



CARLOS ALBERTO DA SILVA

TIOPENTAL BLOQUEIA PREFERENCIALMENTE OS CANAIS DE POTASSIO
MODULADOS PELO ATP, NAS CELULAS BETA PANCREATICAS

Este exemplar corresponde a redação final da tese
defendida pelo candidato Carlos Alberto da Silva e
aprovada pelo Conselho Titulador

17/08/90

Boschero

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
Campinas, para obtenção do título
de MESTRE em Ciências Biológicas,
área de Fisiologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero

CAMPINAS - SÃO PAULO

-1990-

Si38t

12334/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Dedicado a

Meu pai Arnaldo, pelos princípios
norTEAM sua vida;

Minha mãe Idalina, pela delicadeza
com que sempre orientou seus filhos;

Meu irmão Paulo Cesar, pelo
incentivo constante e determinação que deixa
transparecer;

A minha noiva Valéria, pela
compreensão e paciência, tornando tudo
significativo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. ANTONIO CARLOS BOSCHERO, pela amizade, orientação, compreensão e ensinamentos constantes.

Ao Prof. Dr. ANTONIO ARI GONÇALVES, pela colaboração e oportunidade de minha iniciação à Fisiologia.

Ao Prof. EVERARDO MAGALHAES CARNEIRO, pela valiosa colaboração na execução deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela colaboração direta na minha formação.

Ao Prof. Dr. GILBERTO A. FERNANDES, pelas sugestões apresentadas durante o exame pré-banca.

Aos colegas Mestrandos, pela amizade e convivência.

Ao Prof. EDUARDO KOKUBUN, pela orientação quanto aos métodos estatísticos.

A Seta. MARIA ELIDIA DOS SANTOS, pela enorme colaboração e préstimos quanto aos serviços de digitação.

Ao Sr. LESCIO DOMINGOS TEIXEIRA e Sra. APARECIDA DA SILVA GERALDO, pela ajuda nos experimentos.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela atenção e ajuda.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP, pelo auxílio financeiro.

A todos que nos incentivaram, mas que involuntariamente omitimos seus nomes,

muito obrigado.

ABREVIATURAS EMPREGADAS

ATP	-	Adenosinatrifosfato
ADP	-	Adenosinabifosfato
EGTA	-	Etilenoglicol-bis (éter B-Amoetil) N, N - ácido tetraacético
TEA	-	Tetraetilamonia
CCCP	-	Triclorofenilhidrozona Carbonilciamida
FCCP	-	Trifluorfenilhidrozona Carbonilciamida

I N D I C E

INTRODUCAO	01
- Canal de K ⁺ ativado pelo Ca ²⁺ (nao seletivo)	02
- Canal de K ⁺ ativado pelo Ca ²⁺ (seletivo)	03
- Canal de K ⁺ modulado pelo ATP	04
- Sulfonilureias	05
- Barbituricos	07
- Objetivos	11
MATERIAIS E METODOS	12
- Animais	12
- Isolamento das ilhotas	12
- Marcacao das ilhotas de Langerhans com ⁸⁶ Rb	14
- Tempo de perfusao	15
- Radioisotopos e reagentes	15
- Solucoes	16
- Tratamento estatistico	17
RESULTADOS	19
DISCUSSAO	26
RESUMO E CONCLUSOES	33
SUMMARY	35
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	37
APENDICE	

INTRODUÇÃO

A secreção de insulina por ilhotas pancreáticas pode ser regulada por inúmeros fatores tais como: hormônios, íons, aminoácidos, cofatores metabólicos e vários fármacos (Malaïsse et alii, 1980; Malaïsse et alii, 1981; Malaïsse-Lagae e Malaïsse, 1982; Cook e Ikeuchi, 1989; Panten et alii, 1989).

O processo secretório, induzido pela glicose e/ou outros nutrientes, de maneira geral apresenta como um dos eventos iniciais a redução da condutância ao K^+ , com consequente acúmulo deste cation nas células B pancreáticas. Esse acúmulo de cargas positivas leva à despolarização da membrana, ativação de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem e finalmente ativação do sistema secretor (Sehlin, e Taljedal, 1975; Boscherio et alii, 1977; Henquin, 1978).

Com o aprimoramento das técnicas de registro e em especial com o surgimento do "Patch-Clamp" (Hamil et alii, 1981), foi possível a discriminação de tres classes de canais de K^+ nas células B, assim denominados: canal de K^+ dependente de Ca^{2+} e não seletivo, canal de K^+ dependente de Ca^{2+} e seletivo, e o canal de K^+ modulado pelo ATP (Colquhoun et alii, 1981; Cook et alii, 1984; Findlay et alii, 1985; Keizer e Magnus, 1989).

CANAL DE K⁺ ATIVADO PELO Ca²⁺ NAO SELETIVO

Sua verificação foi primeiramente relatada nos estudos de células cardíacas de rato sob cultura (Colquhoun et alii, 1981) e posteriormente tem sido constatado em diversas estruturas como neuroblastomas (Yellen, 1982), células acinares pancreáticas (Petersen, e Maruyama, 1984), glândulas salivares (Maruyama et alii, 1983), e glândulas lacrimais (Marty et alii, 1984).

A característica marcante deste canal é que a sua condutância apresenta-se independente do potencial de membrana, não discriminando entre os íons Na⁺ e K⁺ (Maruyama et alii, 1982). Nas células B pancreáticas, sua presença foi caracterizado por Marty e Neher (1982) os quais propuseram que o Ca²⁺, necessário para ativação desses canais, provem preferencialmente de compartimentos intracelulares. Contudo a redução de concentração do Ca²⁺ extracelular, pela quelatação com EGTA, induziu desaparecimento dessa condutância ao K⁺. A mesma reapareceu com a reintrodução do Ca²⁺ no meio (Petersen e Maruyama, 1984).

CANAL DE K⁺ ATIVADO PELO Ca²⁺ (SELETIVO)

Marty (1981), relatou a existência desta classe de

canais de K^+ em células cromafins da adrenal. A partir desta comprovação tem sido relatado sua existência em diversas estruturas como: músculo (Barret et alii, 1982), epitélio (Maruyama et alii, 1983), tecido exócrino (Maruyama, 1983); rins (Hunter et alii, 1984) células intestinais (Morris et alii, 1986), hipófise (Wong, et alii, 1982) e ilhotas pancreáticas (Cook, 1984; Findlay, 1985).

Esses canais são de alta condutância, aproximadamente de 250 pS, estando sob controle das alterações do potencial de membrana. Nesse sentido a probabilidade de abertura é maior com a célula despolarizada mesmo na ausência de Ca^{2+} intracelular (Petersen, Maruyama, 1984). Sua sensibilidade a concentração de Ca^{2+} intracelular é variável de acordo com o tecido estudado. Nas células B pancreáticas a sensibilidade desses canais apresenta-se intermediária sendo maior que no tecido acinar e menor que no tecido muscular (Latorre e Miller, 1983; Petersen e Maruyama, 1984; Petersen et alii, 1985).

A condutância deste canal de K^+ indica também ser controlada pelo pH. Assim, a mesma pode ser reduzida pela acidose e, aumentada pela alcalose (Cook et alii, 1984). O canal de K^+ dependente de Ca^{2+} também pode apresentar alterações induzidas por fármacos. Dentre estes a TEA mostrou ser altamente específica e, bloqueadora efetiva do canal de K^+ quando aplicado na face externo da membrana em baixas concentrações ($< 5mM$) (Findlay et alii, 1985; Iwatsuki, Petersen, 1985).

CANAL DE K⁺ MODULADO PELO ATP

Em 1983, Noma, estudando células cardíacas descreveu uma classe de canais de K⁺ modulável de maneira dose-dependente pelo ATP. Posteriormente este canal de K⁺ foi registrado em diferentes estruturas, tais como: fibras musculares (Spruce et alii, 1985); células B pancreáticas e linhagens de células secretoras de insulina (Cook e Hales, 1984; Ashcroft et alii, 1984; Misler et alii, 1986; Rorsman e Trube, 1985; Ashcroft, 1988).

Nas células B, esta classe de canal apresenta-se em maior número que os canais de K⁺ sensíveis ao Ca²⁺, com uma condutância unitária de 20 pS (Petersen e Findlay, 1987). Uma vez que a concentração citoplasmática de ATP nas células B aumenta na presença de glicose, (Ashcroft et alii, 1984), e considerando-se, ainda, que a atividade deste canal esta associada com o metabolismo do referido secretagogo, sugere-se fortemente que este canal possa ter a função de sensor metabólico para a liberação de insulina (Rinzel et alii, 1987).

Com a aplicação de concentrações fisiológicas de ADP em células beta, diversos grupos constataram o restabelecimento da atividade do canal (Kakei et alii, 1986; Dunne e Petersen, 1986; Ribalet e Ciani, 1987; Dunne et alii, 1988) sugerindo que a relação ATP/ADP exerce uma ação moduladora da atividade do mesmo (Misler et alii, 1986; .

Keizer; 1988; Dunne et alii, 1988). Também como um regulador desse canal tem sido sugerido a participação da adenosina, GTP, proteína quinase C, bem como dos nucleotídeos de piridina, porque nos leva a deduzir que a regulação dessa permeabilidade é multifatorial envolvendo vários componentes citoplasmáticos (Ohno-Shasaku; Zunkler; Trube; 1987; Mislner, S. et alii, 1986; Kakei, et alii, 1986; Dunne e Petersen, 1986).

Na célula B, a glicólise e a fosforilação oxidativa estão envolvidos na produção de ATP (Malaisse et alii, 1983). A partir de tal constatação sugeriu-se que provavelmente a modulação da atividade do canal é dependente da produção de ATP pelas mitocôndrias. Para tal comprovação usou-se desacopladores de fosforilação oxidativa (FCCP, CCCP), demonstrando-se que tais agentes, diminuindo a relação ATP/ADP citosólica estimularam o canal de K⁺ modulado pelo ATP (Mislner et alii, 1986).

SULFONILURÉIAS

Pacientes diabéticos não dependentes de insulina utilizam sulfoniluréias como agentes hipoglicemiantes (Loubatières, 1942). O estudo do mecanismo de ação de tais fármacos, tem despertado interesse em diversos pesquisadores.

Boschero e Malaisse (1979), analisando o efluxo do ^{86}Rb (radioisótopo traçador do K^+) de ilhotas isoladas e perfundidas na ausência de glicose, demonstraram que a tolbutamida provocou uma rápida e reversível diminuição no efluxo do radioisótopo.

Coincidentemente, tais agentes mimetizam a ação da glicose que também interfere na condutância dos canais de K^+ presentes na membrana das células B. Sua capacidade insulínica tem sido amplamente relatada na literatura (Helman et alii 1984, Malaisse et alii, 1983).

Os estudos relativos ao sítio de ação das sulfonilurêias tem revelado que tais fármacos bloqueiam especificamente os canais de K^+ modulados pelo ATP (Trube et alii, 1986; Sturgess et alii, 1985; Trube et alii, 1986), não afetando todavia os canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} (Cook et alii, 1984; Sturgess et alii., 1986).

Estudos de "Patch-Clamp", demonstraram que a tolbutamida exerce efeito bloqueador do canal de K^+ em ambas as faces da membrana, porém o sítio de ação mais efetivo localiza-se na face interna da mesma (Sturgess et alii, 1985; Ashford et alii, 1986; Trube et alii, 1986).

Uma análise mais aprimorada tem revelado a existência de uma hierarquia entre as sulfonilurêias sendo o mais potente bloqueador a glibenclâmida, a qual exerce um efeito cem vezes maior que a tolbutamida (Zunkler et alii, 1988). Como esperado, constatou-se também que a ação insulínica de tais agentes desaparece na ausência de

Ca^{2+} extracelular (Drazmin, B. et alii, 1987).

Deleers e cols., 1984, demonstraram que as sulfoniluréias causam a redução do pH citosólico, efeito oposto ao da glicose. Recentes estudos constatarem a ação das sulfoniluréias, também, sobre os canais de K^{+} moduláveis pelo ATP presentes no tecido cardíaco (Gee e Misler, 1987; Belles et alii, 1987).

Por outro lado, algumas sulfoniluréias como a diazoxida atuam nas células β pancreática como inibidoras da secreção de insulina. A diazoxida a exemplo da tolbutamida, também atua como modulador da atividade do canal de K^{+} modulado pelo ATP, porém ao contrário da tolbutamida promove a abertura do mesmo (Trube, 1986; Zunkler et alii, 1988). Consequentemente a diazoxida diminui a concentração citosólica de Ca^{2+} nas células β , quando estas são expostas a glicose (Arkhammar et alii, 1987).

BARBITURICOS

Surgido na Alemanha em 1903, sendo sintetizado por Fisher e Von Mering, o barbitol foi o primeiro barbitúrico usado na clínica como anestésico.

Os barbitúricos são uréias cíclicas, com a estrutura básica do ácido barbitúrico. Da combinação ácido malônico com a tiouréia, resulta uma série de compostos chamados

tiobarbitúricos, os quais diferem dos demais, por apresentarem um átomo de enxofre substituindo o oxigênio na posição C2. Os derivados da uréia, se denominam oxibarbitúricos existindo uma interrelação entre a estrutura química e a atividade farmacológica, podendo-se considerar que a substituição do H+ pelo carbono assume atividade hipnótica, e de acordo com os radicais as propriedades das drogas variam. A substituição de O2 pelo enxofre, confere ao tiobarbiturato uma ação ultra-curta, grande capacidade de deposição no tecido adiposo, além de alto custo energético pela metabolização hepática. Como exemplo desta classe temos o tiopental (Zanini e Oga, 1985).

Os barbitúricos são depressores gerais e inespecíficos do sistema nervoso, sendo o S.N.C. particularmente sensível aos mesmos, as regiões que apresentam a maior sensibilidade são o córtex, substância reticular, bulbo, centro respiratório, atuando de maneira importante também nas sinapses nervosas e neuroefetoras, tanto centrais como periféricas (Corbett, C.E., 1987).

Estudos eletrofisiológicos demonstraram que os barbitúricos apresentam ações como:

a) aumentam o período refratário da célula e o limiar de excitabilidade das membranas pré e pós sinápticas.

b) Deprimem os neurônios e sinapses da formação reticular ascendente do tronco cerebral.

c) Apresentam ação anticonvulsiva, causando aumento do limiar da resposta à estimulação em algumas zonas do

S.N.C., resultando em depressão da intensidade das pós-descargas reverberantes (Goodman e Gilman, 1975).

