

ONEIDA DIAS DE CARVALHO

Este exemplar corresponde a Redaç final da Tese defendida
pela Sra ONEIDA DIAS DE CARVALHO e aprovada pela
Comissão Julgadora

Campinas 12/06/84

ABoschero

PERMEABILIDADE AO K^+ E SECREÇÃO DE INSULINA. EFEITO
DO TIOPENTAL

ORIENTADOR: Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero

Tese de Mestrado apresentada ao
Instituto de Biologia da Univer-
sidade Estadual de Campinas para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biológicas - área de
concentração em Fisiologia.

CAMPINAS

1984

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

.....
Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o bronze que soa, ou como o címbalo que retine.

Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fê ao ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei.

O amor jamais acaba; mas, havendo profecias, desaparecerão; havendo línguas, cessarão; havendo ciência passarã.

porque em parte conhecemos, e em parte profetizamos.

Agora, pois, permacem a fê, a esperança e o amor, estes três: porém o maior deles é o AMOR.

Ao Quintino
e
à minha mãe

dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor ANTONIO CARLOS BOSCHERO, pela orientação segura e dedicação constante.

À Professora REGINA CELIA SPADARI, que despertou meu interesse pela pesquisa.

Ao Professor Doutor ANTONIO ARI GONÇALVES, pela presteza com que auxiliou na discussão dos resultados.

Ao Professor Doutor URBANO MORATO F. MEIRELLES e à Professora MELISA MYASAKA SAKAMOTO, pela amizade e apoio constante.

Ao Doutor NELSON DURAN, que gentilmente nos propiciou o uso do cintilador.

Aos colegas LUIS CARLOS REIS, EDSON DELATTRE e MARIA LUIZA DOS SANTOS, pelo auxílio prestado na execução dos experimentos.

E aos demais colegas do Departamento de Fisiologia e Biofísica, que certamente muito contribuíram na minha formação.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP, pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	01
MATERIAL E MÉTODOS	06
RESULTADOS	12
DISCUSSÃO	22
RESUMO E CONCLUSÕES	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

INTRODUÇÃO

Desde a descoberta da insulina, intensos estudos têm sido realizados no sentido de se conhecer não só como tal hormônio exerce seus efeitos metabólicos mas também qual o mecanismo de sua secreção pelas células beta.

O mecanismo da secreção tem sido alvo de trabalho de vários pesquisadores e hoje tem-se uma idéia global de tal processo. É de aceitação geral, que tal mecanismo, induzido pela glicose e/ou outros secretagogos envolve vários processos fisiológicos tais como: metabolismo do agente estimulante, alteração da permeabilidade da membrana a vários íons, resultando num acúmulo intracelular de Ca^{2+} e finalmente a extrusão dos grânulos de insulina (MALAISSE *et alii*, 1978).

PARTICIPAÇÃO DO K^+ NA SECREÇÃO DE INSULINA

GRODSKY & BENNETT (1966) foram os primeiros a demonstrar *in vitro* que aumento da concentração extracelular de K^+ de 4 para 8 mM elevou a secreção de insulina em pâncreas de rato isolado e perfundido na ausência de glicose. Efeito similar foi encontrado quando fragmentos de pâncreas de coelho foram incubados em meio contendo grandes quantidades de K (17 - 60 mM) em presença de concentração não estimulatória de glicose. Sugeriu-se que a despolarização da célula beta induzida por uma elevada concentração extracelular de K^+ causava aumento do influxo de Na^+ (MILNER & HALES, 1968; HALES & MILNER, 1968).

Confirmando e estendendo esses resultados. HOWELL & TAYLOR (1968) e LAMBERT *et alii* (1969) observaram, em pâncreas

de rato adulto ou fetais de coelho, que altas concentrações de K^+ potencializou a secreção de insulina induzida por glicose.

HENQUIN & LAMBERT (1974a,b) estudando detalhadamente os efeitos da retirada ou do aumento da concentração de K^+ no meio perfusor sobre a dinâmica da secreção de insulina concluíram que alterações nas concentrações internas de Na^+ e K^+ interferem em ambas fases de secreção. Nestes casos, aumento da concentração de Na^+ estimula a secreção enquanto que a redução de K^+ inibe a mesma. A redução da concentração de K^+ interfere com o metabolismo celular sendo este provavelmente o fator limitante para que a secreção se processe normalmente.

Na verdade, a ausência de K^+ no meio, pode provocar um efeito estimulatório ou inibitório, dependendo do tempo de exposição das células à referida condição experimental (HALES & MILNER, 1968; HENQUIN & LAMBERT, 1976; HERCHUELZ & MALAISSE, 1980). SOMERS, DEVIS & MALAISSE (1980) enfatizaram que a privação de K^+ induz um efeito estimulatório a curto prazo, atribuído a redistribuição do Ca^{2+} intracelular (SEHLIN, 1981) e um efeito inibitório tardio, certamente devido à redução do K^+ interno que leva à inibição do metabolismo da glicose (SENER, KAWAZU, MALAISSE, 1980).

Uma contribuição importante sobre a participação do K^+ na secreção foi dada ainda em 1974 por SEHLIN & TALJEDAL. Estes observaram que as células beta eram capazes de acumular K^+ na presença de glicose, sugerindo que este acúmulo era devido à redução do efluxo passivo, uma vez que os fluxos de Na^+ não eram modificados. A retenção de cargas positivas pela célula beta, induzida por glicose, provavelmente contribui para a despolarização das suas membranas durante o processo secretório (SEHLIN & TALJEDAL, 1975).

