análise mais clara dos resultados apresentados. A avaliação desse parâmetro deve ser realizada para elucidar algumas questões que permaneceram obscuras.

6. CONCLUSÕES

Os dados aqui apresentados sugerem que a vagotomia do ramo pancreático pode, a longo prazo afetar a sensibilidade da célula β à glicose e aos agonistas colinérgicos, alterando a permeabilidade iônica ao K^+ . Nossos resultados sugerem que a inervação parassimpática exerce um efeito trófico sobre as ilhotas de Langerhans, alterando a sensibilidade à glicose e à carbamilcolina. Essas alterações podem ter papel importante na secreção de insulina em diabéticos em estágios iniciais com comprometimento da inervação parassimpática.

Por outro lado, a denervação hepática sobre a permeabilidade iônica ao K^+ das células β pancreáticas em resposta à glicose não foram devidamente esclarecidos. A resposta à carbamilcolina (100 μ M) foi verificado que esta não é alterada pela denervação hepática.

Entretanto, o ramo hepático participa na regulação dos eventos que determinam a mobilização de glicogênio, diminuindo as reservas hepáticas nos estágios agudos e crônicos.

O teste de tolerância à insulina demonstrou que os ratos vagotomizados apresentam altos valores de glicemia e sensibilidade periférica à insulina maior que ratos controle. Esse fato pode ser atribuído à uma deficiência na secreção de insulina.

7. RESUMO

O sistema nervoso parassimpático está envolvido na modulação da secreção de insulina e no metabolismo de carboidratos no fígado e em outros tecidos. O presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos agudos e crônicos da vagotomia subdiafragmática seletiva sobre a sensibilidade das ilhotas de Langerhans aos segretagogos (glicose e carbamilcolina) *in vitro*, sobre a sensibilidade à insulina *in vivo* e sobre o armazenamento de glicogênio hepático. Os ratos foram anestesiados, submetidos à vagotomia nos ramos hepático e pancreático e, após 15, 30 e 60 dias foram utilizados nos protocolos descritos a seguir. Para estudar os efeitos da vagotomia sobre a sensibilidade das ilhotas destes ratos, essas foram isoladas por colagenase, incubadas com $^{86}\text{Rb}^+$ (substituto do $^{42}\text{K}^+$) e perfundidas para medir a taxa de efluxo como estimativa da permeabilidade ao K^+ (PK). Ilhotas isoladas de ratos vagotomizados do ramo pancreático (15 e 30 dias) apresentaram alteração na sensibilidade à glicose (16,7mM) e à carbamilcolina (CCh 100 μM). A PK foi reduzida na presença de glicose em ilhotas de ratos controle (1,95% min⁻¹) e de ratos vagotomizados do ramo pancreático (2,51 % min⁻¹ e 2,43% min⁻¹ após 15 e 30 dias, respectivamente) embora em menor intensidade nos últimos. Embora, a PK tenha sido inibida nas ilhotas de ratos submetidos à vagotomia hepática ao mesmo nível que nas ilhotas de ratos

controle, durante a condição inicial (glicose ausente), a PK nos ratos vagotomizados foi menor que no controle. A CCh (100 μ M) não aumentou PK na presença de glicose (5,6mM) nas ilhotas isoladas de ratos submetidos à vagotomia pancreática. Entretanto, nas ilhotas isoladas de ratos vagotomizados no ramo hepático, a CCh 100 μ M aumentou o efluxo de forma semelhante ao verificado nas ilhotas de rato controle.

A vagotomia também alterou o armazenamento de glicogênio hepático. Após a vagotomia hepática (15 e 60 dias) a concentração de glicogênio hepático foi reduzida. Todavia ratos submetidos à vagotomia pancreática exibiram diminuição na reserva hepática no período agudo (15 dias) enquanto que no período crônico (60 dias), ocorreu aumento dessa concentração.

O teste de tolerância à insulina mostrou diferença significativa entre os valores iniciais de glicemia nos ratos vagotomizados (114,31 \pm 3,11 ramo hepático e 138,23 \pm 7,81 ramo pancreático) em relação ao grupo controle (91,17 \pm 5,19). A administração de insulina i.p. induziu uma rápida remoção da glicose (50% de remoção nos minutos 10 e 11) nos ratos vagotomizados dos ramos hepático e pancreático, respectivamente. Os dados obtidos nesse teste indicaram que os ratos vagotomizados são mais sensíveis à insulina. Este resultado é compatível com o baixo padrão de secreção de insulina relatado por outros autores.

