

OBESIDADE HIPOTALÂMICA: A ATIVIDADE COLINESTERÁSICA DO PÂNCREAS

Eliana Campagnolo *
Ana Carla Marques da Silva **
Saldra Balbo **

Resumo

A pesquisa sugere que a obesidade hipotalâmica encontrada em ratos, tratados com glutamato monossódico, pode ser atribuída a um desarranjo do sistema nervoso autônomo, que afeta a secreção de insulina pelas células B pancreáticas, verificando, desse modo, se havia ou não modificação da atividade colinesterásica do pâncreas.

Abstract

The research suggests that the "Hypothalamic Obesity" found in rats, fed with monosodium glutamate, can be attached to a disarrangement of the autonomic nervous system, that affects the secretion of insulin by the "B" pancreatic celule, examining like that if there was or not modification of the colinesterasic pancreas activity.

Introdução

O objetivo deste trabalho foi verificar se ratos tratados com glutamato monossódico apresentavam modificação da atividade colinesterásica no pâncreas. Como parâmetro de obesidade, usou-se o Índice de Lee que é igual a: raiz cúbica do peso em gramas dividida pelo comprimento naso-anal em centímetros.

1. ASPECTOS GERAIS DO ESTUDO

O pâncreas é ao mesmo tempo uma glândula exócrina e endócrina. Trata-se de um órgão com função dupla. Funciona como dois órgãos distintos e conjugados numa única estrutura. A porção exócrina exerce função digestiva, e a endócrina, representada pelas ilhotas de Langerhans, secreta quatro tipos de hormônios: insulina, glucagon, polipeptídeo pancreático e somatostatina .

As ilhotas de Langerhans são grupos de células que perfazem 1% a 4% do volume do pâncreas. As células B são responsáveis pela produção e secreção de insulina, representando

* Docente da UNIPAR

** Pesquisadoras da UEM

70% das células que constituem as ilhotas. A insulina é um dos hormônios de grande interesse médico, cuja função primária é controlar o transporte da glicose da corrente sanguínea para o interior das células, onde é convertida em energia ou armazenada. Quando as células B são destruídas, ou sua função está alterada, a secreção de insulina perde seu controle. Dessa forma, o organismo começa a apresentar sinais fisiopatológicos, levando a uma condição que acomete 8% da população mundial, conhecida como DIABETES.

A glicose é o estimulador fisiológico mais importante da secreção de insulina. Quando há um aumento da taxa de glicose no sangue (glicemia), os mecanismos responsáveis pela secreção de insulina, entram em ação, aumentando o nível de insulina; e a glicose é captada pelas células periféricas. A secreção fica reduzida quando a glicemia diminui.

Além da glicose, inúmeros fatores, tais como: aminoácidos, concentração de íons, fluxo sanguíneo, fatores metabólicos, temperatura e neurotransmissores modulam a secreção de insulina.

Experiências demonstraram que animais portadores de lesões que afetaram o núcleo ventromedial do hipotálamo apresentavam obesidade e, minutos após a cirurgia, mostraram hiperinsulinemia (3), fato também observado em ratos da linhagem Zucker (11), com seis dias de vida e geneticamente obesos.

Nos modelos experimentais que desenvolvem obesidade hipotalâmica, observa-se uma hiperatividade do nervo vago. Em ratos com lesão no núcleo ventromedial do hipotálamo, seis dias após a cirurgia, observou-se incremento no peso do fígado, pâncreas e intestinos (7). No fígado observou-se uma acentuada proliferação celular. Essa e o aumento de peso dos órgãos foram revertidos pela vagotomia (8).

Em ratos da linhagem obesa Zucker, observou-se uma atividade acetilcolinesterásica no

cérebro, maior que a dos controles, principalmente na região hipotalâmica (5).

Ratos e camundongos recém-nascidos, tratados com glutamato monossódico, desenvolveram obesidade na vida adulta (10,1). Observações histológicas dos cérebros desses animais mostraram que havia lesão difusa no hipotálamo.

Esses dados sugerem que a obesidade hipotalâmica pode ser atribuída a um desarranjo no sistema nervoso autônomo, que afeta a secreção de insulina pelas células B pancreáticas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Nos experimentos foram usados ratos recém-nascidos, da linhagem Wistar, com peso médio de 6,5 g. Trabalhou-se com oito filhotes no grupo de controle e nove no de teste. Na primeira etapa do experimento, os ratos recém-nascidos, do grupo de teste, logo após o nascimento, receberam glutamato monossódico; e os do grupo de controle receberam solução salina 0,9%. Os filhotes foram tratados no Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá até o vigésimo primeiro dia. Os filhotes de cada grupo foram pesados juntos, até o sétimo dia de idade, razão pela qual utilizou-se o peso médio para as aplicações da solução.

Para cada grama de peso corporal, ocorreu uma aplicação intradérmica de 2 mg ou seja 0,1 ml de solução de glutamato monossódico a 12% na região cervical.