Diversos pesquisadores demonstraram que no axônio gigante da lula, os barbitúricos exercem uma ação bloqueadora na condutância ao K^+ (Blaustein, 1968; Schwartz, 1979). Através desta ação bloqueadora foi possível explicar os efeitos excitatórios provocados por tais anestésicos no sistema nervoso.

Sevcik (1980), demonstrou que o tiopental tem alta afinidade pelos canais de K^+ presentes na membrana de axônios gigantes de lula, estando a membrana em repouso ou despolarizada. Tal barbiturato provoca uma redução na condutância ao K^+ , sendo que, as despolarizações observadas são dose-dependentes. O mesmo autor demonstrou que o tiopental exerce seu efeito sobre a permeabilidade ao K^+ , não dependente de voltagem.

Arhem & Kristbjarnarson (1981), estudando o efeito do tiopental sobre a permeabilidade ao K^+ em fibras mielinizadas de sapo confirmaram os resultados anteriores apresentados por Sevcik (1980).

Ho e Harris (1981), sugeriram uma possível ação dos barbitúricos sobre o fluxo de Ca^{2+} no terminal pré-sináptico nervoso, interferindo no processo secretório de neurotransmissores. Tal mecanismo de ação foi constatada em sinaptossomas cerebrais e gânglios autônomos (Blaustein, 1976; Friedman, et alii, 1979).

Recentemente, Dias (1984), estudando o efluxo do

^{86}Rb de ilhotas pancreáticas isoladas de rato demonstrou que o tiopental reduziu significativamente o efluxo do ^{86}Rb o resultando no aumento da secreção de insulina induzida por 6.0mM de glicose. Ainda demonstrou que tal efeito é revertido com a retirada de barbitúrico do meio de perfusão. O efeito do tiopental sobre o efluxo do ^{86}Rb mostrou ser aditivo em relação ao efeito da glicose uma vez que em presença de 16.7 mM de glicose a redução do efluxo do referido isótopo induzido pelo tiopental foi menor (Boschero, et alii, 1985).

Tendo em vista os resultados acima apresentados, conclui-se que o tiopental atua nos ionóforos do K^+ presentes na membrana das células β , provavelmente numa permeabilidade ao K^+ , não sensível a voltagem (Langone, 1986).

OBJETIVOS

O presente trabalho considera que as células β

possuem tres permeabilidades distintas ao K^+ na sua membrana plasmática. Duas dessas permeabilidades são específicas a saber: uma regulável pela relação ATP/ADP e outra pela concentração do Ca^{2+} intracelular e/ou potencial de membrana. Considerando-se que o tiopental reduz a permeabilidade ao K^+ em vários tecidos e em especial nas ilhotas de Langerhans, nosso objetivo foi o de discriminar sobre qual destas permeabilidades o referido anestésico atua.

MATERIAIS E METODOS

ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados ratos albinos Wistar, de ambos os sexos, de 3 a 6 meses de idade, pesando entre 150 e 300 gramas os quais eram procedentes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram mantidos em ciclo fotoperiódico de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, sendo alimentados com ração balanceada (Labina/Fabric. Purina), própria para roedores e água "ad libitum".

ISOLAMENTO DAS ILHOTAS :

Utilizou-se a técnica da colagenase, descrita por Moskalewski (1965), modificada por Lacy & Kostianovsky (1967), e adaptada posteriormente por Boscherio, Delattre e Santos (1980).

Os animais foram sacrificados por concussão cerebral, decapitados e laparatomizados para localização do

ducto biliar comum. Este ducto foi ocluído na extremidade distal, próximo ao duodeno e canulado na porção próxima ao hilo hepático. Uma cânula de polietileno de diâmetro 0.965 mm (pe50), foi introduzida no ducto através do qual injetou-se de 10 a 20 ml de solução de Hanks enriquecida com glicose, que fluindo retrogradamente através dos ductos pancreáticos, provocou a divulsão do tecido acinoso. O pâncreas foi retirado e procedeu-se a extração dos nódulos linfáticos e da gordura. Concluída a limpeza do tecido pancreático, este foi transferido para um becker de 20 ml, sendo reduzido a fragmentos de aproximadamente 0.5 mm com o auxílio de uma tesoura.

Os fragmentos de 4 pâncreas foram acondicionados em tubos de ensaio (12 x 1.5 cm), contendo de 12 a 14 mg de colagenase, sendo a seguir incubados em banho maria a 37 °C durante 12 minutos, de forma que nos 10 minutos iniciais o conteúdo foi agitado intensamente por borbulhamento com Carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂), seguido de agitação manual nos 2 minutos restantes.

Terminada a digestão o material foi lavado quatro vezes com solução de Hanks. Essas lavagens sucessivas serviram para diluir a solução enzimática paralisando dessa forma a digestão; com decantações entre uma lavagem e outra foi possível eliminar grande parte do tecido exócrino facilitando a coleta das ilhotas.

O produto final foi transferido para placas de Petri, e as ilhotas coletadas sob lupa, com o auxílio de uma

pipeta Pasteur, siliconizada e previamente estirada em bico de Bunsen.

MARCAÇÃO DAS ILHOTAS DE LANGERHANS COM ^{86}Rb

Grupos de 80 a 150 ilhotas foram coletadas e distribuídas em 2 tubos de ensaio 5 x 1 cm. O sobrenadante foi descartado e adicionado 90 μl de solução de Hanks mais 10 μl de uma solução de ^{86}Rb em cada tubo.

Após a adição de radioisótopo, os tubos foram colocados dentro de câmaras de vidro e incubados durante 90 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$, sendo o pH (7.4), equilibrado durante os 10 minutos iniciais com carbogênio.

Após a incubação, as ilhotas foram devidamente lavadas 3 vezes com solução de Hanks não radioativa, e transferidas para uma câmara de perfusão (0.3 ml), a qual era forrada com um filtro de acetato de celulose com poros de diâmetro na ordem de 8 μm .

A partir do momento em que as ilhotas já estavam nas câmaras, estas foram conectadas a dois recipientes contendo as soluções nutritivas, mantidas a 37 $^{\circ}\text{C}$ e sob gaseamento contínuo de carbogênio para manutenção de pH em 7.4, dando-se início a perfusão.

O meio percorreu o sistema na razão de 0.8 ml/min, impelido por bomba peristáltica (Holter pump S - 900

Extracorporeal Med. Spec. Inc., King Prussia, Pa.).

TEMPO DE PERFUSÃO

O tempo de perfusão totalizou 80 min, sendo que os primeiros 20 minutos, serviram como período de adaptação das ilhotas ao sistema perfusor. A solução nutritiva perfusora foi drenada do 1º reservatório do início da perfusão até o 40º minuto, do segundo reservatório, do 40º ao 60º minuto, e novamente do primeiro recipiente de 60º ao 80º minuto, quando encerrou-se a perfusão.

A coleta das amostras teve início no 20º minuto, em intervalos regulares de dois minutos e a radioatividade de cada frasco foi avaliada em contador de radiação beta Beckman usando-se para isso o efeito Cerenkov.

Os resultados dos experimentos serão expressos em termos da taxa fracional de efluxo do ^{86}Rb (%/min)

RADIOISÓTOPOS E REAGENTES

Todos os sais utilizados, bem como a glicose e demais substâncias adicionadas ao meio de isolamento e/ou incubação, possuíam grau analítico de pureza (P.A.), albumina bovina fração V, colagenase, dimetilsulfoxida,

diazoxida, tetraetilamônia, tolbutamida, E.G.T.A., foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, M.O. Tiopental foi gentilmente cedido por Dr. Ronaldo Tizziani, CRMV-4,2692 O ^{86}Rb e os frascos para contagem de radiação utilizados foram da New England Nuclear, Corp. (Boston, Mo). Filtro de acetato de celulose foi da Millipore Corp. (Bedford, Mass.).

SOLUÇÕES

SOLUÇÃO DE HANKS

Utilizamos para o isolamento das ilhotas de Langerhans a solução salina descrita por HANKS & WALLACE (1949).

FORMULA:

NaCl	8.000g
KCl	0.400g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.185g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0.200g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0.060g
KH ₂ PO ₄	0.060g
NaHCO ₃	0.350g
H ₂ O deionizada	1000 ml

Adicionamos 0.5 g/l de glicose momentos antes do uso.

SOLUÇÃO DE KREBS

Solução I)	NaCl	(0.460 M)		13.4430g
Solução II)	Na HCO ₃	(0.096 M)		4.0325g
	KCl	(0.020 M)		0.7456g
	MgCl ₂ 6H ₂ O	(0.004 M)		0.4067g
Solução III)	CaCl ₂ 2H ₂ O	(0.004 M)		0.29405g

A confecção da solução final obedece a composição a seguir:

- 1 vol.sol. I
- 1 vol.sol. II
- 1 vol.sol. III :
- 1 vol.H₂O

TRATAMENTO ESTATISTICO

A variação do efluxo de ⁸⁶Rb, foi avaliada calculando-se para cada experimento a diferença entre valores registrados após a alteração da condição experimental (minuto 40), e os valores esperados, calculados

pela extrapolação da curva exponencial, dos valores obtidos antes do procedimento experimental (minutos 320 e 400), como descrito por Boschero e Malaisse, (1979). Tabelas sobre estes valores são dadas no apêndice.

A significância estatística foi avaliada pela aplicação de teste "t" de Student admitindo-se como significativos os valores de $P < 5\%$. Os resultados serão expressos como médias e seus respectivos erros padrões.

Alguns experimentos, nos quais as condições experimentais não foram alteradas desde o 1º ao último minuto da perfusão, foram executados para controle. Nesse caso, o efluxo permaneceu constante e, os cálculos executados para os minutos indicados nas tabelas (vide apêndice), não foram estatisticamente diferentes daqueles obtidos pela extrapolação como explicado acima. Por isso esses experimentos controles foram omitidos dos resultados.

RESULTADOS

EFEITO DA GLICOSE E DO TIOPENTAL SOBRE O EFLUXO DO ^{86}Rb , EM PRESENÇA DE TOLBUTAMIDA

A figura 1A e a tabela 1 mostram o efeito da glicose (2.8 mM) sobre o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas perfundidas na presença de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tolbutamida. A média do efluxo, medida nos 10 minutos que precederam a introdução da glicose no meio, foi de $2.2 \pm 0.06\%$ min. A glicose 2.8 mM, presente durante o período de 400 a 600 min, reduziu significativamente o efluxo do ^{86}Rb para $1.6 \pm 0.09\%$ min (valor médio para os minutos 500 a 600). Este efeito da glicose sobre o efluxo do ^{86}Rb foi reversível pois, com a sua retirada do meio perfusor no 600 min, os valores do efluxo voltaram a níveis semelhantes à primeira fase.

A figura 1B ilustra o efeito do tiopental (2 mM) sobre o efluxo do ^{86}Rb em presença de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tolbutamida e 2.8 mM de glicose. Nota-se que, após a introdução do tiopental no meio, no intervalo de tempo de 40

a 60 min, o efluxo foi reduzido de $1.8 \pm 0.07\%$ min (minutos 30 a 40) para $1.2 \pm 0.05\%$ min (minutos 50 a 60), sendo este efeito rapidamente revertido após a retirada da droga do meio perfusor. Demonstrou-se que a capacidade do tiopental em reduzir o efluxo do ^{86}Rb , mesmo na presença de glicose e tolbutamida, foi fortemente evidenciada após a retirada da droga do meio (min 60) apresentando maior significância a partir do 64º minuto de perfusão. Nesta condição o efluxo passou de $1.2 \pm 0.05\%$ min para $1.9 \pm 0.08\%$ min (tabela 2).

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TOLBUTAMIDA E TIOPENTAL SOBRE O EFLUXO DO ^{86}Rb , NA AUSÊNCIA DE GLICOSE

A figura 2A e a tabela 3 mostram o efeito do barbiturato tiopental (0.2 mM) sobre o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas perfundidas na presença de 20 $\mu\text{g/ml}$ de tolbutamida. Nota-se que nos 10 minutos prévios a introdução do anestésico no meio, a média do efluxo foi de $1.9 \pm 0.05\%$ min. Na presença do barbiturato (minutos 40º a 60º) foi verificada redução significativa a partir do 52º min da perfusão, quando o efluxo atingiu em média $1.3 \pm 0.09\%$ min (min 50º e 60º) da perfusão (tabela 3). Após a retirada do tiopental do meio (min 60º) o efluxo voltou rapidamente a

níveis semelhantes a primeira fase.

Quando a concentração do tiopental foi elevada de 0.2mM para 2mM (figura 2B e tabela 4) o efluxo do ^{86}Rb foi reduzido significativamente de $1.6 \pm 0.03\%$ min para $0.9 \pm 0.03\%$ min.

Com a elevação da concentração da tolbutamida para 100 $\mu\text{g/ml}$ (figura 2C e tabela 5), o tiopental (2mM) ainda mostrou-se efetivo em reduzir o efluxo do ^{86}Rb . Contudo, seu efeito foi semelhante aquele obtido com 0.2 mM, em presença de 20 $\mu\text{g/ml}$ de tolbutamida (figura 2A).

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DIAZOXIDA E TIOPENTAL SOBRE O EFLUXO DO ^{86}Rb

Na figura 3A observamos que a introdução do tiopental (0.2 mM, triangulos), no meio perfusor contendo 20 $\mu\text{g/ml}$ de diazoxida induziu uma drástica redução no efluxo do ^{86}Rb de $3.0\% \pm 0.09\%$ min na primeira fase para $1.7 \pm 0.05\%$ min na fase intermediária. O efeito do anestésico foi significativamente maior quando sua concentração foi elevada para 2mM (circulos) (tabelas 6 e 7). Nesta condição o efluxo do ^{86}Rb caiu de $3.1 \pm 0.02\%$ min para $1.1 \pm 0.02\%$ min. A ação inibitória do tiopental sobre o efluxo do ^{86}Rb foi atenuada quando a concentração da diazoxida foi elevada para 100 $\mu\text{g/ml}$ (figura 3B e tabela 8). Confirmando padrão de

resposta obtidos nos experimentos anteriores, o efeito do tiopental manifesta-se rapidamente, sendo imediatamente revertido com a sua retirada do meio.