Nossos resultados sugerem um efeito trófico da inervação vagal pancreática sobre as ilhotas de Langerhans, especialmente sobre as células β .

8. SUMMARY

ACUTE AND CHRONIC EFFECTS OF SELECTIVE SUBDIAPHRAGMATIC VAGOTOMY ON K⁺ PERMEABILITY OF ISLETS OF LANGERHANS, HEPATIC GLYCOGEN STORAGE AND GLYCEMIC RESPONSE TO INSULIN IN RATS

Parasympathetic nervous system is involved in the modulation of insulin secretion and in the balance of carbohydrate metabolism in liver and other tissues. This work was carried out to study the short and long time effects of selective subdiaphragmatic vagotomy on events related to glycemic control: "in vitro" sensitivity of islets of Langerhans to glucose and carbamylcholine and "in vivo" sensitivity to insulin and hepatic glycogen storage. The rats was anesthetized and hepatic or pancreatic vagotomy was performed. After 15, 30 or 60 days of recovery, rats was submitted to experimental protocols as described bellow. Studies of the effects of vagotomy on the K⁺ permeability (PK) was conducted on collagenase isolated islets of Langerhans using ⁸⁶Rb⁺ as a substitute for ⁴²K⁺. The islets isolated from pancreatic vagotomized rats (15 and 30 days) had their sensitivity to glucose (16,7mM) and carbamylcholine (CCh) (100μM) altered. The PK was reduced by glucose (16,7mM), but in a lesser extent that in the control islets (2,51 % min⁻¹ 15 days; 2,43% min⁻¹ 30 days; 1,95% min⁻¹ control). On the other hand, CCh (100μM) did not

increased the PK in the presence of glucose (5,6 mM) as were seen in the islets for control group. However, in the hepatic vagotomized rats, CCh increased PK. As for the effect of glucose (16,7 mM) the data is conflicting. Although PK was inhibited by glucose (16,7 mM) to the same level as seen in the control, during the initial condition (i.e, no glucose) the PK of the vagotomized islets was lesser than the control. These results suggest that the vagotomy of the pancreatic branch alters the sensitivity of the islets to glucose and CCh.

Vagotomy also affected the storage of glycogen on liver. Hepatic vagotomy (15 and 60 days) induced reduction of glycogen storage. In the pancreatic vagotomized group the glycogen storage was diminished 15 days after the surgery, but was increased after 60 days.

Vagotomized rats presented higher initial glucose ($114,31 \pm 3,11$ mg/100mg in hepatic and $138,23 \pm 7,81$ mg/100mg in pancreatic) than control group. Exogenous i.p. insulin induced a fast removal of glucose from plasma (50% concentration) at the 10 and 11 min for hepatic and pancreatic, respectively. The vagotomized rats showed a high glucose removal rate, indicative of high sensitivity to insulin. This is compatible to a low insulin secretion pattern as reported by other authors.

Taken together, these results suggest that the pancreatic vagal innervation exerts a trophic effect on the pancreatic islets, especially to the β cell.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, W.C.: Sixty years of vagotomy; a review of some 200 articles. **Gastroenterology**, **10**: 413 - 441, (1948).

ASHCROFT, F.M.: Adenosine - triphosphate - sensitive K^+ - channels. **Ann. Rev. Neurosci.**, **11**: 97 - 118, (1988).

----- & RORSMAN, P.: Electrophysiology of the pancreatic β -cell. **Prog. Biophysics & Molecular Biology**, **54**: 87 - 143, (1989).

ATWATER, I.; RIBALET, B. & ROJAS, E.: Cyclic changes in membrane potential and resistance of the β -cell membrane induced by glucose in islets of Langerhans from mouse. **J. Physiol.**, **278**: 117 - 139, (1978a).

-----, DAWSON, C., RIBALET, B. & ROJAS, E.: Potassium permeability activated by intracellular calcium ion concentration in pancreatic β -cell. **J. Physiol.**, **288**: 575 - 588, (1978b).

-----; GONÇALVES, A.A. & ROJAS, E.: Electrophysiological measurement of an oscillating potassium permeability during glucose-stimulated burst activity in mouse β -cell. **Biomedical Res.**, **3**: 645 - 648, (1982).