Os resultados observados por SEHLIN & TALJEDAL (1974-1975) foram confirmados e estendidos por uma série de trabalhos a partir de 1977. Assim, tanto a incorporação de $^{42}\text{K}^+$ como de $^{39}\text{K}^+$ foi maior na presença que na ausência de glicose, e drasticamente reduzida pelo bloqueio da bomba de Na^+/K^+ (BOSCHERO *et alii*, 1977). Estes resultados foram comprovados por MALAISSE *et alii* (1978) trabalhando com $^{86}\text{Rb}^+$ e por HENQUIN (1978) com $^{42}\text{K}^+$.

BOSCHERO & MALAISSE (1979) verificaram que a glicose inibiu o efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ mesmo em completa ausência de Ca^{2+} extracelular ou em presença de ouabaina. Demonstraram ainda a necessidade de metabolização da glicose para que tal efeito ocorra, sugerindo a participação em tal processo de nucleotídeos de piridina reduzidos, dados estes comprovados por MALAISSE *et alii*, 1979 e CARPINELLI & MALAISSE (1980a,b).

Tem sido proposto que as células beta, possuem pelo menos dois sistemas de permeabilidade ao K^+ . Uma permeabilidade voltagen sensível (HENQUIN, 1977) e outra Ca^{2+} sensível (HENQUIN *et alii*, 1975). A primeira bloqueada pela tetraetilamônia e a segunda pela quinina. Quanto à tetraetilamônia, HENQUIN (1977) observou que *per se* ela não estimulou a secreção, mas potencializou a mesma em presença de concentrações limiares de glicose. Por outro lado, a quinina, de certa maneira mimetizou a ação da glicose, pois foi capaz de estimular a secreção mesmo na ausência do referido carboidrato.

Nesta altura convém frisar que a indução da despolarização da membrana das células beta, pela retenção de K^+ , é um mecanismo comum à maioria dos secretagogos de insulina sejam eles substratos metabólicos circulantes ou mesmo fármacos (DEAN & MATTHEWS, 1968a,b; MALAISSE *et alii*, 1980; HENQUIN & MEISSNER, 1981 e HENQUIN & MEISSNER, 1982).

Paralelamente à secreção de insulina, as células beta apresentam uma atividade elétrica típica descrita inicialmente por DEAN & MATTHEWS (1968a,b). A análise desta atividade elétrica, corroborando os estudos feitos com a secreção de insulina e/ou fluxos iônicos, mostra efetivamente que a despolarização se deve principalmente a uma redução da permeabilidade ao K^+ (ATWATER, 1980; ATWATER, GONÇALVES & ROJAS, 1982; BOSCHERO *et alii*, 1983).

EFEITO DE BARBITURATOS SÔBRE A PERMEABILIDADE IÔNICA EM MEMBRANAS

Sabe-se que alguns barbituratos, além de sua conhecida ação depressora geral, podem ainda provocar excitação pré anestésica desde contrações musculares moderadas à potentes convulsões. Alguns barbituratos são predominantemente excitatórios como os ácidos barbitúricos CHEB* e DMBB** (THOMSON & TURKANIS, 1973 e HARRIS & STOKES, 1982).

Uma vez que a ação desses fármacos se manifesta a nível de membrana (SEYAMA & NARAHSI, 1975) seria lícito admitir que seus efeitos inibitórios e/ou excitatórios estejam ligados a alterações da permeabilidade iônica principalmente ao Ca^{2+} , Na^+ e K^+ .

De fato, estudos tem demonstrado que barbituratos hipnótico-sedativos e anestésicos aparentemente interferem no acoplamento estímulo-secreção em terminais nervosos, induzindo alterações no transporte de Ca^{2+} . Tal interferência pode advir de dois mecanismos diferentes mas não exclusivos, amplamente aceitos. O primeiro inibindo o influxo de Ca^{2+} e o segundo aumentando o seu efluxo (BLAUSTEIN, 1976; MORGAN & BRYANT, 1976; WALLER & RICHTER, 1980; COTE & WILSON, 1980 e HARRIS & STOKES, 1982).

Quanto aos ions Na^+ um número grande de trabalhos aponta para um efeito inibitório dos barbituratos sobre a permea

* CHEB - ácido barbitúrico 5-(1,3-dimetilbutil)-5-etil

**DMBB - ácido barbitúrico 5-(2 ciclohexilidencetil)-5-etil

bilidade das membranas a esse íon. Já em 1952, LARRABEE & POSTERNAK e em 1956 THESLEFF sugeriram que o bloqueio da excitabilidade celular estava relacionado com a inibição das correntes de Na^+ . Tais observações foram amplamente confirmadas por BLAUSTEIN (1967); NARAHASHI (1969) e SCHUARTZ (1979).

Em relação ao K^+ , as referências são mais escassas. LARRABEE & POSTERNAK (1952) e BARKER & GAINER (1973) sugeriram que as modificações induzidas no Potencial de Ação de axônios pelos barbituratos eram devidas também a alteração da condutância ao K^+ . A grande maioria das referências encontradas na literatura aponta para um efeito inibitório da permeabilidade ao K^+ induzido pelos barbituratos (BLAUSTEIN, 1968; SCHUARTZ, 1979).