EFEITO DA TEOFILINA E TIOPENTAL SOBRE O EFLUXO DO ^{86}Rb NA PRESENÇA DE GLICOSE

Na figura 4A, demonstramos que a introdução de 10 mM de teofilina ao meio perfusor, contendo 8.3 mM de glicose, induziu um aumento significativo no efluxo do ^{86}Rb de níveis $1.0 \pm 0.02\%$ min na fase inicial de perfusão para $1.5 \pm 0.02\%$ min durante os 310 a 440 minutos da perfusão (tabela 9). A adição de 2mM de tiopental associado a teofilina 10mM (figura 4B) atenuou, porém, não inibiu completamente o aumento do efluxo de ^{86}Rb induzido pela teofilina, sendo verificada uma significância estatística no intervalo referente ao 33.5 e 34.5 minutos (tabela 10).

EFEITO DO TIOPENTAL SOBRE O EFLUXO DO ^{86}Rb NA PRESENÇA DE TEA

Na figura 6 e tabela 12 observamos que a introdução

de 2 mM de tiopental (minuto 40), no meio perfusor contendo 20mM de TEA (substância que bloqueia a PK (Ca)ⁱ e Vm dependentes), induziu uma redução rápida e altamente significativa no efluxo do ⁸⁶Rb. Este passou de 3.1 +/- 0.08% min na fase inicial da perfusão, para 1.4 +/- 0.1% min na presença do anestésico. A reversibilidade do tiopental ficou evidente quando da análise da retirada da droga do meio (min 60), nesta fase o efluxo voltou a aumentar gradativamente até atingir valores semelhantes a 1ª fase.

EFEITO DO TIOPENTAL SOBRE O EFLUXO DO ⁸⁶Rb, NA PRESENÇA DE K⁺ 50 mM.

A figura 5 demonstra que o barbiturato tiopental (2mM) foi capaz de reduzir o efluxo do ⁸⁶Rb de ilhotas despolarizadas por 50 mM de K⁺. Nota-se que nos 10 minutos prévios a introdução do anestésico no meio, a média do efluxo foi de 2.5 +/- 0.11% min, sendo que na presença do barbiturato o efluxo foi reduzido para 1.4 +/- 0.1% min. A comparação entre os valores observados com os valores esperados, indicou diferenças significativas a partir do 44º minuto da perfusão como demonstra a tabela 11. Com a retirada da droga no minuto 60, o efluxo voltou a aumentar assumindo valores médios de 2.4 +/- 0.03% min e, com isto,

restabelecendo valores similares a situação anterior a presença do barbitúrico.

EFEITO DO TIOPENTAL SOBRE O EFLUXO DO ^{86}Rb , DE ILHOTAS PERFUNDIDAS NA PRESENÇA DE TOLBUTAMIDA E TEA, E NA AUSÊNCIA DE CÁLCIO E GLICOSE

Na figura 7 e tabela 13 podemos observar que na ausência extracelular de Ca^{2+} e glicose e na presença de 20 mM de TEA mais 20 $\mu\text{g/ml}$ de tolbutamida, o tiopental 2mM reduziu drasticamente o efluxo do ^{86}Rb , sendo que este efluxo passou de $2.5 \pm 0.05\%$ min para $0.7 \pm 0.03\%$ min (tabela 13).

EFLUXO DO ^{86}Rb DE ILHOTAS ISOLADAS E PERFUNDIDAS NA PRESENÇA DE TEA, DIAZOXIDA, TIOPENTAL: EFEITO DA RETIRADA DO ANESTÉSICO

A figura 8A ilustra o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas perfundidas na ausência de Ca^{2+} e glicose e na presença de 20 mM de TEA, mais 2mM de tiopental e 20 $\mu\text{g/ml}$ de diazoxida. Durante a primeira fase o efluxo foi de $1.7 \pm 0.05\%$ min,

contudo com a retirada do tiopental do meio perfusor (min 40 a 60), notamos um repentino e drástico aumento do efluxo do ^{86}Rb , o qual atingiu $4.9 \pm 0.5\%$ min entre o intervalo de 500 ao 600 min do período de perfusão. O efluxo do ^{86}Rb retornou a valores semelhantes aqueles registrados na primeira fase com a reintrodução do tiopental no meio. O alto grau de significância entre as diferenças está demonstrado na tabela 14.

A figura 8B ilustra o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas perfundidas na ausência extracelular de Ca^{2+} e glicose porém na presença de 20 mM de TEA e 2 mM de tiopental. O efluxo do ^{86}Rb , o qual apresentou valores em torno de $0.9 \pm 0.05\%$ min entre minuto 30 e 40, não foi afetado pela introdução no meio perfusor de 20 $\mu\text{g/ml}$ de diazoxida ($0.8 \pm 0.03\%$ min, mins 50 a 60). A retirada do diazoxida do meio (minuto 60), também não alterou o efluxo do ^{86}Rb , como comprovado na tabela 15.

FIGURA I

Efeito da glicose (G) 2.8 mM (A), e do tiopental (TID) 2 mM (B), sobre o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas perfundidas na presença de tolbutamida 20 $\mu\text{g/ml}$.

A glicose assim como o tiopental estiveram presentes no intervalo compreendido entre o 40º e 60º minuto da perfusão, e os pontos indicam as médias ($\pm$ erro padrão), sendo N = 4 para cada condição experimental.

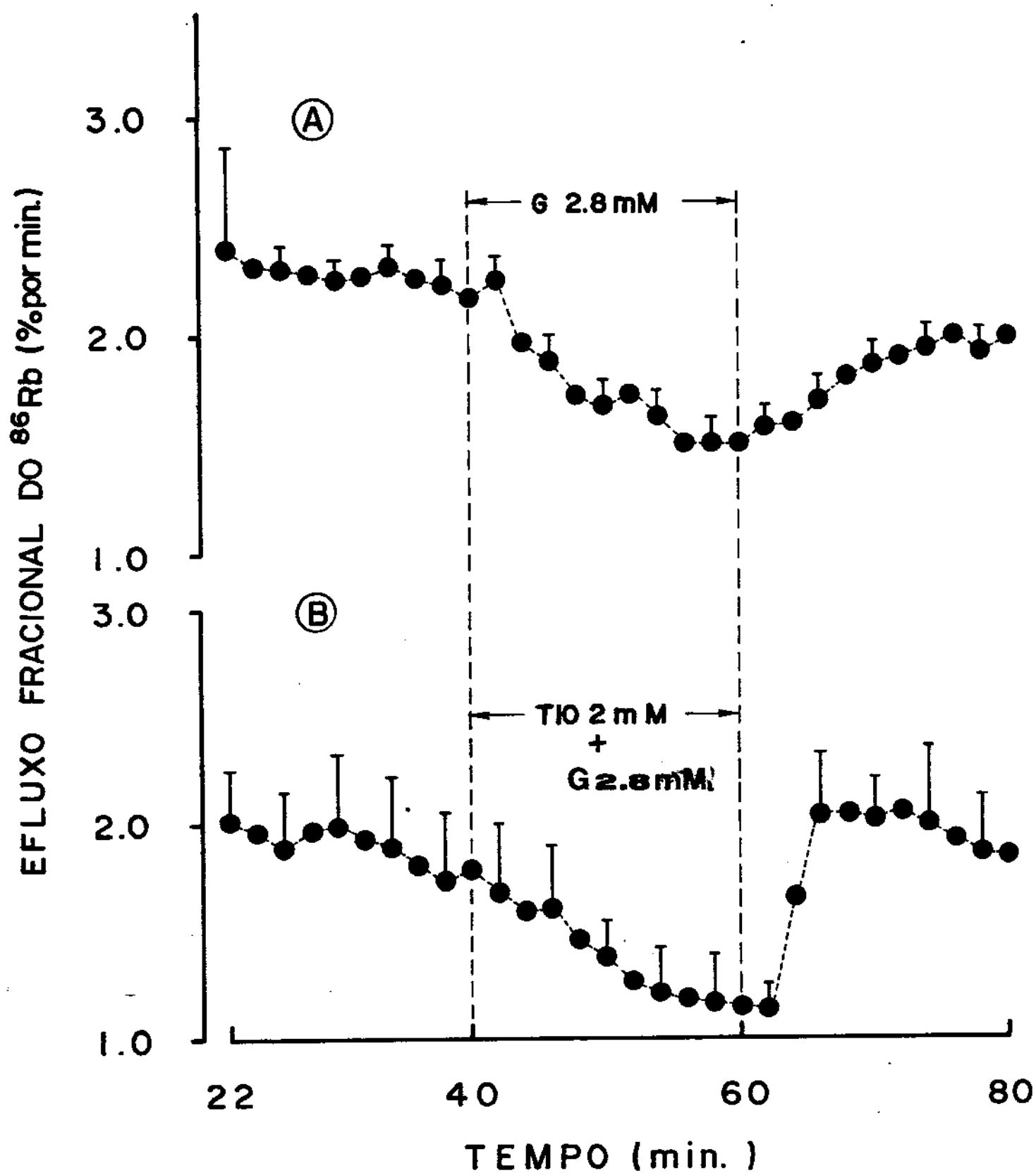


FIGURA II

Efeito do tiopental 0.2 mM (A) e 2 mM (B,C), sobre o efluxo de ^{86}Rb de ilhotas perfundidas na presença de tolbutamida 20 $\mu\text{g/ml}$ (A,B) e 100 $\mu\text{g/ml}$ (C), e na ausência de glicose. Tolbutamida esteve presente todo o período de perfusão, sendo o barbiturato acrescentado a mesma entre o 40º e 60º minuto.

Cada ponto corresponde aos valores médios com os respectivos erro padrão, sendo $N = 4$ para cada condição experimental.

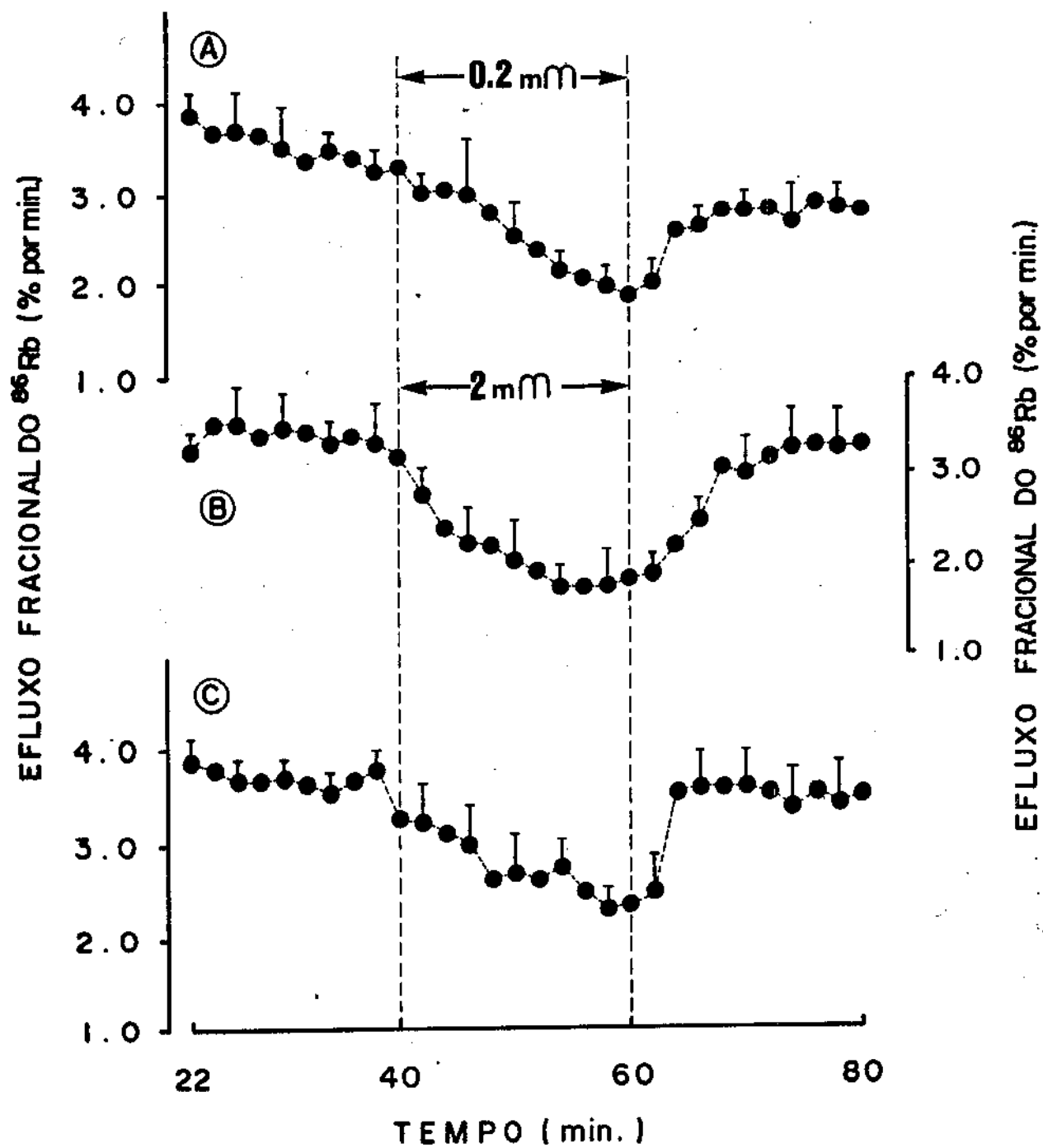


FIGURA III

Efeito do tiopental 0.2 mM (triângulos), e 2 mM (círculos), sobre o efluxo do 86Rb de ilhotas perfundidas na ausência de glicose e na presença de diazoxida 20 $\mu\text{g/ml}$ (A) e 100 $\mu\text{g/ml}$ (B). As linhas tracejadas delimitam intervalo de tempo que o tiopental esteve presente na perfusão. Os símbolos representam as médias ($\pm$ erro padrão), sendo $N = 4$ para cada condição experimental.