-----; GONÇALVES, A.A.; HERCHUELZ, A.; LEBRUN, P.; MALAISSE, W.; ROJAS, E. & SCOTT, A.: Cooling dissociates glucose-induced insulin release from electrical activity and cation fluxes in rodent pancreatic islets. **J. Physiol.**, **348**: 615 - 629, (1984).

ATWATER, I.; CARROL, P. & M.X., LI S.: Electrophysiology of the pancreatic B-cell. *Insulin Secretion*, ed. by B. Draznin, S. Melmed and D. Leroith, Allan R. Liss, New York, (1989).

BELL, G.L.; KAYANO, T.; BUSE, J.B.; BURANT, C.F.; TAKEDA, J.; LIN, D.; FUKUMOTO, H. & SEINO, S.: Molecular biology of mammalian glucose transporters. ***Diabetes Care*, 13: 198 - 208, (1990).**

BERTHOUD, H.R.; & JEANRENAUD, B.: Acute hyperinsulinemia and its reversal by vagotomy after lesions of the ventromedial hypothalamus in anesthetized rats. ***Endocrinology*, 105: 146 - 151, (1979).**

-----, NIJIMA, 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).**

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

BLOOM, S.R.; VAUGHAN, N.J.A. & RUSSEL, R.C.G.: Vagal control of glucagon release in man. ***Lancet*, II: 546- 549, (1975).**

BONNER, T.I.; BUCKLEY, N.J.; YOUNG, A.C. & BRANN, M.R.:
Identification of family of muscarinic acetylcholine receptor genes.
Science, 237: 527 - 532.

BOSCHERO, A.C.; KAWAZU, S.; DUNCAN, G. & MALAISSE, W.J. :
Effect of glucose on K⁺ handling by pancreatic islets. **FEBS Letters**,
83: 151-154, (1977).

----- & MALAISSE, W. : Stimulus secretion coupling of
glucose-induced insulin release XXIX. The regulation of ⁸⁶Rb⁺
efflux from perfused islets. **Am. J. Physiol.**, 236: 139 - 146, (1979).

-----; ----- & GONÇALVES, A.A.: Mecanismo
de secreção de insulina. **Ciência e Cultura**, 36: 1742-1757, (1984).

-----; REIS, L.C.; DIAS, O.; DELATTRE, E. &
GONÇALVES, A.A.: Cation transport by pancreatic B-cells: effect of
4-aminopyridin on ⁸⁶Rb⁺ and ⁴⁵Ca⁺⁺ fluxes. **Quarterly J. Exp.
Physiol.**, 72: 453- 460, (1987).

-----; SZPAK - GLASMAN, M.; CARNEIRO, E.M.;
BORDIN, S. & ATWATER, I. : Caracterização farmacológica e
molecular dos receptores muscarínicos nas ilhotas de Langerhans.
Anais da IX Reunião Anual da FESBE, pág. 162, (1994).

BORDIN, S.; CARNEIRO, E.M.; ATWATER, I. & BOSCHERO, A.C.:
Mecanismos iônicos envolvidos na regulação da secreção de insulina
por receptores muscarínicos. **Anais da IX Reunião Anual
FESBE**, pág. 164, (1994).

BRIZZI, E. & CIANI, P.A.: Regeneration of the abdominal vagus. **Folia Morphol.**, **29**: 39 - 40, (1981).

CAMPFIELD, L.A. & SMITH, F. : Modulation of insulin secretion by Autonomic Nervous System. **Brain Res. Bull.**, **5 (suppl. 4)**: 103 - 107, (1980).

CAMPFIELD, L.A. & SMITH, F. : Alteration of islet neurotransmitter sensitivity following ventromedial hypothalamic lesion. **Am. J. Physiol.** **244**: 635 - 640, (1983).

-----, ----- & ESKINAZI, R.E.: Glucose responsiveness and acetylcholine sensitivity of pancreatic β -cells after vagotomy. **Am. J. Physiol.** **246**: 985 - 993, (1984).

CARPINELLI, A.R. & MALAISSE, W.J.: Regulation of $^{86}\text{Rb}^+$ outflow from pancreatic islets: The dual effect of nutrient secretagogues. **J. Physiol.**, **315**: 143-156, (1981).

COOK, D. & HALES, C.N. : Intracellular ATP directly blocks K^+ -channels in pancreatic β -cell. **Nature**, **311**: 269 - 271, (1984).