Muito provavelmente os efeitos excitatórios provocados por alguns barbituratos estão relacionados com sua capacidade de reduzir a permeabilidade ao K^+ uma vez que a retenção deste cátion no compartimento celular leva à despolarização da membrana.

De fato, SEVCIK (1980) demonstrou que o pentobarbital e especialmente o tiopental tem elevada afinidade pela condutância ao K^+ , estando a membrana em repouso ou despolarizada. Tais fármacos exercem na membrana do axônio uma ação semelhante aquela da Tetraetilamônia, conhecido bloqueador da permeabilidade ao K^+ - voltagem sensível, com exceção de um efeito despolarizante mesmo com a membrana em repouso.

Considerando que a sequência de eventos induzidos pela glicose durante a secreção de insulina tem como um dos passos importantes a retenção de K^+ pelas células beta, o presente trabalho, já apresentado em parte (DIAS *et alii*, 1982), tem como objetivo estudar as possíveis alterações, induzidas pelo tiopental sobre a permeabilidade do K^+ em ilhotas de Langerhans isoladas, com o intuito de se conhecer melhor a participação deste cátion no referido mecanismo da secreção.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos Wistar, de ambos os sexos, de 3 a 5 meses de idade, procedentes do biotério local. Os animais foram mantidos com ração balanceada padrão e água *ad libitum*, enriquecida com um complexo vitamínico, Vita gold.

ISOLAMENTO DAS ILHOTAS DE LANGERHANS

Utilizou-se a técnica descrita por MOSKALENSKI (1965) e LACY-KOSTIANOVSKY (1967), ligeiramente modificada por BOSCHERO, DELATTRE e SANTOS (1980).

Em cada experimento, foram sacrificados de 3 a 4 ratos por concussão cerebral, decapitados para sangria e laparatomizados. Em seguida, o duto biliar comum foi canulado próximo ao hilo do fígado e ocluído na sua porção distal, adjacente ao duodeno. Com finalidade de se promover uma divulsão do tecido acinoso, injetou-se pela cânula 15,0 ml de solução de HANKS, enriquecida com glicose (aproximadamente 0,5 g/l), fluindo através dos dutos pancreáticos em sentido inverso.

O pâncreas foi retirado livre do tecido acinoso e nódulos linfáticos, sendo a seguir, reduzido a fragmentos de aproximadamente $0,5 \text{ mm}^3$ com o auxílio de uma tesoura. Posteriormente, os fragmentos foram transferidos para um tubo de ensaio de 12 x 1,5 cm, contendo 6 a 8 mg de collagenase por pân-

creas. A seguir os fragmentos de pâncreas foram incubados a 37°C durante 14 ± 1 min. sob agitação constante. Nos 10 min. iniciais o conteúdo foi movimentado pela passagem de carbogênio - $95\% \text{O}_2 : 5\% \text{CO}_2$, sendo agitado manualmente no tempo restante. Finda a incubação o material foi submetido a 7 lavagens sucessivas. Nas três primeiras lavagens o mesmo foi concentrado por centrifugação a baixa rotação e nas restantes por decantação. Este procedimento, teve por objetivo eliminar a colagenase, as enzimas digestivas liberadas durante o processo bem como a maior parte do tecido acinoso.

O produto final foi transferido para placas de Petri sendo as ilhotas coletadas sob lupa, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, previamente siliconizada e estirada em bico de Bunsen.

SECREÇÃO DE INSULINA

Grupos de 4 a 8 ilhotas foram transferidas para cubetas contendo 1,0 ml de solução de KREBS, suplementada com 6,0 mM de glicose. Quando necessário, a composição do meio de incubação foi alterada pela introdução de tiopental sódico em diferentes concentrações. Maiores especificações serão dadas em Resultados.

A seguir, acondicionaram-se os recipientes em frascos de vidro, providos com tampa, contendo dispositivo para entrada e saída de Carbogênio (DELATTRE, 1981). O pH foi ajustado com carbogênio por 10 min. Os frascos então completamente vedados, foram incubados por 90 min a 37°C sob constante agitação em banho-maria.

Terminada a incubação, os frascos foram introduzidos em gelo, e uma amostra de cada meio, transferida para tu

bo de ensaio e estocada a -20°C até o instante do radioimunoensaio (RIE).

A avaliação da insulina contida no meio de incubação foi feita através de RIE, utilizando-se para separação do complexo insulina + anticorpo da insulina livre, o polietileno glicol. (DESBUQUOIS & AURBACH, 1971).

Diante da impossibilidade de contar com insulina murina para a confecção da curva de referência, utilizou-se para isso insulina porcina. Como sabidamente, a curva de referência com a insulina porcina não é paralela em relação à curva confeccionada com insulina murina, foi necessário a correção dos valores obtidos através de uma curva de conversão segundo DELATTRE & BOSCHERO (1984).

EFLUXO DO $^{86}\text{Rb}^{+}$

Foram coletadas 200 ilhotas, distribuídas em 2 grupos. A coleta foi feita alternadamente, 50 ilhotas de cada vez, em cada um dos tubos de ensaio 5 x 1 cm, que continha 1,0 ml de KREBS sem glicose.