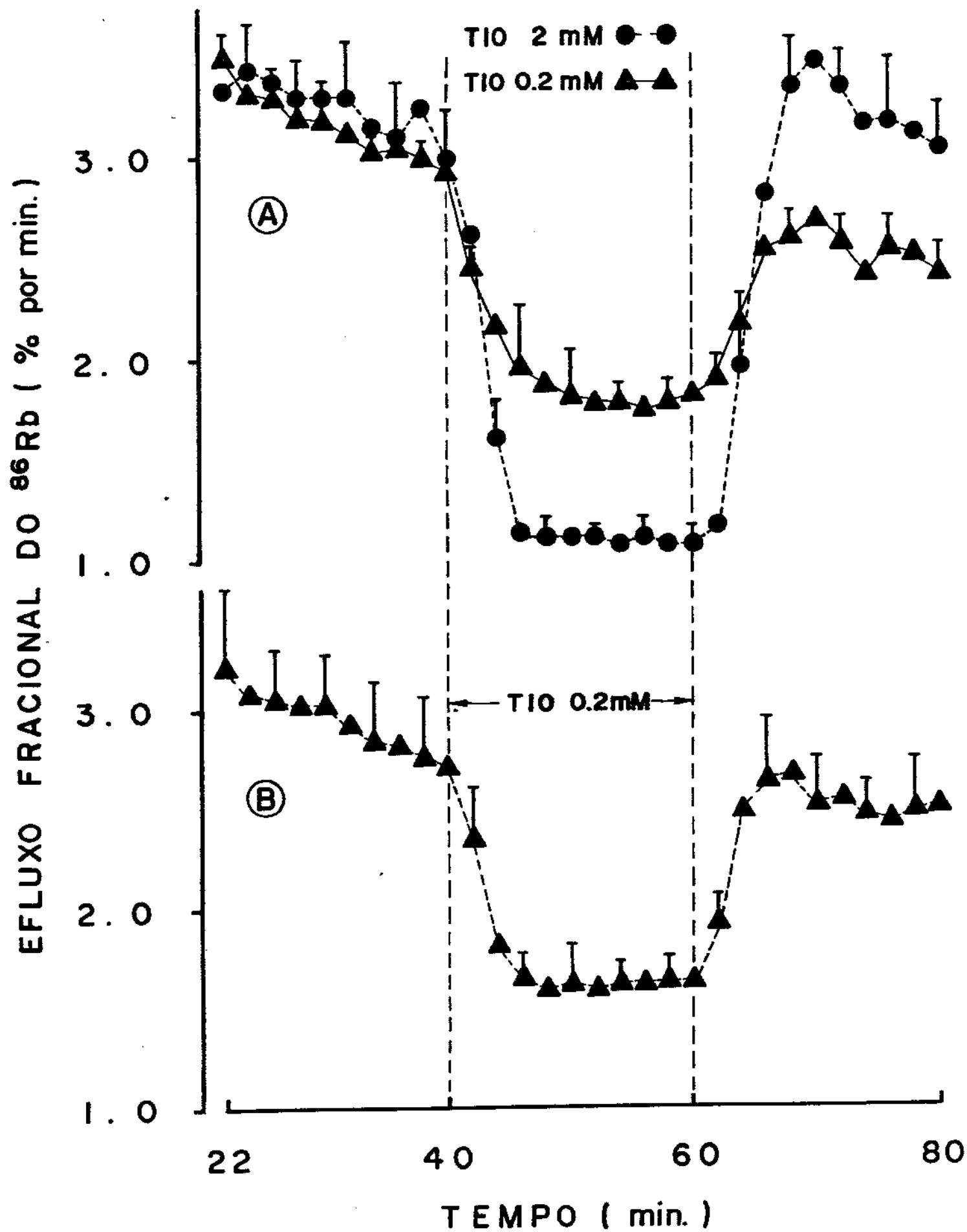


FIGURA IV

Efeito da teofilina 10 mM (A) e da teofilina 10 mM + tiopental 2 mM (B) sobre o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas perfundidas durante o intervalo de 70 min.

Os experimentos foram executados na presença de 8.3 mM de glicose, teofilina somente (A) e teofilina mais tiopental (B) foram adicionados ao meio no 31º minuto da perfusão. Os símbolos indicam as médias ($\pm$ erro padrão da média), sendo N = 4 tanto para a condição (A) como para (B).

EFLUXO FRACIONAL DO ^{86}Rb (% por min.)

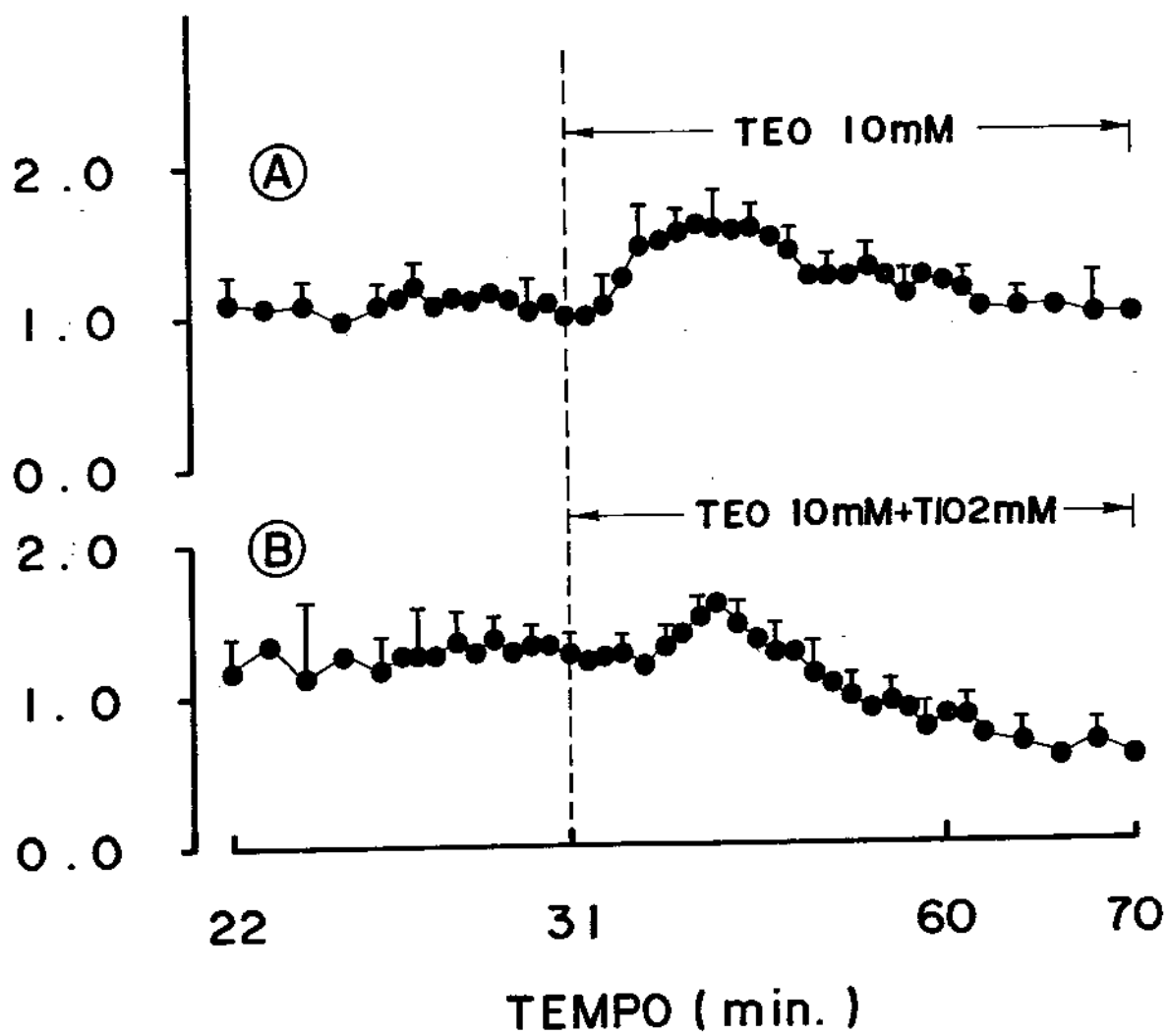


FIGURA V

Efeito do tiopental 2 mM sobre o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas perfundidas na presença de K^+ 50 mM, as linhas tracejadas delimitam o período de tempo que o barbiturato esteve presente na perfusão (40 e 60 minutos).

Os pontos representam as médias ($\pm$ erro padrão) sendo $N = 4$.

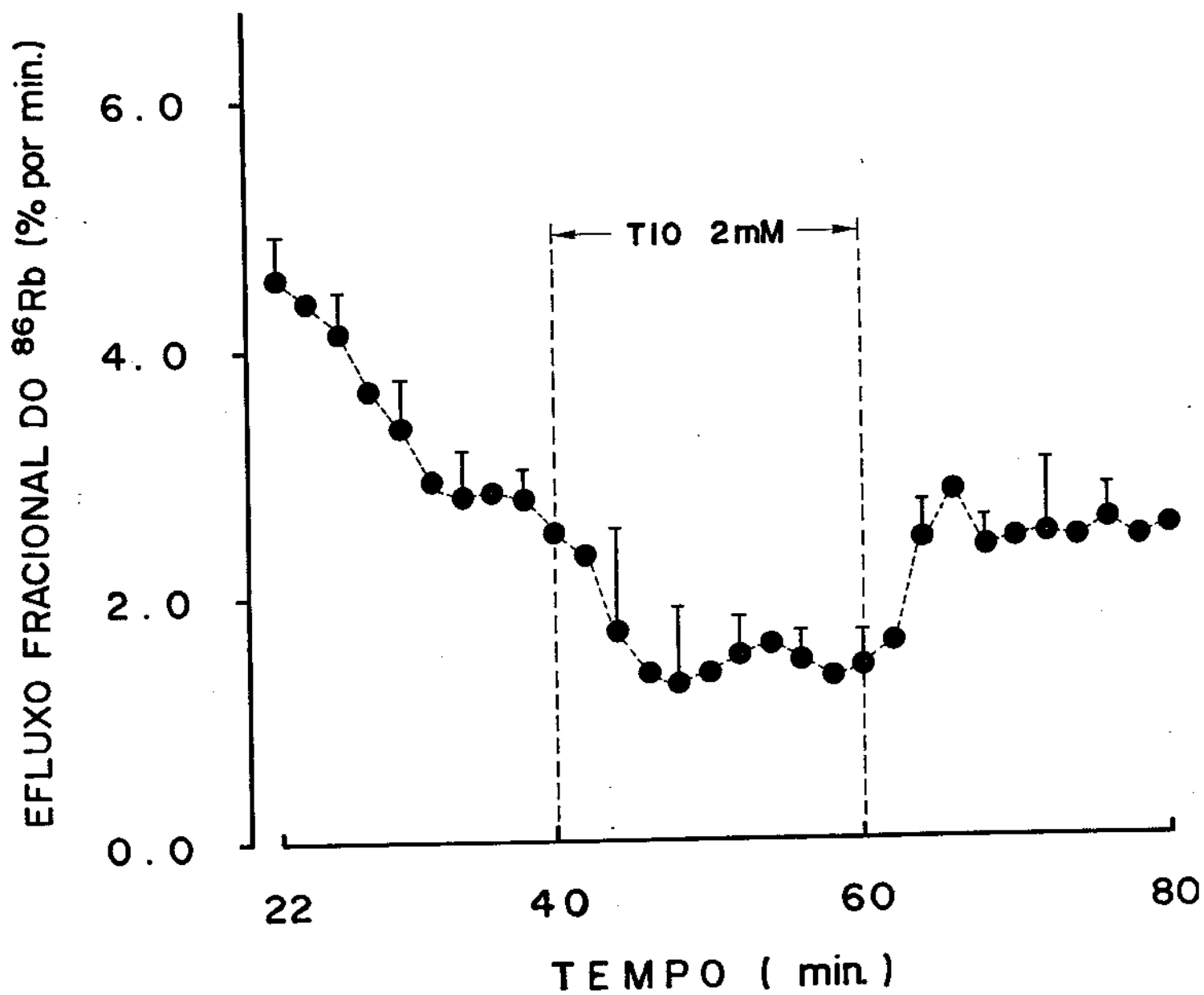


FIGURA VI

Efeito do tiopental 2mM sobre o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas perfundidas na presença de TEA 20 mM e na ausência de glicose.

O barbitúrico esteve presente no intervalo 400 ao 600 minuto da perfusão e os pontos representam as médias ($\pm$ erro padrão sendo $N = 6$).

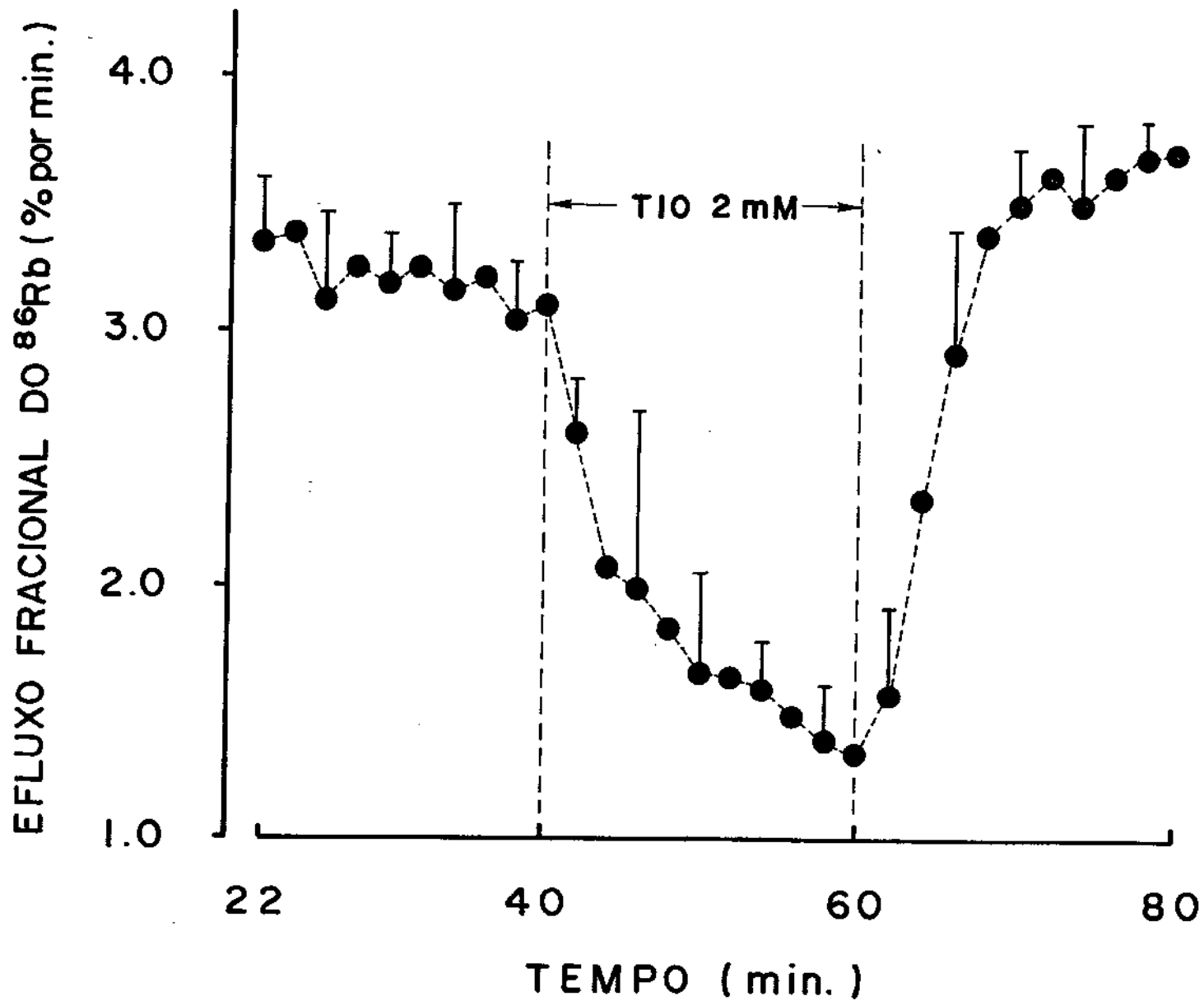


FIGURA VII

Efeito do tiopental 2 mM sobre o efluxo de ^{86}Rb de ilhotas perfundidas com meio contendo 20 mM de TER, tolbutamida 20 $\mu\text{g/ml}$ e na ausência de glicose. O meio perfusor foi privado do Ca^{2+} e acrescido de 0.5 mM de EGTA.