CROGHAN, P.C.; DAWSON, C.M.; SCOTT, A.M. & BANGHAN, J.A. : Contribution of isotope flux studies to understanding the mechanism of the β -cell membrane. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, **211**: 207 - 223, (1985).

CURI, R.: Influências do exercício físico e do jejum prolongado sobre as adaptações metabólicas do esquema de restrição alimentar em ratos adultos. **Tese de doutoramento, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB - USP, (1984).**

da SILVA, C.A. & GONÇALVES, A.A.: Zoneamento hepático e recuperação das reservas de glicogênio em ratos diabéticos tratados com metformina. **Anais da IX Reunião Anual da FESBE, pág 158 (1994)**

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

DEFRONZO, R.A.; BONADONNA, R.C. & FERRANNINI, E.: Pathogenesis of NIDDM. **Diabetes Care 15, (3): 318 - 368, (1992).**

DORETTO, D.: Fisiopatologia Clínica do Sistema Nervoso. Atheneu, R.J. (1989).

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

EDWARDS, A.V. & SILVER, M.: The glycogenolytic response to stimulation of the splanchnic nerves in adrenalectomized calves. **J. Physiol., 211: 109 - 124, (1970).**

- ESTERHUIZEN, A.C. & HOWELL, S.L. : Ultrastructure of the A-cells of the cat islets of Langerhans following sympathetic stimulation of glucagon secretion. **J. Cell. Biol.**, **46: 593 - 631, (1970).**
- FAWCETT, J.W. & KEYNES, R.J.: Peripheral nerve regeneration. **Ann. Rev. Neurosci.**, **13: 43 - 60, (1990).**
- FOX, K.A.; KIPP, S.C. & VANDERWEELE, D.: Dietary self-selection following subdiaphragmatic vagotomy in the white rat. **Am. J. Physiol.**, **231: 1790 - 1793, (1976).**
- GAGERMAN, E.; IDAHL, L.A.; MEISSNER, H.P. & TALJEDAL, I-B., : Insulin release, cGMP, cAMP and membrane potential in acetylcholine - stimulated islets. **Am. J. Physiol.**, **235: 493 - 500, (1978).**
- GANESAN, S.; CALLE, R.; ZAWALICH, K.; SMALLWOOD, J.I., ZAWALICH, W.S. & RASMUSSEN, H.: Glucose - induced translocation of protein Kinase C in rat pancreatic islets. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87: 9893 - 9897, (1990).**
- GARDERMANN, A. & JUNGERMANN, K.: Control of glucose balance in the perfused rat liver by the parasympathetic innervation. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, **367: 559 - 566, (1986).**
- GIACOMINI, A.C.V.V.; da SILVA, C.A. & GONÇALVES, A.A. : Permeabilidade ao K⁺ na membrana de ilhotas de Langerhans após vagotomia subdiafragmática seletiva. **Anais da IX Reunião Anual FESBE**, **pág. 313, (1994).**

GODFREY, D.A. & MATSCHINSKY, F.M.: Enzymes of the cholinergic system in islets of Langerhans. **J. Histochem. Cytochem.**, **23: 645 - 651, (1975).**

GONÇALVES, A.A.; CARNEIRO, E.M. & BOSCHERO, A.C.: Selectivity of beta cell membranes to monovalent cations: II. ^{86}Rb outflow. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **19: 610 - 614, (1986a).**

-----, DIAS, O.; LANGONE, F., REIS, L.C. & BOSCHERO, A.C.: Thiopental inhibits K^+ permeability of rat and mouse pancreatic β -cells. **European J. Pharmacol.**, **125: 7 - 13, (1986b).**

----- & ATWATER, I.: Bloqueio dos canais de K^+ sensíveis ao ATP pelo tiopental se correlaciona com despolarização das células β pancreáticas. **Anais da VI Reunião Anual da FESBE**, pág 454, (1991).

-----; da SILVA, C.A.; CARNEIRO, E.M.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; GIGLIO, J.R.; ARANTES, E.C. & OLIVEIRA, B.: TsTX-V, a novel toxin from *T. serrulatus* (Ts) increase K^+ -permeability of pancreatic β -cells. **Programa y Resúmenes II, Congreso Iberoamericano de Biofísica**, pág. 89, (1993).