Após a coleta, os sobrenadantes foram descartados, sendo adicionados 200 μl de KREBS contendo ^{86}Rb (80 $\mu\text{Ci}/\text{Ml}$), enriquecido com 16.7 mM de glicose. Os tubos, após a adição do material radioativo, foram incubados durante 90 min a 37°C sob constante agitação, sendo o pH (7.4) equilibrado durante os 10 min iniciais com carbogênio.

Após a incubação, as ilhotas foram lavadas 4 vezes com solução de KREBS não radioativa e transferidas para uma câmara de perfusão (vol.: 0,3 ml) forrada com um filtro de acetato de celulose com poros de diâmetro igual a 5 μm . A câmara foi ligada a dois recipientes contendo soluções nutritivas por in-

termédio de catêteres e uma torneira com duas saídas. As soluções nutritivas foram mantidas a 37°C e continuamente equilibrado com carbogênio para manutenção em pH 7,4.

A perfusão das ilhotas começou imediatamente após a sua transferência para a câmara, com o meio perfusor percorrendo o sistema na razão de 0,5 ml/min, impelido por uma bomba peristáltica. O meio contendo solução nutritiva proveio do primeiro recipiente até o 30º min, do segundo até 50º min e novamente do 1º recipiente até o 70º minuto, quando a perfusão foi encerrada. As amostras foram coletadas a partir do 12º min a intervalos regulares de dois minutos em frascos de contagem de 20 ml cada. A radioatividade de cada frasco foi avaliada em contador de radiações beta, usando-se para isso o efeito CERENKOV.

Em cada experimento, o efluxo de ^{86}Rb (cpm/min) será expresso em termos da taxa fracional de efluxo encontrado no mesmo.

RADIOISOTOPOS 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 (PA). Albumina bovina fração $\bar{v}$, Colagenase, Dimetil Sulfoxide (DMSO) e menadione foi da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.) e Tiopental da Abbot Laboratories (Ni. Chicago). $^{86}\text{Rb}^+$ e frascos de polietileno para contagem de radiação foi da New England Nuclear Corp. (Boston, Mo). Filtro foi da Millipore Corp. (Bedford, Mass.) e Complexo vitamínico Vitagold do Lab. Tortuga (São Paulo, SP.). Bomba peristáltica: Holter pump S-900 Extracorporeal Med. Spec. Inc. (King Prussia, Pa). Insulina porcina e bovina, cristalizadas, foi da Eli Lilly Lab. Indianópolis, Ind.).

SOLUÇÕES

SOLUÇÃO DE HANKS

A solução para isolamento de ilhotas foi preparada segundo a composição salina descrita por HANKS & WALLACE (1949), apresentando a seguinte fórmula:

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

No momento de uso adicionaram-se 0.5 g/l de glicose.

A solução de KREBS tem a seguinte composição:

Solução I	NaCl (0.460 M)	500 ml
		13.443 g
Solução II	NaHCO ₃ (0.096 M)	4.0325 g
	KCl (0.020 M)	0.7456 g
	MgCl ₂ .6H ₂ O (0.004 M)	0.4067 g
Solução III	CaCl ₂ .2H ₂ O (0.004 M)	0.29405g

Para a confecção final da solução de KREBS adiciona-se:

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

TRATAMENTO ESTATÍSTICO

TESTE T de STUDENT

Para avaliar a magnitude da variação do efluxo do ⁸⁶Rb calculou-se para cada experimento a diferença entre os valores registrados depois da alteração da condição experimental (30^omin) e os esperados, calculados pela extrapolação da curva exponencial baseada nos dados obtidos antes da alteração (12^o ao 30^o min).

A significância estatística tanto para o efluxo do ⁸⁶Rb quanto para a secreção de insulina foi avaliado pela aplicação do teste t de Student sendo os resultados expressos como médias e seus respectivos erros padrões.

O tratamento referido foi utilizado para a confecção da Tabela 1 e Figura 7.

RESULTADOS

EFEITO DO TIOPENTAL SOBRE O EFLUXO DO $^{86}\text{Rb}^+$ DE ILHOTAS ISOLADAS

A Figura 1 ilustra o efeito de 16.7 mM de glicose sobre o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas perfundidas durante 70 min. A introdução de glicose no 30^o min de perfusão induziu uma rápida e persistente redução do efluxo. O cálculo dos valores reais do efluxo observados para o 34^o, 36^o e 38^o min. de perfusão quando comparados com os valores teóricos obtidos pela extrapolação da curva para os respectivos minutos foram altamente significativos como demonstra a Tabela (linha 1). A retirada da glicose do meio perfusor no 50^o min. reverteu o efluxo para valores semelhantes aqueles observados no período que precedeu a introdução da hexose (min. 52-70).

As Figuras 2, 3 e 4 ilustram o efeito do tiopental (0.2 mM) sobre o efluxo do ^{86}Rb . Observa-se que na ausência ou presença de 6.0 mM de glicose o tiopental induziu uma significativa redução do efluxo do isótopo durante todo tempo em que esteve presente no líquido perfusor (min. 30-50). A Tabela mostra que, tanto na ausência como na presença de 6.0 mM de glicose, os valores reais de efluxo obtidos nos min assinalados (com exceção do min. 34 para glicose 6.0 mM) são diferentes daqueles calculados pela extrapolação da curva (linha 2 e 3).