O anestésico foi adicionado ao meio entre o 40º e 60º minuto da perfusão, os pontos representam as médias ($\pm$ erro padrão) e o N = 4.

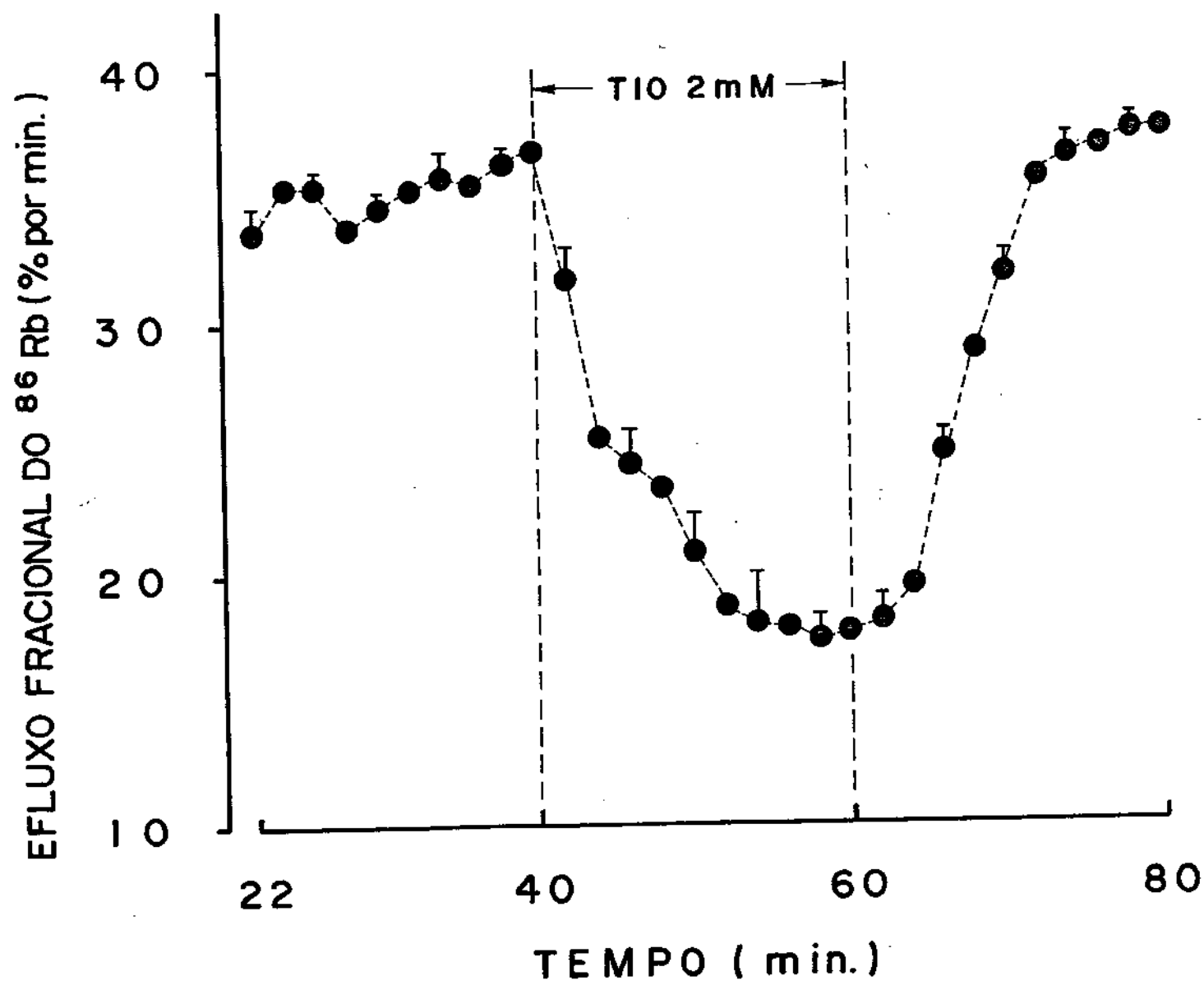


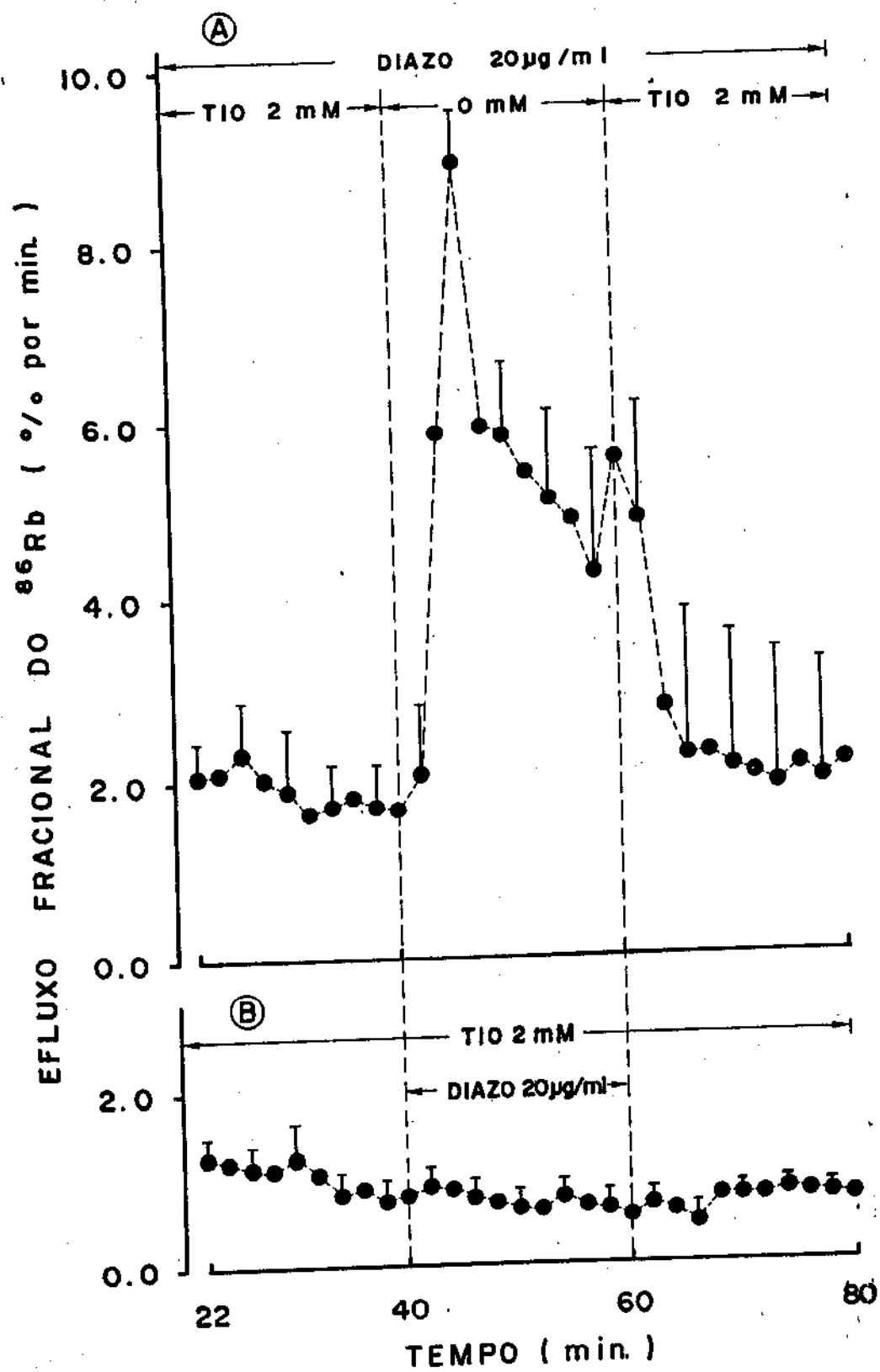
FIGURA VIII

A figura 8 A ilustra o efeito da retirada do tiopental 2 mM do meio perfusor, sobre o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas perfundidas na ausência de glicose e de Ca^{2+} e na presença de 20 mM de TEA, 20 $\mu\text{g/ml}$ de diazoxida, 0.5 mM de EGTA.

O barbiturato esteve ausente no intervalo de perfusão compreendido entre o 40º e 60º minuto, como delimitado pelas linhas verticais pontilhadas.

Os pontos representam as médias ($\pm$ erro padrão) sendo $N = 4$ para a condição experimental.

A figura 8 B, ilustra o efeito da adição de diazoxida 20 $\mu\text{g/ml}$ sobre o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas perfundidas na ausência de glicose e de Ca^{2+} e na presença de TEA 20 mM, tiopental 2 mM, EGTA 0.5 mM. A diazoxida foi adicionada ao meio perfusor entre o 40º e 60º minuto da perfusão, como delimitado pelas linhas verticais pontilhadas. Os pontos representam as médias ($\pm$ erro padrão) sendo $N = 4$.



DISCUSSÃO

Como estabelecido na introdução, as alterações nas permeabilidades do K^+ na membrana da células beta, induzidas pela glicose, são fundamentais para o início da cascata de eventos que culmina com a secreção da insulina. Considerando a relevância dos canais de K^+ envolvidos nesse processo, em especial aqueles modulados pelo ATP e, considerando ainda sua efetiva implicação no controle clínico da manutenção de pacientes diabéticos não dependentes de insulina, através de hipoglicemiantes orais tais como as sulfonilurêias que atuam nesse canal, é óbvio que o conhecimento detalhado da sua fisiologia se reveste de fundamental importância.

Nesta linha de raciocínio, o grupo de pâncreas endócrino de Campinas tem dedicado certo esforço na descoberta de substâncias que possam interferir com a fisiologia deste tipo de canal. Assim, uma dessas substâncias testadas foi o tiopental (Boschero et alii, 1985). Somando-se ao fato de que estudos farmacológicos têm demonstrado que a permeabilidade da membrana plasmática aos íons Na^+ , K^+ , Ca^{2+} modifica-se na presença dos tiobarbitúricos (Blaustein, 1968; Seeman, 1972; Roth, 1979).

Em células nervosas Sevcik (1980) e Ho e Harris (1981) comprovaram que o tiobarbiturato tiopental modifica o potencial de membrana, além de exibir alta afinidade pelo canal de K^+ produzindo neste um efeito bloqueador e com isso estimulando o neurônio ao invés de inibi-lo. Dias (1984) estudando o efeito do tiopental sobre a secreção de insulina e a permeabilidade ao K^+ em ilhotas isoladas, constatou que o barbitúrico reduziu o efluxo de ^{86}Rb , potencializando a secreção de insulina; e ainda, verificou que a redução também ocorreu na presença de menadione, um conhecido aceptor de hidrogênio, que atua reduzindo a formação de NAD(P)H em ilhotas isoladas (Malaisse et alii, 1978). De posse de tais constatações, nos propusemos a estudar sobre quais tipos de canais de K^+ o tiopental poderia agir.

Na primeira parte deste trabalho comparamos a ação barbiturato tiopental sobre o efluxo de ^{86}Rb , de ilhotas isoladas e perfundidas na presença e na ausência de glicose, além de verificar a ação complementar sobre o efeito produzido pela tolbutamida.

Como explicado no início da discussão, a glicose e a tolbutamida partilham de uma ação específica sobre os canais de K^+ modulados pelo ATP. Pode-se notar na figura 1 (A) que a tolbutamida 20 $\mu g/ml$ manteve reduzido o efluxo de ^{86}Rb na ausência de glicose, sendo que a adição de 2.8 mM de glicose ao meio, provocou uma redução suplementar no efluxo de radioisótopo, como já observado por outros autores (Henquin, J.C. e Meissner, H.P., 1982). A figura 1 (B) mostra que a

adição de tiopental ao meio contendo glicose e tolbutamida provocou uma maior redução adicional no efluxo de ^{86}Rb . Esse efeito foi rapidamente revertido com a retirada de anestésico do meio registrados após o 600 min de perfusão, indicando que o tiopental não exerce ação tóxica.

Na mesma linha de raciocínio, analisamos o efeito do tiopental na presença de diferentes concentrações de tolbutamida, porém na ausência de glicose.

A ação do tiopental sobre o efluxo de ^{86}Rb sugere ser dose-dependente como ilustrado na figura 2. Considerando que o tiopental 2 mM foi mais eficaz em reduzir o efluxo de ^{86}Rb que 0.2 mM, mesmo em presença de tolbutamida. Salientando que o tiopental 2 mM foi capaz de reduzir o efluxo do ^{86}Rb inclusive na presença de altas concentrações de tolbutamida.