-----; MEARS, D.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; GIGLIO, J.R. & OLIVEIRA, B. Toxina de *T. serrulatus*, TsTX-V, altera a atividade elétrica das células β de camundongos. **Anais da IX Reunião Anual da FESBE**, pág. 313, (1994).

- GYLFE, E.; BUITRAGO, A.; BERGREN, P.O.; HAMMARSTRÖM, K. & HELLMAN, B. : Glucose inhibition of ^{45}Ca efflux from pancreatic islets. **Am. J. Physiol.**, **4**: 191 - 196, (1978).
- 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. Exper. Biol.**, **71**: 196- 200, (1949).
- HARMON, J.W. : Verdict on vagotomy. **Gastroenterology**, **81**: 809 - 810, (1981).
- HENQUIN, J.C. : D-glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islets cells. **Nature**, **271**: 271 - 273, (1978).
- & MEISSNER, H.P. : Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic β cells. **Experientia**, **40**: 1043 - 1052, (1984).
- & NENQUIN, M. : The muscarinic receptor subtype in mouse pancreatic β -cell. **FEBS Letters**, **236**: 89 - 92, (1988).
- ; GARCIA, M.C.; BOZEN, M.; HERMANS, M.P. & NENQUIN, M. : Muscarinic control of pancreatic B-cell function involves sodium-dependent depolarization and calcium influx. **Endocrinology**, **122**: 2134 - 2142.

- HERMANS, M.P.; SCHMEER, W., & HENQUIN, J.C.: Modulation of the effect of acetylcholine on insulin release by the membrane potential of B cells. **Endocrinology**, **120**: 1765 - 1773, (1987).
- HERS, H.G. : The control of glycogen metabolism in the liver. **Ann. Review of Biochemistry**, **45**: 167 - 189, (1976).
- HERWIG, V.; VON DORSCH, H.; SCHWESINGER, G.; FISCHER, U.; NOWAK, W. & WOLTER, S.: Histotopochemische und elektronenmikroskopische untersuchungen am pankreas von hunden nach denervierung des pankreas. **Acta histochem.**, **71**: 119 - 132, (1982).
- HOLLE, G.E.; HAHN, D. & FORTH, W.: Vagal innervation of the pylorus in the control of contractile activity and gastric emptying. **Gastroenterology**, **99**: 1214, (1990).
- HOSKING, D.J.; BENNETT, T. & HAMPTON, J.R. : Diabetic autonomic neuropathy. **Diabetes** **27**: 1043 - 1054, (1978).
- HSU, S.M.; RAINE, L. & FANGER, H. : A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and avidin-biotin complex method for studing polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **Am. J. Clin. Pathol.**, **75**: 734 - 738, (1981).
- INOUE, S. & BRAY, G.A.: The effects of subdiaphragmatic vagotomy in rats with ventromedial hypothalamic obesity. **Endocrinology**, **100**: 108 - 114, (1977).
- IONESCU, E. & JEANRENAUD, B. : Effect of electrical stimulation of the vagus nerve on insulinemia and glycemia in *Acomys cahirinus* mice. **Endocrinology**, **123**: 885-890, (1988).

- IVERSEN, J. : Effect of acetylcholine on the secretion of glucagon and insulin from the isolated, perfused canine pancreas. **Diabetes**, **22**: 381- 87, (1973).
- JEANRENAULD, F.R. & JEANRENAULD, B. : Interactions entre le système nerveux central, le pancréas endocrine et le métabolisme. **Annales d'Endocrinologie**, **48**: 400 - 406, (1987).
- JEFFERSON, N.C.; GEISEL, A.; LOTT, P.Jr. & NECHELES, H.: Vagus regeneration in dog. **Surgery**, **61**: 808 - 811, (1967).
- JUNGERMANN, K. & KATZ, N.: Functional specialization of hepatocytes. **Physiological Reviews**, **69** (3): 708 - 764, (1989).
- KAMEL, I.; MIKHAIL, Y. & BESHIR, S. : Study on the innervation of the pancreas of the rat. **Acta Anat.**, **104**: 237 - 241, (1979).
- KANETO, A.; KAJINUMA, H. & KOSAKA, K. : Effect of splanchnic nerve stimulation on glucagon and insulin output in dog. **Endocrinology**, **96**: 143-150, (1975).
- KANJE, M. : Survival and regeneration of the adult rat vagus nerve in culture. **Brain Research**, **550**: 340 - 342, (1991).
- KITABCHI, A.E. & WILLIAM, W.H.: Effect of steroidogenesis on ascorbic acid content and uptake in isolated adrenal cells. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, **258**: 422 - 431, (1975).