Quando a concentração de glicose foi elevada para 16.7 mM (Fig. 4) o efeito da introdução do tiopental (0.2mM) foi bastante atenuado, com diferença significativa observada apenas no 38^o min., como pode ser observado pela Tabela (linha 4). As Figuras 2 e 3, mostram ainda que o efeito do tiopental

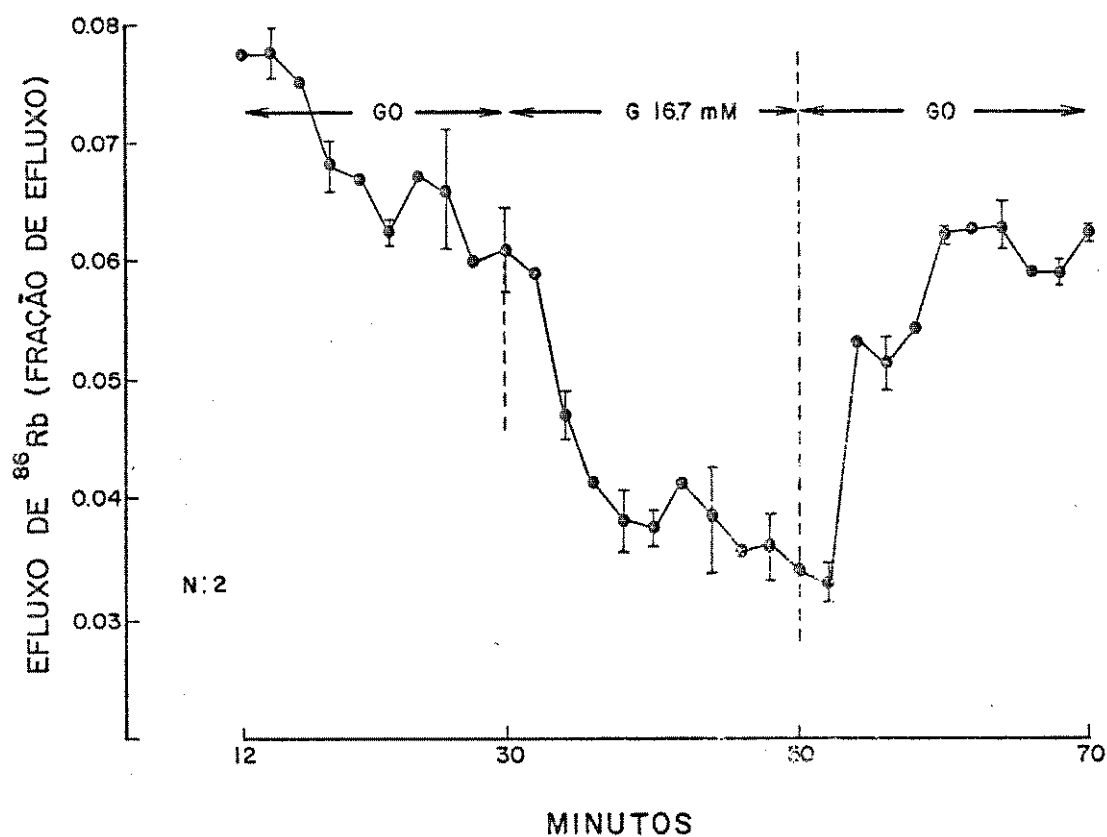


FIGURA 1. Efeito da adição de glicose (G 16.7 mM) sobre o eflu_xo de ^{86}Rb . O eflu_xo foi expresso em termos de taxa fracional do eflu_xo de 12^o ao 70^o min de perfusão. Valores das médias $\pm$ erro padrão são mostrados para cada grupo de experimentos (n). As linhas verticais tracejadas indicam o intervalo no qual o l_iquido per_fusor derivou de uma determinada reserva.