Dentre as sulfonilurêias encontramos a diazoxida que exibe propriedades hiperglicemiantes, pois atua diretamente nas células beta inibindo a secreção de insulina estimulada por vários agentes (Milner e Hales, 1969; Sturgess et alii, 1988). Em contraste com os agentes hipoglicemiantes, p. ex: tolbutamida; a diazoxida produz a ativação do canal de K-ATP modulável (Trube et alii, 1986), não exercendo efeito sobre os demais canais de K^+ presentes na membrana das células beta (Henquin e Meissner, 1982; Rorsman e Trube, 1985).

Assim, tornou-se imperativo também estudar uma possível ação do tiopental sobre o efluxo do ^{86}Rb em presença da diazoxida. A figura 3 (A), mostra que mesmo na

presença de 20 $\mu\text{g/ml}$ de sulfuniluréia, 0.2 mM de tiopental reduziu significativamente o efluxo de ^{86}Rb . Tal redução foi, ainda, mais marcante em presença de 2.0 mM do anestésico. A figura 3 B ilustra que 0.2 mM de tiopental, em presença de 100 $\mu\text{g/ml}$ de diazoxida, provocou idêntica redução de efluxo de ^{86}Rb que em 20 $\mu\text{g/ml}$ de diazoxida. Embora não conclusivos, esses resultados afastam em princípio a idéia de uma ação competitiva entre as duas drogas.

Embora indiretamente, os dados apresentados e discutidos até o presente momento indicam que o tiopental exerce sua ação sobre os canais de K^+ modulados pelo ATP. Nesse sentido, os estudos eletrofisiológicos, apresentados por Gonçalves e da Silva (1989), associados aos registros recentes de patch-clamp (Kozlowski et alii, 1989) confirmam tal hipótese. A propósito, é muito sugestivo o fato de que em altas concentrações de glicose (16.7 mM), quando os canais de K^+ modulados pelo ATP estão praticamente fechados, o tiopental não exerceu ação significativa (Gonçalves e cols., 1986).

Tendo presente os aspectos discutidos a segunda parte deste trabalho, objetiva estudar possíveis influências do tiopental sobre os canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} e/ou V_m (Petersen e Findlay, 1987).

A figura 4 ilustra o efeito da teofilina sobre o efluxo de ^{86}Rb . A teofilina mobiliza Ca^{2+} de organelas intracelulares e assim promove o estímulo para abertura de

um canal de K dependente de Ca^{2+} . De fato a figura 4 A mostra, que a introdução de teofilina ao meio perfusor aumentou o efluxo do ^{86}Rb . Na figura 4 B, observamos que a adição concomitante de tiopental não inibiu o aumento do efluxo provocado pela teofilina. Nota-se que o mesmo não apresentou a mesma magnitude temporal que a figura 4 A. Nessa condição o menor efluxo provavelmente, se deve a uma redução da permeabilidade ao ^{86}Rb por ação do anestésico sobre o canal de K^{+} modulado pelo ATP. Ressaltamos adicionalmente que resultados preliminares com o ionóforo do Ca^{2+} : A-23.187, indicam que o tiopental não interfere no aumento do efluxo do ^{86}Rb provocado pelo referido ionóforo. (Dados preliminares não publicados).

No mesmo sentido observamos na figura 5, que em presença de concentrações despolarizantes de K^{+} , o efeito redutor de tiopental sobre o efluxo de ^{86}Rb foi menor.

Como passo seguinte analisamos o efeito do tiopental sobre o efluxo de ^{86}Rb na presença de TEA que bloqueia os canais de K^{+} dependentes de Ca^{2+} e potencial de membrana (V_m) (Findlay, et alii, 1985).

Como mostra a figura 6, 2mM de tiopental provocou uma enorme redução no efluxo de ^{86}Rb o que nos leva a descartar a possibilidade da participação do anestésico sobre esse tipo de canal.

Num protocolo mais complexo (figura 7), realizamos uma perfusão em que o meio continha TEA, tolbutamida, porém desprovido de Ca^{2+} e glicose, sendo ainda enriquecido com

0.5 mM de EGTA. Podemos notar que a adição de 2 mM de tiopental conseguiu promover uma rápida e marcante redução no efluxo de ^{86}Rb . Nessa condição experimental esperávamos um menor efeito do tiopental uma vez que a tolbutamida esteve presente. Isso não ocorreu e não temos explicação convincente para o observado. Apenas podemos especular que na ausência de Ca^{2+} , e presença de EGTA a ação da tolbutamida não se manifestou de maneira classicamente descrita, talvez porque na ausência do Ca^{2+} ocorreu alguma modificação localizada a nível do receptor a tolbutamida.

Finalmente a figura 8 ilustra dois protocolos que são subsídios importantes para a hipótese de que o tiopental comprovadamente atua nos canais de K^{+} modulados pelo ATP. Nas duas perfusões o cálcio e a glicose estiveram ausentes e o meio conteve 0.5 mM de EGTA e 20 mM de TEA. Na presença de 20 $\mu\text{g/ml}$ de diazoxida e 2 mM de tiopental, o efluxo do ^{86}Rb é bastante reduzido como pode ser observado na figura 8 A, (minutos 220-400). Contudo, a retirada do tiopental do meio perfusor provoca um enorme aumento do efluxo do ^{86}Rb (minutos 400 a 600) o qual retornou aos valores iniciais com a reintrodução do anestésico no meio.

Adicionando-se a esses resultados a figura 8 B ilustra com clareza que a redução do efluxo do ^{86}Rb , observado na presença do tiopental, (min 220 a 400) não foi alterado com a adição de diazoxida ao meio (min 400 a 600).

Concluindo a discussão dos resultados aqui apresentados, poderíamos associar dados obtidos com

secreção de insulina, atividade elétrica e patch-clamp e sugerir que o conjunto de informações apontam para uma ação específica do tiopental sobre a permeabilidade ao K^+ modulado pelo ATP. Contudo, estes resultados não nos permite, ainda, concluir que o sítio de ação do tiopental seja o comum daquele exercido pelas sulfonilurêias.

RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho estudou-se discriminativamente o efeito do tiopental sobre a permeabilidade ao K^+ em ilhotas de Langerhans isoladas de rato.

As ilhotas foram isoladas pelo método da colagenase, marcadas durante 90 minutos com $^{86}RbCl$ (substituto de K^+) e perfundidas em solução de Krebs-bicarbonato em diferentes condições experimentais. Os resultados indicam que:

Tiopental (0.2 e 2.0 mM) reduziu o efluxo de ^{86}Rb de ilhotas perfundidas na presença ou ausência de glicose, com o meio contendo, ainda, 20 ou 100 $\mu g/ml$ de um bloqueador específico dos canais de K^+ modulados pelo ATP, ou seja a tolbutamida. O efeito inibidor de tiopental sobre o efluxo do ^{86}Rb foi mais marcante quando a perfusão das ilhotas foi processada em solução contendo diazoxida, substância que promove a abertura dos canais de K^+ modulados pelo ATP.

Tiopental não inibiu o aumento do efluxo de ^{86}Rb induzido pela teofilina, a qual mobiliza Ca^{2+} de compartimentos intracelulares. Contudo, tiopental inibiu significativamente o efluxo de ^{86}Rb em presença do TEA que bloqueia as permeabilidades de K^+/Ca^{2+} e V_m dependentes, esse efeito inibidor foi detectado também quando na presença

de tolbutamida. Seu efeito inibidor sobre o efluxo do 86Rb em presença de uma concentração despolarizante de K^+ (50 mM) foi sublimar em comparação aos outros procedimentos estimulantes às células B.

Com base nos resultados obtidos em experimentos com sulfonilurêias hipoglicemiantes e hiperglicemiantes, constatamos que o tiopental atua bloqueando preferencialmente de maneira dose-dependente e reversível os canais de K^+ modulados pelo ATP.

SUMMARY

We investigated here the effects of tiopental on the K^+ -permeability in isolated islets of Langerhans. Islets, obtained from adult rats by collagenase digestion were prelabeled with $86RbCl$ during 90 min ($86Rb$ was used as a substitute for K^+) and perfused in a Krebs-bicarbonate solution. The results indicate that:

Tiopental (0.2 and 2.0 mM) significantly reduced the $86Rb$ efflux from islets perfused in a medium containing or not 2.8 mM glucose. In the presence of 20 or 100 $\mu g/ml$ of tolbutamide, a blocker of the ATP-modulated K^+ channels, the effect of tiopental in reducing the $86Rb$ efflux is still present.

On the presence of the hyperglycemic sulfonylurea Diazoxide, the effects of tiopental were much more marked.

On the other hand, tiopental did not affect the increase in the $86Rb$ efflux provoked by teophylline, that mobilises Ca^{2+} from internal stores and hence stimulates the Ca^{2+} -dependent K^+ permeability. Tiopental reduced the $86Rb$ efflux from islets perfused in the presence of TEA that

blocks the Ca^{2+} -dependent K^{+} permeability. This effect was noticeable even in the presence of tolbutamide. The reduction in the ^{86}Rb efflux provoked by tiopental was only marginal when the islets were perfused in the presence of high K^{+} concentration (50 mM).

These results suggest that tiopental reduces the K^{+} permeability from pancreatic islets (in a dose-dependent manner) on the ATP-modulated K^{+} channels. As a provocative idea, we suggest that the delay in the response may be due to the low liposolubility of the barbiturate in the plasma membrane.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ARHEM, P. & KRISTBJARNARSON, H. A barbiturate-induced potassium permeability increase in the myelinated nerve membrane. *Acta Physiol. Scand.*, 113:387-392, 1981.

ARKHAMMAR, P.; NILSSON, T.; RORSMAN, P.; BERGGREN, P.O.;
Inhibition of ATP regulated K channels precedes
depolarization induced increase in cytoplasmic free Ca^{2+}
concentration in pancreatic β -cells. *J. Biol. Chem.*,
262:5448-54, 1987.

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

----- ; HARRISON, D.E. & ASHCROFT, S.J.H. Glucose
Induces closure of single potassium channels in isolated
rat pancreatic beta cells. *Nature*, 312:446-448, 1984.

ASHFORD, M.L.; STURGESS, N.C.; COOK, D.L.; HALES, C. K

channels in an insulin-secreting cell line: effects of ATP and sulphonylureas. In Biophysics of the pancreatic B-cell. Atwater, I.; Rojas, E.; Sonia, B. Eds. New York, Plenum Press, 1986, p.69-76

ATWATER, I. Control mechanisms for glucose-induced changes in the membrane potential of mouse pancreatic B-cell. Cienc.Biol., (Portugal) 5., 299-314, 1980.

----- ; Dawson, C.M.; Ribalet, B. e Rojas, E. Potassium permeability activated by intracellular calcium ions concentration in the pancreatic B-cell. J.Physiol., 288:575-588, 1979a.

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

----- ; RIBALET, B.; e ROJAS, E. Mouse pancreatic B-cells:tetraethyl ammonium blockage of the potassium permeability increase induced by depolarization. J.Physiol., 288:561-574, 1979b.

BARRET, J.N., MAGLEBY, K.L.; e PALLOTTA, B.S. Proprieties of

single calcium activated potassium channels in cultured rat muscle. *J.Physiol.Lond.*, 331:211-230, 1982.

BELLES, B.; HERCHELER, J.; TRUBE, G. Changes of membrane currents in cardiac cells induced by lens whole-cell recordings and tolbutamide. *Pflugers Arch.*, 409:582-588, 1987.

BLAUSTEINS, M.P. Barbiturates block sodium and potassium conductance increases in voltage-clamped lobster axons. *J.Gen.Physiol.*, 51:593-607, 1968.

-----, Barbiturates block calcium uptake by stimulated and potassium-depolarized rat sympathetic ganglia. *J. Pharmacol., exp. Ther.*, 196:80-86, 1976.

-----, Barbiturates block sodium and potassium conductance increases in voltage-clamped lobster axons. *J. Gen. Phys.*, 51:293-305, 1968.

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

----- ; DELATTRE, E. & DOS SANTOS, M.L. Isolamento de ilhotas de Langerhans de rato. Resumos do XXII Congresso

de SBFis (Ribeirão Preto-SP), p.117, 1980.

----- ; GONÇALVES, A.A. & LANGONE, F. Thiopental induces K⁺ permeability alterations in Beta cells: effects on membrane potential and input resistance. Brazilian J. med. Biol. Res., 16(5-6):424, 1983.

----- ; DIAS, D.; REIS, L.C.; LANGONE, F. & GONÇALVES, A.A. Calcium permeability in beta cells: effect of thiopental. Brazilian J. Med. Biol. Res., 18(5-6): 690 A, 1985.

----- & MALAISSE, W.J. Stimulus-secretion coupling of glucose induced insulin release. XXIX regulation of 86Rb efflux from perifused islets. Am. J. Physiol., 236, E 139 E 146, 1979.

CARPINELLI, A. & MALAISSE, W.J. Regulation of 86 Rb out-flow from pancreatic islets. Reciprocal changes in the response to glucose, tetraethylammonium and quinine. Mol. Cell. Endocrinol., 17:103-110, 1980.

----- ; ----- . Regulation of 86Rb out-flow from pancreatic islets. Possible significance of ATP. J. Endocrinol. Invest., 4:365-70, 1980.

COLOUHOUM, D., NEHER, E.; REUTER, H. & STEVENS, C.F. Inward

current channels activated by intracellular Ca^{2+} in cultured cardiac cells. *Nature Lond.*, 294: 752-754, 1981.

COOK, D.L. & HALES, C.N. Intracellular ATP directly blocks K channels in pancreatic B-cells. *Nature*, 311:271-73, 1984.

----- ; ----- & FUJIMOTO, W.Y. Lowering of pH inhibits Ca^{2+} activated K^{+} channels in pancreatic B-cells. *Nature Lond.*, 311:269-271, 1984.

----- & JKEUCHI, M. Tolbutamide as mimic of glucose on B-cell electrical activity, ATP sensitive K^{+} channels as common pathway for bath stimuli. *Diabetes*, 38:416-421, 1989.

CORBETT, C.E. *Farmacodinâmica*, 5ª edição, São Paulo, Guanabara Koogan, 1985.

DAWSON, C.M.; LEBRUM, P.; HERCHUELZ, A.; MALAISSE, W.J.; GONÇALVES, A.A. & ATWATER, I. Effect of temperature upon potassium-stimulated insulin release and calcium entry in mouse and rat islets. *Horm. Metabol. Res.*, 18:221-224, 1986.