- KOZLOWSKI, R.Z.; HALES, C.N. & ASHFORD, M.L.J.: Dual effects of diazoxide on ATP-K⁺-currents recorded from an insulin-secreting cell line. **Br. J. Pharmacol.**, **97**: 1039 - 1050, (1989).
- 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. & WONG, C. : Hepatic parasympathetic neural effect on glucose balance in intact liver. **Can. Journal of Physiol. and Pharmacol.**, **56**(4): 679 - 682, (1978).
- LEAHY, J.L.; BONNER-WEIR, S. & WEIR, G.C. : β - cell dysfunction induced by chronic hyperglycemia. **Diabetes Care**, **15**: 442 - 455, (1992).
- LEE, K.C. & MILLER, R.E. : The hepatic vagus nerve and the neural regulation of insulin secretion. **Endocrinology**, **117**: 307 - 314, (1985).
- LEGROS, G. & GRIFFITH, C.A. : The abdominal vagal system in rats. **Journal of Surgical Research**, **9**: 183 - 186, (1969).
- LO SIU, J.C.R. & TAYLOR, W.: Determination of glycogen in small tissue sample. **J. Appl. Physiol.**, **28**: 234 - 236, (1970).

LOUIS-SYLVESTRE, J. : Feeding and metabolic patterns in rats with truncular vagotomy or with transplanted B-cells. **Am. J. Physiol.**, **235: 119 - 125, (1978a)**.

-----: Relationship between two stages of prandial insulin release in rats. **Am. J. Physiol.**, **235: 103 - 111, (1978b)**.

----- : Validation of tests of completeness of vagotomy in rats. **J. Auton. Nerv. Syst.**, **9: 301 - 314, (1983)**.

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

LOUP, P.; GHAVAMI, B.; BAMBULE, J. & MOSIMANN, R. : Regeneration des nerfs vagues. Une explication possible des ulcereuses après vagotomie. **Acta Gastroent. Belg.**, **41: 450 - 457, (1978)**.

MALAISSSE, W.J.; BOSCHERO, A.C.; KAWAZU, S. & HUTTON, J.C. : The stimulus secretion coupling of glucose-induced insulin release. **Pflügers Arch.**, **373: 237 - 242, (1978)**.

MALAISSSE, W.J.; MALAISSSE-LAGAE, F. & SENER, A. : Coupling factors in nutrient-induced insulin release. **Experientia**, **40: 1035 - 1043, (1984)**.

MATHIAS, P.C.F. : Ação de agentes colinérgicos em ilhotas pancreáticas isoladas. **Tese de doutoramento. Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-USP, (1985).**

-----; BEST, L. & MALAISSE, W.J.: Stimulation by glucose and carbamylcholine of phospholipase A₂ in pancreatic islets. **Diabetes Research, 2: 267 - 270, (1985)**

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

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

MEI, M.A. : Potentiated effect of vagal stimulation on hormonal agents on pancreatic exocrine secretion in dogs. **Sci. China, 34: 683 - 690 (1991).**

MEI, N. : Vagal glucoreceptors in the small intestine of the cat. **J. Physiol., 282: 485-506, (1978).**

MILLER, R.E. : Pancreatic neuroendocrinology: peripheral neural mechanisms in the regulation of islet of Langerhans. **Endocr. Rev., 2: 471 - 494, (1981).**