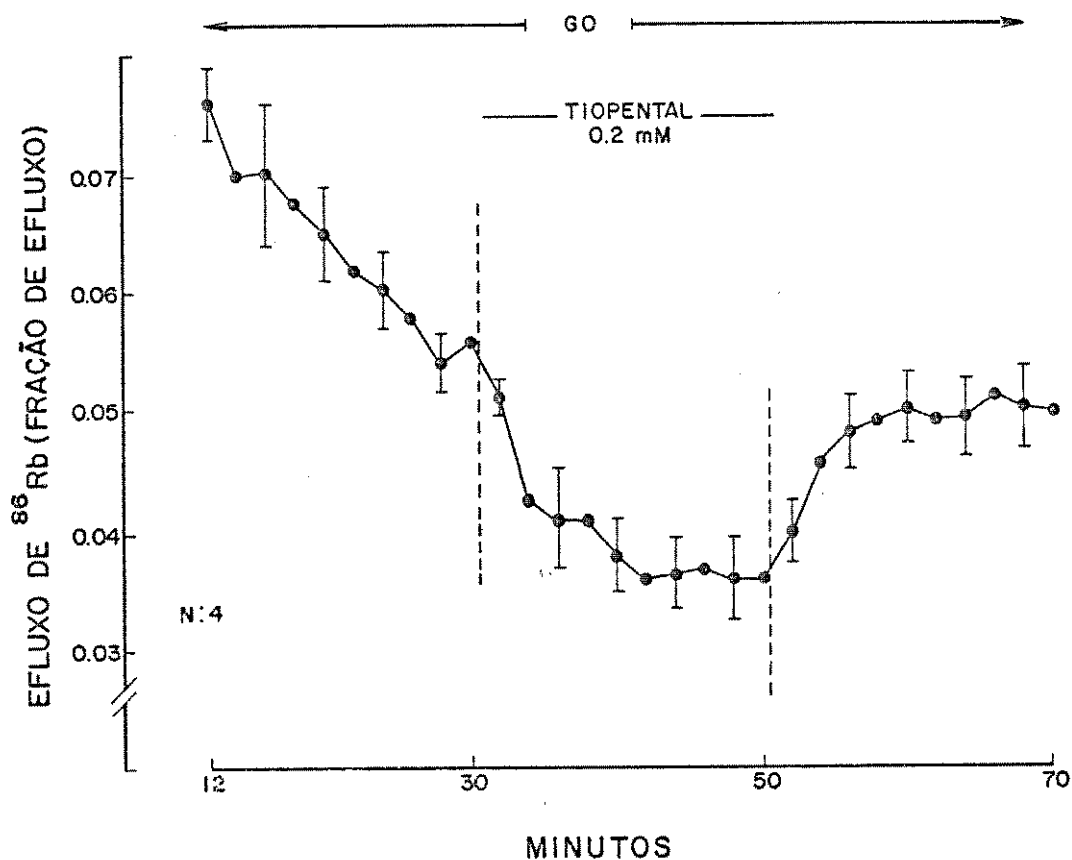


FIGURA 2. Efeito do Tiopental 0.2 mM, sobre o efluxo de ^{86}Rb . Os experimentos ($n = 4$) foram realizados na ausência de glicose e a droga foi introduzida entre o 30° e 50° min. como indicadas pelas barras verticais. São indicados na figura as médias ($\pm$ erro padrão).

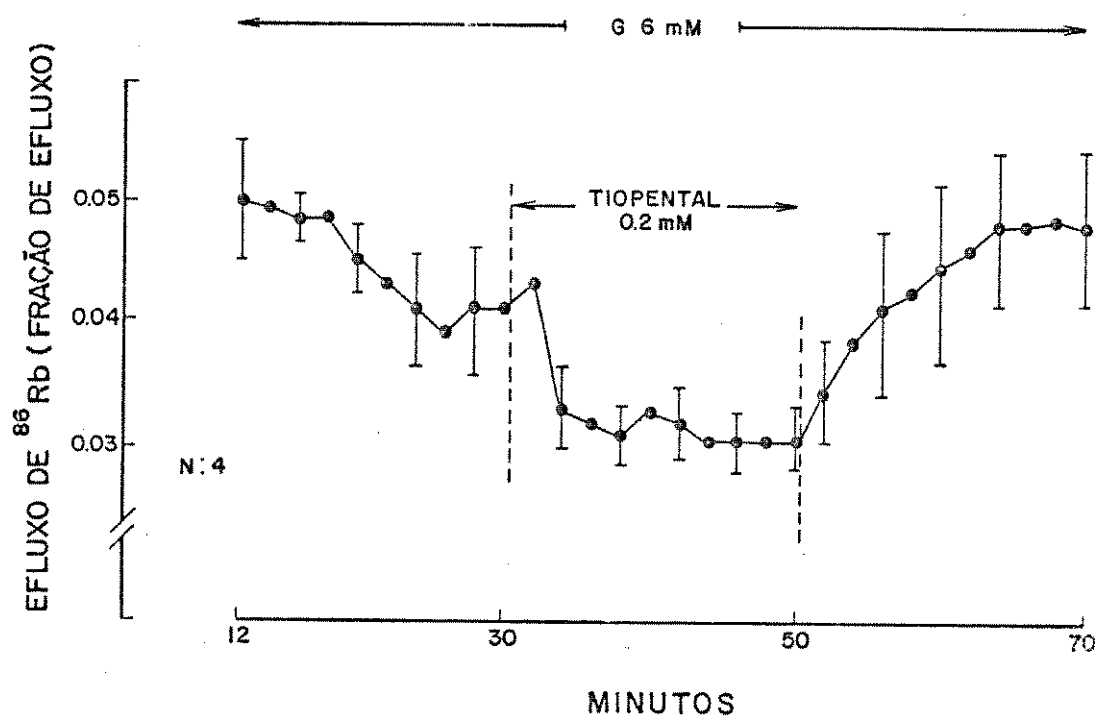


FIGURA 3. Efeito do Tiopental sobre efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ na presença de G 6 mM. A glicose esteve presente durante toda a perfusão (0-70 min) e o Tiopental do 30^o ao 50^o min como indicado pelas linhas tracejadas. São indicadas na figura as médias ($\pm$ erro padrão).