Após o vigésimo primeiro dia de idade, os ratos foram levados ao Biotério do Departamento de Biologia Celular e Genética, onde foram pesados individualmente, sempre no mesmo horário entre oito e oito e trinta horas da manhã. Aos quarenta e cinco dias de idade, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical; após a laparotomia e canulação do ducto biliar comum, o pâncreas foi preenchido com cerca de vinte a trinta ml de solução tampão fosfato 0,1 M (Molar), pH 7,4; em seguida, retirado e colocado em placa de

petri para limpeza, secagem em papel filtro e pesagem.

Tendo-se obtido o peso total do órgão, pesavam-se duzentos miligramas de tecido, homogeneizando-o manualmente. O homogeneizador era imerso em banho de gelo, numa concentração de quarenta miligramas de tecido por mililitro de sacarose 0,32 M durante o tempo necessário ao processo. Durante a homogeneização, a solução de sacarose diluída em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,0 foi mantida a uma temperatura de 4 °C. Os homogenatos foram, então, congelados a -20°C para posterior determinação da atividade colinesterásica (acetilcolinesterásica e butirilcolinesterásica). O procedimento usado foi o de recortar uma amostra do diafragma, secá-la em papel filtro, pesar entre oitenta e cem miligramas e homogeneizá-la, como descrito acima, tendo o cuidado de utilizar uma concentração de vinte miligramas de tecido por mililitro de tampão fosfato de sódio pH 8,0 mais sacarose 0,32 M. A determinação da atividade colinesterásica do pâncreas e do diafragma foi realizada de acordo com o método descrito por ELLMAN *et al.* (1961) (4).

Este método baseia-se na medida da velocidade de produção de tiocolina proveniente da hidrólise enzimática da acetiltiocolina e butirilcolina. A reação contínua da tiocolina formada com o ácido 5:5- ditiobis - 2 - nitrobenzóico (DTNB) libera o ânion amarelo 5-tio-2-nitrobenzoato, possibilitando a determinação da velocidade de produção de cor determinada em espectrofotômetro a 412 nm a 25°C.

Para a leitura das absorbâncias foram utilizados os seguintes reagentes:

Tampão fosfato de sódio ;
 Extrato homogeneizado;
 Ácido 5:5 ditiobis -2- nitrobenzóico (DTNB) 0,01 M;

Bicarbonato de sódio 1,78 uM (Micromolar);
 Acetiltiocolina - 0,075 uM .

Os reagentes foram adicionados na seguinte ordem:

1270 ul de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 8,0 foram retirados da geladeira e deixados em temperatura ambiente (25°C), e colocados em uma cubeta, onde foram adicionados 200 ul do extrato homogeneizado e levados ao interior do espectrofotômetro; a seguir adicionava-se; 50 ul de DTNB diluídos em tampão fosfato de sódio pH 7,0 em bicarbonato de sódio 1,78 uM, aguardavam-se dez minutos (tempo por nós determinado) para que a acetilcolina endógena degradada reagissem com o DTNB; após o que, adicionavam-se imediatamente 30 ul da solução de acetiltiocolina.

As leituras das absorbâncias foram realizadas em duplicatas, por dez minutos, em intervalos de um minuto.

Nesse ponto, o método foi por nós modificado no que se refere à concentração da acetiltiocolina, pois, uma vez que as leituras feitas em “pilotos” não foram satisfatórias, sugerimos que o substrato possivelmente deveria estar degradado, sendo necessário aumentar sua quantidade.

A atividade enzimática foi expressa através da velocidade de hidrólise calculada por:

$$R = \frac{\Delta A}{1,36 \cdot 10^{-4}} \times \frac{1}{(200/1550) C_0} = 5,699 \times 10^{-4} \times \frac{\Delta A}{C_0}$$

onde:

R = velocidade em nanomoles de substrato hidrolizado, por minuto, por miligrama de tecido.

ΔA = Variação de absorbância por minuto.

C_0 = Concentração original do tecido (mg/ml).

1,36.10 = coeficiente de extinção do ácido 5- tio-2 nitrobenzóico.

200/1550 = fator de diluição

A atividade colinesterásica foi expressa em manômoles de substrato acetilcolina (ASch) hidrolizado por minuto (unidades) : unidades por miligramas de pâncreas e miligramas de diafragma.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos permitiram observarem-se características diferentes no grupo de controle, GMS (ratos tratados com glutamato monossódico), como mostra a tabela 1. O peso corporal dos ratos foi significativamente reduzido ($p < 0.05$). Houve, no entanto, um acúmulo de tecido adiposo, que pôde ser observado quando os ratos foram sacrificados e expresso pelo índice de Lee, sendo $p < 0.001$.