- MINDLIN, R.L. & BUTLER, A.M. : The determination of ascorbic acid in plasma. A micromethod. **J. Biol. Chem.**, **127**: 673 - 680, (1938).
- MISLER, S.; GEE, W.M.; GILLIS, K.D.; SCHARP, D.W. & FALKE, L.C.: Metabolite-regulated ATP-sensitive K⁺ channel in human pancreatic islet cells. **Diabetes**, **38**: 422 - 427, (1989).
- MONDON, C.E. & BURTON, S.D. : Factors modifying carbohydrate metabolism and effect of insulin in perfused rat liver. **Am. J. Physiol.**, **220**: 724 - 733, (1971)
- NAGASE, H.; INOUE, S; TANAKA, K.; SAITOH, T. & TAKAMURA, Y.: Hyper-response of insulin release to arginine in streptozotocin-induced diabetic rats with hepatic vagotomy. **Endocrinol. Japon.**, **37**: 545 - 553, (1990).
- NANOBASHVILI, J.D.; STACHER, G.; WINDBERGER, U; DUDCZAK, R.; LIEGL, C.; GORGADZE, V.; LOSERT, U.; HEINZL, H. & NEUMAYER, C. : Regenerative potential of abdominal vagal nerves in rats. **Am. J. Physiol.**, **266**: 140 - 146, (1994).
- NENQUIN, M.; AWOUTERS, P.; MATHOT, F. & HENQUIN, J.C.: Distinct effects of acetylcholine and glucose on ⁴⁵ calcium and ⁸⁶ rubidium efflux from mouse pancreatic islets. **FEBS Letters**, **176**: 457 - 461 (1984).

NEUHUBER, W.L. : Vagal afferent fibers almost exclusively innervate islets in the rat pancreas as demonstrated by anterograde tracing. **J. Auton. Nerv. Syst.**, **29: 13 - 18, (1989).**

NIIJIMA, A. : Afferent impulse discharges from glucoreceptors in the liver of guinea pig. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, **157: 690 - 700, (1969).**

----- : Glucose sensitive afferent nerve fibres on the liver and regulation of blood glucose. **Brain Res. Bull.**, **5 : 175 - 179, (1980).**

----- : Glucose-sensitive afferent nerve fibres in the hepatic branch of the vagus nerve in the guinea-pig. **J. Physiol.**, **332: 315 - 323, (1982).**

----- : Neural control of blood glucose level. **Jap. J. Physiol.**, **36: 826 - 841, (1986).**

----- : Nervous regulation of metabolism. **Progress in Neurobiology** **33: 135 - 147, (1989).**

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

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

NIIJIMA, A. : Effect of Umami taste stimulations on vagal afferent activity in rat. **Brain Res. Bull.**, **27**: 393 - 396, (1991c).

-----; 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).

OKAZAKI, H.; TANAKA, K.; NAGASE, H. & INOUE, S. : Modulation of insulin secretion by hepatic vagotomy in cirrhotic rats. **Physiol. Behav.**, **53**: 521- 525, (1992).

ORCI, L.A.; LAMBERT, E.; AMHERDT, M.; CAMERON, D.; KANAZAWA, Y. & STAUFFACHER, W.: The autonomous nervous system and the B-cell: metabolic and morphological observations made in spiny mice (*Acomys cahirinus*) and in cultured fetal rat pancreas. **Acta Diabetol. Lat.**, **7** (suppl.1): 184 - 226, (1970).

ORCI, L. : The microanatomy of the islets of Langerhans. **Metabolism**, **25**: 1303 - 1313, (1976).

PALAFOX, I.; SANCHEZ-ANDRES, J.V.; SALA, S.; FERRER, R. & SORLA, B. : Muscarinic receptors and the control of glucose-induced electrical activity in the pancreatic β -cell. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, **211**: 351 - 358, (1985).

PETERSEN, O.H. & FINDLAY, I. : Electrophysiology of the pancreas. **Physiol. Reviews**, **67**: 1054 - 1116, (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).

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

PRECHTL, J.C. & POWLEY, T.E. : A light and electron microscopic examination of the vagal hepatic branch of the rat. **Anat. Embryol.**, **176**: 115 - 126, (1987).

PRESSEL, D. & MISLER, S. : Sodium channel contribute to action potential generation in canine and human pancreatic β -cells. **J. Membr. Biol.**, **116**: 273 - 280, (1990).

PURWAR, R.S. : Observations on the intrinsic innervation of the islets of Langerhans of *Rattus rattus rufescens* (Indian black rat). **Acta anat.**, **92**: 8 - 13, (1975).

QUIGLEY, J.P. & LOUCKES, H.: The effects of complete vagotomy on the pyloric sphincter and the gastric evacuation mechanism. **Gastroenterology**, **19**: 533 - 537, (1951).

RORSMAN, P. & TRUBE, G.: Calcium and delayed potassium currents in mouse pancreatic β -cell under voltage-clamp conditions. **J. Physiol.**, **347**: 531 - 550, (1985).