DELLERS, M. & MALAISSE, W.J. Binding of hypoglycaemic sulphonylureas to an artificial phospholipid bilayer. *Diabetologia*, 26:55-59, 1984.

DIAS, O. Permeability ao K^+ e a secreção de insulina. Efeito do tiopental. Instituto de Biologia, 1984. 38p. Tese de Mestrado. UNICAMP

DRAZMIN, B.; KAM, M. & SUSSMAN, K.E. Insulin and glyburide increase cytosolic free-Ca concentration in isolated rat adipocytes. *Diabetes*, 36:174-178, 1987.

DUNNE, M.J.; ILLOT, M.C. & PETERSEN, O.H. Interaction of diazoxide, tolbutamida and $ATP4^-$ on nucleotide-dependent K^+ channels in an insulin secreting cell line. *J. Membr. Biol.*, 99: 215-224, 1987.

-----; PETERSEN, O.H. GTP and ADP activated ATP inhibited K^+ channels in insulin secreting cell line RIN m 5F. *J. Physiol (Lond)*, 381, 67P, 1986.

-----; WEST-JORDAN, J.A.; ABRAHAM, R.J.; EDWARDS, H.T. & PETERSEN, O.H. The gating of nucleotide-sensitive K^+ channels in insulin secreting cells can be modulated by changes in the ratio $ATP4^-/ADP3^-$ and by nonhydrolyzable e derivatives of both ATP and ADP. *J. Membr. Biol.*, 104: 165-177, 1988.

FERRER, R.; ATWATER, I.; OMER, E.M.; GONÇALVES, A.A.; CROGHAN, P.C. & ROJAS, E. Electrophysiological evidence for the specific inhibition of potassium permeability in pancreatic β -cells by glibenclamide. *Quarterly J. Expl.*

Physiol., 69:831-839, 1984.

FINDLAY, I. & DUNNE, M. Voltage-activated Ca^{2+} currents in insulin secreting cells. Febs Lett., 189: 281-5, 1985.

-----; ----- & PETERSEN, O.H. ATP-sensitive inward rectifier and voltage and calcium-activated K channels in culture pancreatic islet cells. J. Membr. Biol., 165-172, 1985.

-----; -----; ----- High conductance K^{+} channel in pancreatic islet cells can be activated and inactivated by internal calcium. J. Membr. Biol., 83:169-175, 1985.

FRIEDMAN, M.B.; COLEMAN, R. & LESLIE, S.W. Barbiturate depression of calcium mediated stimulus-secretion in synaptosomes: a species and strain comparison. Life Sci., 25:735-738, 1979.

GARVIN, J.R. Dual actions of sulfonylureas and glyburide. Receptor and post receptor effects. Am. J. Med., 79(Suppl 3B):34-42, 1985.

GEE, W. & MISLER, S. Tolbutamide inhibits an ATP-sensitive K^{+} channel in cardiac myocytes. Biophysical J., 51: 530, 1987.

GONÇALVES, A.A.; DIAS, D.; LANGONE, F.; REIS, L.C. & BOSCHERO, A.C. Thiopental inhibits K⁺ permeability of rat and mouse pancreatic B-cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 125:119-125, 1986.

-----; DAWSON, C.M.; BANGHAN, A.; CROGHAN, P. & SCOTT, A. Selectivity of B-cell membrane of monovalent cations. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 18: 175, 1985.

----- & SILVA, C.A. Potassium permeability in pancreatic B-cell. The effect of thiopental. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 21:365-368, 1988.

HAMILL, D.P.; MARTY, A.; NEHER, E.; SAKMANN, B.; SIGWORTH, F.J. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recordings from cells and cell free membrane patches. *Pflugers Arch.*, 391:85-100, 1981.

HELLMAN, B. Tolbutamide stimulation of ⁴⁵Ca fluxes in microdissected pancreatic islets rich in B-cells. *Mol. Pharmacol.*, 20:83-88, 1981.

-----; SEHLIN, J.; TALJEDAL, I.B. Glibenclamide is exceptional among hypoglycaemic sulphonylureas in accumulating progressively in B-cell rich pancreatic islets. *Acta Endocrinol. (KBN)* 105:385-390, 1984.

HENQUIN, J.C. Tetraethylammonium potentiation of insulin release and inhibition of rubidium efflux in pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77(2):551-556, 1977.

----- ; Relative importance of extracellular and intracellular calcium for the two phases of glucose-stimulated insulin release: studies with theophylline. *Endocrinology*, 102:723-730, 1978.

----- Metabolic control of the potassium permeability in pancreatic islets cells. *Biochem. J.*, 186:541-550, 1980.

----- ; MEISSNER, H.P. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on 86Rb fluxes and membrane potential in pancreatic B cells. *Biochem. Pharmacol.*, 31: 1407-1415, 1982.

----- ; ----- ; PREISSLER, M. 9-aminoacridine and tetraethylammonium induced reduction of the potassium permeability in pancreatic B-cells. Effects on insulin release and electrical properties. *Biochem. Biophys. Acta*, 387:579-592, 1979.

HO, I.K. & HARRIS, R.A. Mechanism of action of barbiturates. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 21:83-11,

1981.

HUNTER, M.; LOPES, A.G.; BOULPAEP, E.L. & GIEBISCH, G.

Single channel recording of calcium activated potassium channels in the apical membrane of rabbit cortical collecting tubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:4237-4239, 1984.

IWATSUKI, N. & PETERSEN, D.H. Action of tetraethylammonium on calcium activated potassium channels in pig pancreatic acinar cells studied by patch-clamp single-channel whole-cell current recording. *J. Membr. Biol.*, 86:139-144, 1985.

KAKEI, M.; KELLY, R.D. & ASHCROFT, S. The ATP-sensitivity of K⁺ channels in rat pancreatic B-cells is modulated by ADP. *FEBS Lett.*, 208:63-66, 1986.

KEIZER, J. Electrical activity and insulin release in pancreatic beta cells. *Math. Biosc.*, 90:127-138, 1988.

----- ; MAGNUS, G. ATP-sensitive potassium channel and bursting in the bursting in the pancreatic beta cell. *Biophys. J.*, 56:229-242, 1989.

KOZLOWSKI, R.Z.; HALES, C.N.; NOBLE, A.L.; ASHFORD, M.L.J. The ATP-K⁺ channel: a novel site of action for the

barbiturates. *Diabetologia*, 32: 506 A, 1989.

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

LANGONE, F. Efeito do tiopental sobre a permeabilidade elétrica da célula beta e o efluxo de ^{45}Ca em ilhotas de Langerhans. Instituto de Biologia, 1986. Tese de Mestrado, UNICAMP.

LATORRE, R. & MILLER, C. Conduction and selectivity in potassium channels. *J. Membr. Biol.*, 71:11-30, 1983.

MALAISSE, W.J.; BOSCHERO, A.C.; KAWAZU, S.; HUTTON, I.C. The stimulus-secretion coupling of glucose insulin release. Effect of glucose on K^+ fluxes in isolated islets. *Pflugers Arch.*, 373:237-242, 1978.

----- & HERCHUELZ, A. Nutritional regulation of K^+ conductance: an unsettled aspect of pancreatic beta cell physiology. *Biochem. Act. Horm.*, 9:62-92, 1982.

----- ; HUTTON, J.C.; CARPINELLI, A.R.; HERCHUELZ, A.; SENER, A. The stimulus-secretion coupling of aminoacid-induced insulin release, metabolism and cationic effects

of leucine. *Diabetes*, 29:431-437, 1980.

----- ; MALAISSE-LAGAE, F. & SENER, A. Anomeric specificity of hexose metabolism in pancreatic islets. *Physiolol. Rev.*, 63:773-786, 1983a.

----- ; LEBRUN, P.; HERCHUELZ, A.; SENER, A. & MALAISSE-LAGAE, F. Synergistic effect of a tumor-promoting phorbol ester and a hypoglycemic sulphonylurea upon insulin release. *Endocrinology*, 113: 1870-1877, 1983.

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

MARTY, A. Ca^{2+} dependent K^{+} channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature Lond.*, 291:487-500, 1981.

----- & NEHER, E. Ionic channels in cultured rat pancreatic islet cells (abstr.) *J. Physiol. Lond.*, 326: 36P-37P, 1982.

----- ; TAN, Y.; TRAUTMANN, A. Three types of calcium dependent channel in rat lacrimal glands. *J. Physiol.*

Lond., 357:293-325, 1984.

MARUYAMA, Y. & PETERSEN, O.H. Single-channel currents in isolated patches of plasma membrane from basal surface of pancreatic acini. *Nature Lond.*, 299: 159-161, 1982.

----- & ----- . Cholecystokinin activation of single-channel currents is mediated by internal messenger in pancreatic acinar cells. *Nature Lond.*, 300:61-63, 1982.

----- & ----- . Single calcium dependent cation channels in mouse pancreatic acinar cells. *J. Membr. Biol.*, 81:83-87, 1984.

----- ; ----- ; FLANGAN, P. & PEARSON, G.T. Quantification of Ca^{2+} activated K^{+} channels under hormonal control in pig pancreas acinar cells. *Nature Lond.*, 302:228-232, 1983a.

----- ; GALLACHER, V.D. & PETERSEN, O.H. Voltage and Ca activated K channel in basolateral acina cell membranes of mammalian salivary glands. *Nature Lond.*, 302:827-829, 1983b.

MILNER, R.D.G. & HALES, C.N. Cations and the secretion of insulin. *Biochem. Biophys. Acta*, 150:165-167, 1969.

- MISLER, S.; FALKE, L.C.; GILLIS, K. & MACDANIEL, M.L.. A metabolic-regulated potassium channel in rat pancreatic B-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83:7119-7123, 1986.
- MORRIS, A.P.; GALLACHER, D.V. & LEE, J.A.C. A large conductance, voltage and calcium activated K channel in the basolateral membrane of rat enterocytes. *FEBS Lett.*, 206:87-92, 1986.
- MOSKALEWSKI, S. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen. Comparat. Endocrinol.*, 5:342-353, 1965.
- NOMA, A. ATP-regulated K⁺ channel in cardiac muscle. *Nature*, 305:147-148, 1983.
- OHNO-SHOSAKU, T.; ZUNKLER, B.J.; TRUBE, G. Dual effects of ATP on K⁺ currents of mouse pancreatic beta cells. *Pflügers Arch Eur. J. Physiol.*, 408:133-138, 1987.
- PANTEN, U.; BURGFELD, J.; GOERKE, F.; RENNICK, M.; SCHWANSTECHER, M.; WALLASCH, A.; ZUNKLER, B.J. & LENZEN, S. Control of insulin secretion by sulphonylureas, glibenclamide and diazoxide in relation to their binding to the sulphonylurease receptor in pancreatic islets. *Biochem. Pharmacol.*, 38(8):1217-1229, 1989.

PETERSEN, O.H.; FINDLAY, I. Electrophysiology of the pancreas. *Physiological Reviews*, 67(3):1054-1116, 1987.

----- ; ----- ; IWATSUKI, N.; SINGH, J.; GALLACHER, D.V.; FULLER, C.M.; PEARSON, G.T.; DUNNE, M.J. & MORRIS, A.P. Human pancreatic acinar cells: studies of stimulus-secretion coupling. *Gastroenterology*, 89:109-117, 1985.

----- ; MARUYAMA, Y. Cholecystokinin and acetylcholine activation of single-channel currents via second messenger in pancreatic acinar cells. In: single channel recording, edited by B. Sakmann and E. Neher. New York. Plenum, 1983, p.425-435.

----- ; ----- . Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. *Nature Lond.*, 307:693-696, 1984.

RIBALET, B.; CIANI, S. Regulation by cell metabolism and adenine nucleotides of a K⁺ channel in insulin-secreting B cells (RIN m5F). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:1721-1725, 1987.

RINZEL, J. & LEE, Y.S. Dissection of a model for neuronal parabolic bursting. *J. Math. Biol.*, 25: 653-675, 1987.

ROSARIO, L.M. Differential effects of the K channel blockers apamin and quinine on glucose-induced electrical activity in pancreatic B-cells from a strain of ob/ob (obese) mice. FEBS Lett., 188:302-306, 1985.

RORSMAN, P.; TRUBE, G. Glucose dependent K channels in pancreatic beta cells are regulated by intracellular ATP. Pflugers Arch., 405:305-309, 1985.

ROTH, S.H. Physical mechanisms of anesthesia. Ann. Rev. Pharmacol.Toxicol., 19:159-178, 1979.

SCHWARTZ, J.R. The mode of action of phenobarbital on the excitable membrane of the node of ranvier. Eur. J. Pharmacol., 56:51-60, 1979.

SEEMAN, P. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. Pharmacol. Rev., 24:583-655, 1972.

SEHLIN, J. & TALJEDAL, I.B. Transport of rubidium and sodium in pancreatic islets. J. Physiol., 242:505-515, 1974.

----- ; ----- . Glucose-induced decrease in ^{86}Rb permeability in pancreatic B-cell. Nature, 253:635-636, 1975.

SEVCIK, C. Differences between the action of thiopental and pentobarbital in squid giant axon. J. Pharmacol. Exp. Ther., 214:657-663, 1980

SPRUCE, A.E.; STANDEN, N.B.; STANFIELD, P.R.

Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. nature Lond., 316:736-738, 1985.

STURGESS, N.C.; ASHFORD, M.L.J.; CARRINGTON, C.A. & HALES,

C.N. Single channel recordings of potassium currents in an insulin secreting cell line. J. Endocr., 109: 201-207, 1986.

----- ; ASHFORD, M.L.J.; COOK, D.L. & HALES, C.N. The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. Lancet, 845(3):474-475, 1985.

----- ; KOZLOWSKI, H.Z.; CARRINGTON, C.A.; HALES, C.N.; ASHFORD, M.L.J. Effects of sulphonylureas and diazoxide on insulin secretion and nucleotide sensitive channels in a insulin-secreting cell line. Br. J. Pharmacol., 95: 83-94, 1988.

TRUBE, G.; RORSMAN, E. & SHOSAKU, O. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K⁺ channels in mouse pancreatic beta cells. Pflugers. Arch.,

407:493-499, 1986.

YELLEN, G. Single Ca^{2+} activated non-selective Cation channel in neuroblastoma. *Nature Lond.*, 296:357-359, 1982.