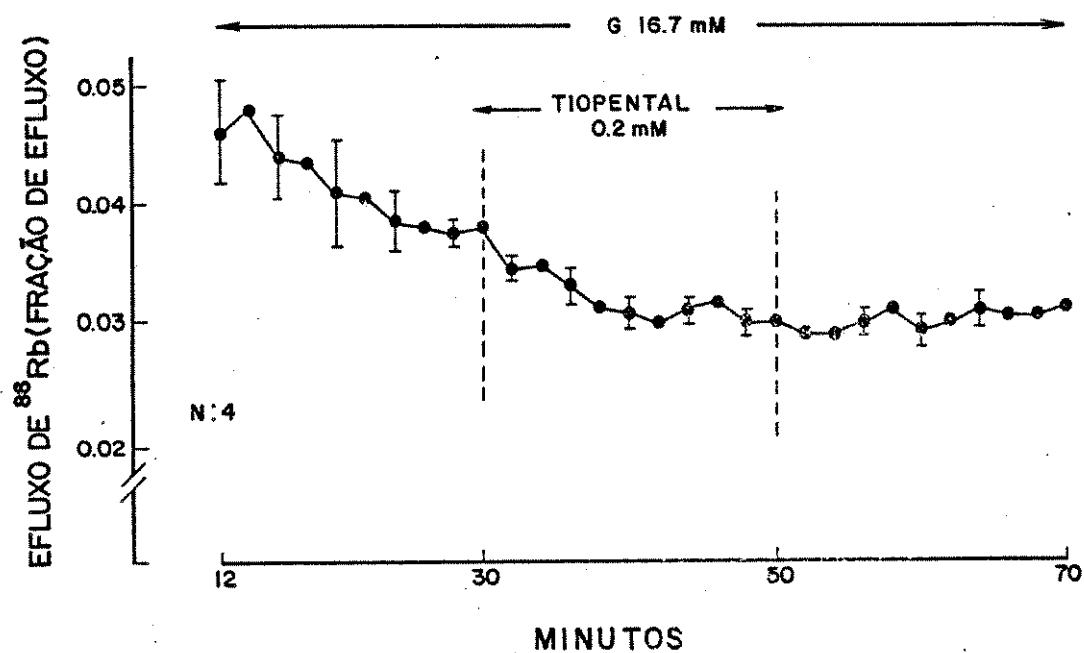


FIGURA 4. Efeito do Tiopental (0.2 mM) sobre o efluxo do ^{86}Rb na presença de 16.7 mM de glicose. O anestésico foi introduzido no meio perfusor durante o intervalo do 30º a 50º min, indicado na figura pelas barras verticais. São indicados na figura as médias ($\pm$ erro padrão).

foi rapidamente revertido após sua retirada do meio perfusor.

A Figura 5 ilustra o efeito da Menadione ($20\mu\text{M}$), conhecido aceptor de H^+ , que impede a formação de nucleotídeos de piridina reduzidos, sobre o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas perfundidas na ausência de glicose. A introdução de Menadione no 30º min induziu um ligeiro e duradouro aumento do efluxo de ^{86}Rb , dado este confirmado pela Tabela (linha 5) pelo menos para os minutos 36 e 38.

A retirada da Menadione no 50º min de perfusão não reverteu o efeito estimulatório da mesma sobre o efluxo do ^{86}Rb que persistiu até o final do período de perfusão (min 70).

Finalmente a Figura 6 mostra que a Menadione introduzida no meio de perfusão juntamente com 0.2 mM de tiopental não foi capaz de inibir a redução do efluxo de ^{86}Rb induzido pelo barbiturato, embora uma tendência de aumentar o efluxo se manifeste após o min 44 de perfusão. A Tabela mostra valores significativamente diferentes entre os valores reais e os extrapolados teoricamente para os minutos 34, 36 e 38 (linha 6).

EFEITO DO TIOPENTAL SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA POR ILHOTAS DE LANGERHANS

A Figura 7 mostra o efeito de diferentes concentrações de tiopental sobre a secreção de insulina por ilhotas isoladas e incubadas em presença de 6.0 mM de glicose. Na ausência de tiopental a secreção atingiu 90.0 ± 3.6 ($N = 10$) $\mu\text{U}/$ ilhota por 90 min. Em concentração de 0.05 e 0.1 mM de tiopental não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0.3$ e $p < 0.15$). Tiopental (0.2 e 1.0 mM), potencializou a secreção, com esta aumentando respectivamente 16.6 e 33.3% em relação ao controle ($p < 0.01$ e $p < 0.0005$).