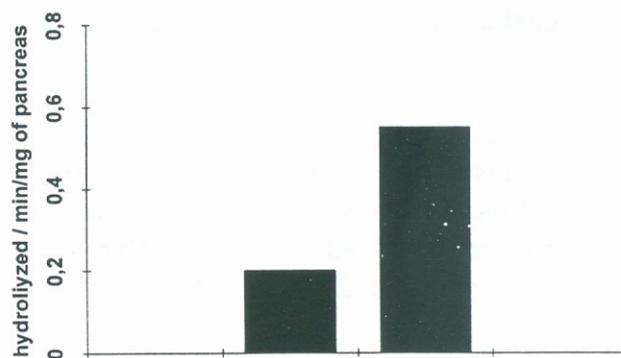
TABELA N.º 1

	CONTROLE	TESTES
Peso corporal (g)	173.25±23.113	108±12.806*
Índice de Lee	0.286±0.001	0.310±0.012***
Pâncreas (mg)	2807±651	1330±267*
Pâncreas (mg/100g)	1623±307	1251±311
Fígado (mg)	8590±915	5459±881*
Fígado (mg/100)	4981±337	5068±641
Coração (mg)	722.7±65147	447±46.792*
Coração (mg/100g)	419.168±28.995	419±73.821

Efeito do tratamento por glutamato monossódico sobre peso corporal, índice de Lee, peso de fígado, pâncreas e coração.

Os valores representam a média desvio padrão de 5 animais-teste, e 4 controle.

* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$



O peso absoluto dos órgãos analisados também foi menor no grupo GMS, ao nível de 0.05 de significância, comparado ao de controle. Porém, quando esses pesos são relativizados por 100 g de peso corporal, não há diferenças. Talvez isso se deva às idades diferentes dos ratos. No caso, tratava-se de ratos adultos, com 45 dias de vida.

A atividade colinesterásica pancreática total foi superior em GMS : 0.454 ± 0.139 manômoles de sACh hidrolizado/min/mg de pâncreas a do Controle: 0.199 ± 0.09 nmoles de sACh hidrolizado/ minuto /mg de pâncreas. Esta diferença foi da ordem de 2.3 vezes.

A atividade diafragmática total também foi diferente nos dois grupos, sendo maior em GMS: 1.002 ± 0.185 manômoles de sACh hidrolizado/min/mg de diafragma que no controle: 0.665 ± 0.040 . Nota-se, entretanto, um aumento consideravelmente maior em relação ao pancreático. Quando se analisou a atividade específica em ambos os tecidos, (tabela 1), só houve diferença significativa entre os grupos a nível pancreático.

Conclusão

Esses resultados, embora preliminares, indicam que possivelmente o tônus parassimpático pancreático nos ratos, tratados com glutamato monossódico, esteja aumentado, o que pode levar a alterações na regulação de insulina e no próprio estabelecimento da obesidade.

Bibliografia

1. ARENDT, T.; REHORK, A.; MILLER, F. **Assessment of cold induced alterations in catecholamines turnover in lean and glutamate-treated obese rats.** *Exp. Clin. Endocrinol.*, 98:200-211, 1991
2. CAMPFIELD, L. A.; BLOQKER, C. D. **Simulation of the autonomic neural control of insulin secretion.** *Comp. Biol. Med.*9:191-213, 1979.
3. CAMPFIELD, L. A.; SMITH, F. J. **Alteration of islet neurotransmitter sensitivity following ventromedial hypothalamic lesion.** *Am. J. Physiol.*, 244:R635-640, 1993.
4. ELLMAN, G. L.; COURTNEY, D.; ANDRESS, V. Jr.; FEATHERSTONE, R. M. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** *Biochem. Pharmacol.*, 7:88-95, 1961.
5. GOODAN, C. B.; SOLIMAN, K. S. A. **Alteraty brain cholinergic enzymes activity in the genetically obese rat.** *Experientia*, 47:833-835, 1991.
6. HOLZWORTH-McBRIDE, M. A.; SLADEK, J. R.; KNIGGE, K. M. **Monossodium glutamate-induced lesions of the arcuate nucleus.** Fluorescence histochemistry of the catecholamines. *Anat. Res.*, 186:197-206, 1976.
7. KIBA, T.; TANAKA, K.; INOUE, S.; ENDO, O.; TAKAMURA, Y. **Comparasion of contents of visceral organs in rats with ventromedial hypothalamic lesions and fed a high fat diet.** *Neurosc. Letters*, 120:127-130, 1991
8. KIBA, T.; TANAKA, K.; INOUE, S.; ENDO, O. **Role of the vagus nerve in increased DNA synthesis after hypothalamic lesions in rat liver.** *Am. J. Physiol.*, 262 (Gastrointes. Liver Physiol. 25): G483-487, 1992.
9. NASCIMENTO, Curi, C. M. O.; MARMO, M. R.; EGAMI, M.; RIBEIRO, K. B.; ANDRADE, E. S.; DOLNIKOFF, M. S. **Effect of Monossodium Glutamate treatment on lipogeneses rate and lipoprotein lipase activity in adults rats.** *Biochem. International*, 24:927-935, 1991.
10. OLNEY, J. W. **Excitotoxic aminoacids: Research applications and safety implications. Glutamic Acid.** *Advances in Biochemistry and Physiology.* New York : Raven Press 287-320, 1979.
11. ROHER-JEANRENAUD, F.; HOCHSTRASSER, A. C.; JEANRENAUD, B. **Hyperinsulinemia of preobese and obese fa/fa rats is partly vagus nerve mediate.** *Am. J. Physiol.*244 (Endocrinol. Met. 7): E317-322, 1983.