- RUSSEK, M. : Participation of hepatic glucoreceptors in control of intake of food. **Nature**, 197: 79 - 80, (1963).
- SAKAGUCHI, T. & YAMAGUCHI, K.: Effects of electrical stimulation of the hepatic vagus nerve on the plasma insulin concentration in the rat. **Brain Res.**, 164: 314 - 316, (1979).
- SANTOS, R.M. & ROJAS, E.: Muscarinic receptor modulation of glucose-induced electrical activity in mouse pancreatic B-cell. **FEBS Letters**, 249 (2): 411 - 417, (1989).
- SCOTT, A.M.; DAWSON, C.M. & GONÇALVES, A.A. : Comparison of glucose-induced changes in electrical activity, insulin release, lactate output and potassium permeability between normal and ob/ob mouse islets: effects of cooling. **J. Endocrinol.**, 107: 265 - 273, (1985).
- SEHLIN, J. & TÄLJEDAL, I.-B. : Glucose - induced decrease in Rb⁺ permeability in pancreatic beta-cell. **Nature**, 253: 635 - 636, (1975).
- & FREINKEL, N.: Biphasic modulation of K⁺ permeability in pancreatic islets during acute stimulation with glucose. **Diabetes**, 32: 820 - 824, (1983).
- SCHMIDT, R.E.; NELSON, J.S. & JOHNSON, E.M.: Experimental diabetic neuropathy. **The Am. J. Pathology**, 103: 210 - 225, (1981).
- SHIMAZU, T. : Glycogen synthetase activity in liver: regulation by the autonomic nerves. **Science**, 156: 1256 -1257, (1974).

SINGER, M. W.; NIEBEL, W. & LAYER, P. : Neural control of pancreatic secretion. **Z. Gastroenterol.**, **25**: 33 - 43, (1987).

SMITH, B. : Neuropathology of the oesophagus in diabetes mellitus. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, **37**: 1151 - 1154, (1974).

----- & PORTE, D. : Neuropharmacology of the pancreatic islets. **Ann. Rev. Pharmacol. and Toxicol.**, **16**: 269 - 285, (1976).

STIEVE, H. & HARTUNG, K.: Kinetics of $^{42}\text{K}^+$ and $^{86}\text{Rb}^+$ loss from the crayfish retina in the dark and the effects of light on the rate of isotope loss. **Biochem. Biophys. Acta**, **469**: 643 - 649, (1977).

STURGESS, N.C.; ASHFORD, M.L.J.; COOK, D.L. & HALES, C.N.: The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. **Lancet**, **8453**: 474 - 475, (1985).

THORENS, B.; CHARRON, M.J.; LODISH, H.F.: Molecular physiology of glucose transporters. **Diabetes Care**, **13**: 209 - 218, (1990).

TORDOFF, M.G. & NOVIN, D.: Celiac vagotomy attenuates the ingestive responses to epinephrine and hypertonic saline but not insulin, 2-deoxy-D-glucose or polyethylene glycol. **Physiol. and Behavior**, **29**: 605 - 613, (1982).

VERSPOHL, E.J.; TACKE, R.; MUTSCHLER, E. & LAMBRECHT, G.: Muscarinic receptor subtypes in rat pancreatic islets: binding and functional studies. **European J. Pharmacol.**, **178**: 303 - 311, (1990).

VIEIRA, S. : Introdução à Bioestatística. Editora Campus, Rio de Janeiro, (1991).

WYNGAARDEN, J.B. & SMITH Jr., L.H.: CECIL - Tratado de Medicina Interna, 16ª edição, vol. 1, p. 629. Ed. Guanabara, R.J. (1986).

WOLLEN, N, & BAYLEY, C.J. : Inhibition of hepatic gluconeogenesis by metformin. **Biochem. Pharmacol.**, **37: 4353 - 4358, (1988).**

WOLLHEIM, C.B.; SIEGEL, E.G. & SHARP, G.W.G. : Dependency of acetylcholine-induced insulin release on Ca^{++} uptake by rat pancreatic islets. **Endocrinology**, **107: 924 - 929, (1980).**

WOODS, S.C. & BERNSTEIN, I.L.: Cephalic insulin response as a test for the completeness of vagotomy to the pancreas. **Physiol. and Behavior**, **34: 485 - 488, (1980).**

XIE, H.; TSYBENKO, V.A.; JOHSON, M.V. & LAUTT, W.W. : Insulin resistance of glucose response produced by hepatic denervations. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **71: 175 - 178, (1993).**