ZANINI & ABO. *Farmacologia aplicada*. 3ª edição, São Paulo, Atheneu ed., 1985, pag. 279-280.

ZUNKLER, B.J.; LENZEN, S.; MANNER, K.; PANTEN, U.; TRUBE, G. Concentration dependent effects of tolbutamide, meglitinide, glipizide, glibenclamide, and diazoxide on ATP-regulated K^{+} currents in pancreatic B-cells. *Naunyn-Schwiedeberg s Arch. Pharmacol.*, 337:225-230, 1988.

WONG, B.S.; LECAR, H. & ADLER, M. Single calcium dependent potassium channels in clonal anterior pituitary cells. *Biophys. J.*, 39:313-317, 1982.

A P E N D I C E

TABELA 1 - Analise estatística do efeito da glicose sobre o efluxo do ^{86}Rb , em presença de tolbutamida.

N = 4	(Min)	ESPERADO (VE)	OBSERVADO (VD)	T	P
	42	4.32	4.54	4.4	0.025
	44	4.25	3.97	5.6	0.01
	46	4.19	3.76	10.75	0.01
	48	4.12	3.47	18.57	0.01
	50	4.06	3.37	15.33	0.01
	52	4.04	3.52	5.23	0.01
	54	3.98	3.92	9.27	0.005
	56	3.92	3.08	15.42	0.005
	58	3.87	3.06	9.02	0.005
	60	3.81	3.06	8.40	0.005
	62	2.95	3.20	6.25	0.005
	64	2.88	3.24	18.00	0.005
	66	2.82	3.40	14.5	0.005
	68	2.76	3.64	19.55	0.005
	70	2.70	3.75	10.5	0.005

N = numero de experimentos; VE = Valor esperado; VD = Valor observado; T = Teste de Student; P = Significancia entre VE e VD.

TABELA 2. Analise estatística do efeito da glicose e do tiopental sobre o efluxo do ^{86}Rb , em presença de tolbutamida.

N = 4	(Min)	ESPERADO (VE)	OBSERVADO (VO)	T	P
	42	3.33	3.37	0.09	0.10
	44	3.25	3.37	0.11	0.10
	46	3.17	3.21	0.09	0.10
	48	3.10	2.90	0.50	0.10
	50	3.02	2.70	1.01	0.10
	52	2.95	2.56	1.26	0.10
	54	2.88	2.42	1.48	0.10
	56	2.81	2.35	1.73	0.10
	58	2.75	2.35	1.43	0.10
	60	2.68	2.29	1.52	0.10
	62	2.20	2.26	0.40	0.10
	64	2.17	3.32	5.47	0.01
	66	2.14	4.07	5.51	0.01
	68	2.10	4.07	5.71	0.01
	70	2.07	4.04	6.56	0.005

N = numero de experimentos; VE = Valor esperado; VO = Valor observado; T = Teste de Student; P = Significancia entre VE e VO.

TABELA 3. Analise estatística do efeito do tiopental 0.2 mM sobre o efluxo do ^{86}Rb na presença de tolbutamida 20 g/ml.

N = 4	(Min)	ESPERADO (VE)	OBSERVADO (VO)	T	P
	42	3.75	3.56	2.23	0.10
	44	3.71	3.66	0.16	0.10
	46	3.66	3.51	0.12	0.10
	48	3.61	3.37	0.57	0.10
	50	3.57	3.11	1.80	0.10
	52	3.52	2.96	5.16	0.01
	54	3.48	2.74	7.83	0.005
	56	3.44	2.64	10.67	0.005
	58	3.39	2.51	14.79	0.005
	60	3.35	2.48	58.34	0.005
	62	2.40	2.54	1.16	0.10
	64	2.32	3.16	6.33	0.005
	66	2.25	3.17	30.66	0.005
	68	2.18	3.35	11.14	0.005
	70	2.11	3.32	9.68	0.005

N = Numero de experimentos; VE = Valor esperado; VO = Valor observado; T = Teste de Student; P = Significancia entre VE e VO.

TABELA 4. Analise estatística do efeito do Tiopental 2 mM sobre o efluxo do 86Rb na presença de tolbutamida 2 g/ml.

N = 4	(Min)	ESPERADO (VE)	OBSERVADO (VO)	T	P
	42	3.12	2.82	1.81	0.10
	44	3.06	2.47	3.80	0.025
	46	3.00	2.29	3.22	0.025
	48	2.94	2.28	2.92	0.05
	50	2.88	2.08	1.67	0.10
	52	3.00	1.99	5.36	0.01
	54	2.96	1.87	7.83	0.005
	56	2.92	1.82	7.37	0.005
	58	2.88	1.87	5.34	0.01
	60	2.84	1.96	4.32	0.010
	62	1.90	1.92	0.11	0.10
	64	1.93	2.38	3.10	0.025
	66	1.95	2.65	4.37	0.025
	68	1.98	3.07	4.27	0.025
	70	2.00	2.92	3.60	0.025

N = Numero de experimentos; VE = Valor esperado; VO = Valor observado; T = Teste de Student; P = Significancia entre VE e Vo.

TABELA 5. Analise estatística do tiopental 0.2 mM sobre o efluxo do 86Rb na presença de tolbutamida 100 g/ml.

N = 4	(Min)	ESPERADO (VE)	OBSERVADO (VO)	T	P
	42	3.48	3.24	1.33	0.10
	44	3.42	3.11	1.24	0.10
	46	3.37	3.89	0.93	0.10
	48	3.31	2.65	1.38	0.10
	50	3.26	2.78	1.49	0.10
	52	3.24	2.66	2.26	0.10
	54	3.20	2.72	2.08	0.025
	56	3.15	2.51	4.28	0.01
	58	3.10	2.38	5.37	0.005
	60	3.05	2.38	5.91	0.005
	62	2.22	2.58	1.71	0.10
	64	2.13	3.61	8.70	0.005
	66	2.04	3.64	20.0	0.005
	68	1.96	3.61	8.40	0.005
	70	1.88	3.70	8.87	0.005

N = Numero de experimentos; VE Valor esperado; VO = Valor observado; T = Teste de Student; P = Significancia entre VE e VO.

TABELA 6. Analise estatística do efeito do tiopental 0.2 mM sobre o efluxo do ^{86}Rb na presença de 20 g/ml de diazoxida.

N = 4	(Min)	ESPERADO (VE)	OBSERVADO (VO)	T	P
	42	5.70	5.21	1.92	0.10
	44	5.60	4.31	7.58	0.005
	46	5.51	3.80	11.79	0.005
	48	5.41	3.73	8.40	0.005
	50	5.31	3.67	11.31	0.005
	52	5.22	3.56	66.68	0.005
	54	5.13	3.75	10.26	0.005
	56	5.04	3.45	11.40	0.005
	58	4.95	3.53	25.97	0.005
	60	4.87	3.56	14.58	0.005

N = Numero de experimentos; VE = Valor esperado; VO = Valor observado; T = Teste de Student; P = Significancia entre VE e VO.

TABELA 7. Analise estatística do efeito do tiopental 2 mM sobre o efluxo do ^{86}Rb na presença de diazoxida 20 g/ml.

N = 4	(Min)	ESPERADO (VE)	OBSERVADO (VD)	T	P
	42	6.09	4.90	2.7	0.05
	44	6.02	3.26	12.0	0.005
	46	5.96	2.32	40.44	0.005
	48	5.98	2.29	31.10	0.005
	50	5.82	2.31	41.29	0.005
	52	6.25	2.27	79.77	0.005
	54	6.25	2.23	80.40	0.005
	56	6.24	2.25	49.89	0.005
	58	6.23	2.16	62.66	0.005
	60	6.22	2.15	74.08	0.005

N = Numero de experimentos; VE = Valor esperado; VD = Valor observado; T = Teste de Student; P = Significancia entre VE e VD.

TABELA 8. Analise estatística do tiopental 2 mM sobre o efluxo do 86Rb na presença de diazoxida 100 g/ml.

N = 4	(Min)	ESPERADO (VE)	OBSERVADO (VO)	T	P
	42	5.34	4.37	2.30	0.05
	44	5.26	3.62	10.58	0.005
	46	5.17	3.34	13.07	0.005
	48	5.09	3.22	13.85	0.005
	50	5.01	3.27	9.94	0.005
	52	4.93	3.24	16.10	0.005
	54	4.85	3.32	13.36	0.005
	56	4.77	3.33	11.55	0.005
	58	4.69	3.26	12.49	0.005
	60	4.67	3.22	8.49	0.005

N = Numero de experimentos; VE = Valor esperado; VO = Valor observado; T = Teste de Student; P = Significancia entre VE e VO.

TABELA 9. Analise estatística do efeito da Teofilina 10 mM sobre o efluxo do ^{86}Rb na presença de glicose 8.3 mM.

N = 4	(Min)	ESPERADO (VE)	OBSERVADO (VO)	T	P
	42	.92	1.05	12.97	0.005
	32.5	.88	1.24	3.40	0.05
	33.0	.84	1.40	5.53	0.005
	33.5	.81	1.67	7.80	0.005
	34.0	.77	1.52	5.95	0.005
	34.5	.74	1.55	13.90	0.005
	35.0	.71	1.55	11.62	0.005
	35.5	.68	1.50	34.86	0.005
	36.0	.65	1.53	13.80	0.005
	36.5	.63	1.46	8.49	
	37.0	0.60	1.37		

N = Numero de experimentos; VE = Valor esperado; VO = Valor observado; T = Teste de Student; P = Significancia entre VE e VO.

TABELA 10. Analise estatística da Teofilina 10 mM e Tiopental 2 mM sobre o efluxo do 86Rb na presença de glicose.

N = 4	(Min)	ESPERADO (VE)	OBSERVADO (VO)	T	P
	32	1.18	1.27	1.08	< 0.10
	32.5	1.16	1.20	.43	< 0.10
	33.0	1.14	1.35	1.29	0.10
	33.5	1.12	1.39	2.42	0.05
	34.0	1.10	1.50	3.16	0.05
	34.5	1.08	1.57	3.12	0.05
	35	1.06	1.42	2.27	0.10
	35.5	1.04	1.35	2.41	0.05
	36	1.03	1.33	2.18	0.10
	37	.99	1.15	1.10	< 0.10

N = Numero de experimentos; VE = Valor esperado; VO = Valor observado; T = Teste de Student; P = Significancia entre VE e VO.

TABELA 11. Analise estatística do efeito do Tiopental 2 mM sobre o efluxo do ^{86}Rb na presença de K 50 mM.

N = 4	(Min)	ESPERADO (VE)	OBSERVADO (VD)	T	P
	42	4.93	4.63	0.54	0.10
	44	4.79	3.46	1.90	0.10
	46	4.65	2.76	4.90	0.01
	48	4.51	2.68	5.90	0.001
	50	4.38	2.80	4.38	0.025
	52	4.06	3.01	5.25	0.01
	54	3.91	3.20	6.79	0.005
	56	3.78	2.90	4.19	0.025
	58	3.64	2.64	4.58	0.01
	60	3.52	2.88	2.03	0.10

N = Numero de experimentos; VE = Valor esperado; VD = Valor observado; T = Teste de Student; P = Significancia entre VE e VD.

TABELA 12. Analise estatística do efeito do Tiopental 2 mM sobre o efluxo do BGRb na presença de T.E.A. 20 mM.

N = 6	(Min)	ESPERADO (VE)	OBSERVADO (VO)	T	P
	42	6.02	5.15	10.65	0.005
	44	5.96	4.15	14.77	0.005
	46	5.91	3.96	23.88	0.005
	48	5.86	3.66	26.94	0.005
	50	5.81	3.29	30.86	0.005
	52	5.75	3.29	7.10	0.005
	54	5.70	3.20	9.88	0.005
	56	5.65	2.92	10.45	0.005
	58	5.60	2.78	10.97	0.005
	60	5.55	2.68	20.68	0.005

N = Numero de experimentos; VE = Valor esperado; VO = Valor observado; T = Teste de Student; P = Significancia entre VE e VO.

TABELA 13. Análise estatística do efeito do Tiopental 2 mM sobre o efluxo do ^{86}Rb , de ilhotas perfundidas na presença de tolbutamida 20 g/ml e T.E.A. 20 mM, e na ausência de cálcio e glicose.

N = 4	(Min)	ESPERADO (VE)	OBSERVADO (VD)	T	P
	52	5.61	1.69	13.86	0.005
	54	5.67	1.58	19.96	0.005
	56	5.73	1.57	15.92	0.005
	58	5.80	1.50	33.80	0.005
	60	5.56	1.52	38.42	0.005

N = Número de experimentos; VE = Valor esperado; VD = Valor observado; T = Teste de Student; P = Significância entre VE e VD.

TABELA 14. Analise estatística do efeito da retirada do Tiopental de um meio perfusor contendo T.E.A., diazoxida, além de estar desprovido de Ca e quelado com EGTA

N = 4	(Min)	ESPERADO (VE)	OBSERVADO (VO)	T	P
	42	3.41	4.25	1.8	0.10
	44	3.42	11.78	6.19	0.005
	46	3.42	17.87	5.25	0.01
	48	3.43	11.93	8.50	0.005
	50	3.43	11.64	10.26	0.005
	52	3.44	10.75	9.74	0.005
	54	3.44	10.21	10.40	0.005
	56	3.45	8.76	6.63	0.005
	58	3.45	8.53	6.72	0.005
	60	3.46	11.07	2.97	0.005

N = Numero de experimentos; VE = Valor esperado; VO = Valor observado; T = Teste de Student; P = Significancia entre VE e VO.

TABELA 15. Analise estatística do efeito da adição de diazoxida, sobre o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas perfundidas na presença de T.E.A., e Tiopental, além de estar privado de Ca^{2+} e quelado com 0.5 mM de EGTA.

N = 4	(Min)	ESPERADO (VE)	OBSERVADO (VO)	T	P
	42	1.72	1.91	1.72	0.10
	44	1.67	1.90	1.58	0.10
	46	1.63	1.85	1.62	0.10
	48	1.59	1.74	1.20	0.10
	50	1.54	1.68	2.00	0.10
	52	1.56	1.63	.60	
	54	1.52	1.81	2.08	< 0.10
	56	1.49	1.71	2.15	0.10
	58	1.46	1.67	1.67	0.10
	60	1.42	1.69	20.1	0.10

N = Numero de experimentos; VE = Valor esperado; VO = Valor observado; T = Teste de Student; P = Significancia entre VE e VO.