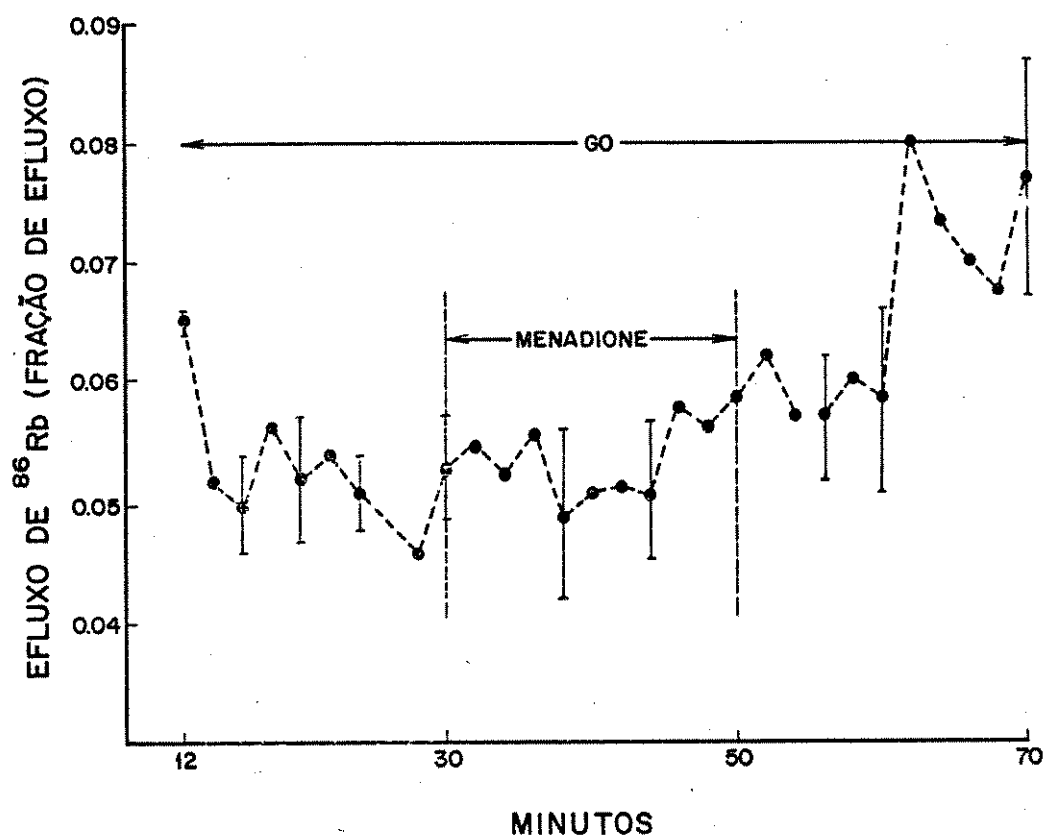


FIGURA 5. Efeito da Menadione sobre o efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$. Ilhotas isoladas foram submetidas a perfusão por 70 min na ausência de glicose. Menadione (20 μM) esteve presente no intervalo de 30-50 min como indicado pelas linhas tracejadas verticais. São indicadas na figura as médias ($\pm$ erro padrão).

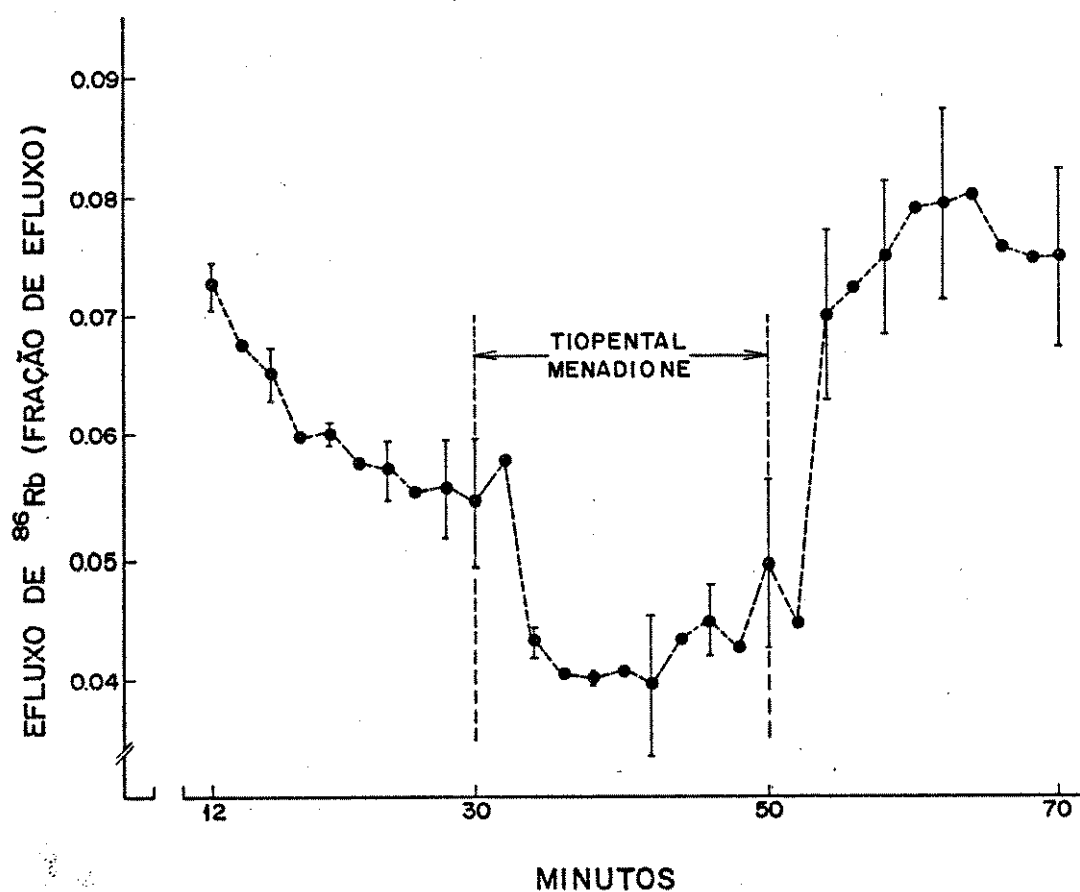


FIGURA 6. Efeito da Menadione (20 μM) e do Tiopental (0,2 mM) sobre o efluxo de ^{86}Rb na ausência de glicose. As linhas tracejadas indicam o momento da introdução e retirada de ambas as substâncias no meio perfusor. São indicadas as médias ($\pm$ erro padrão).

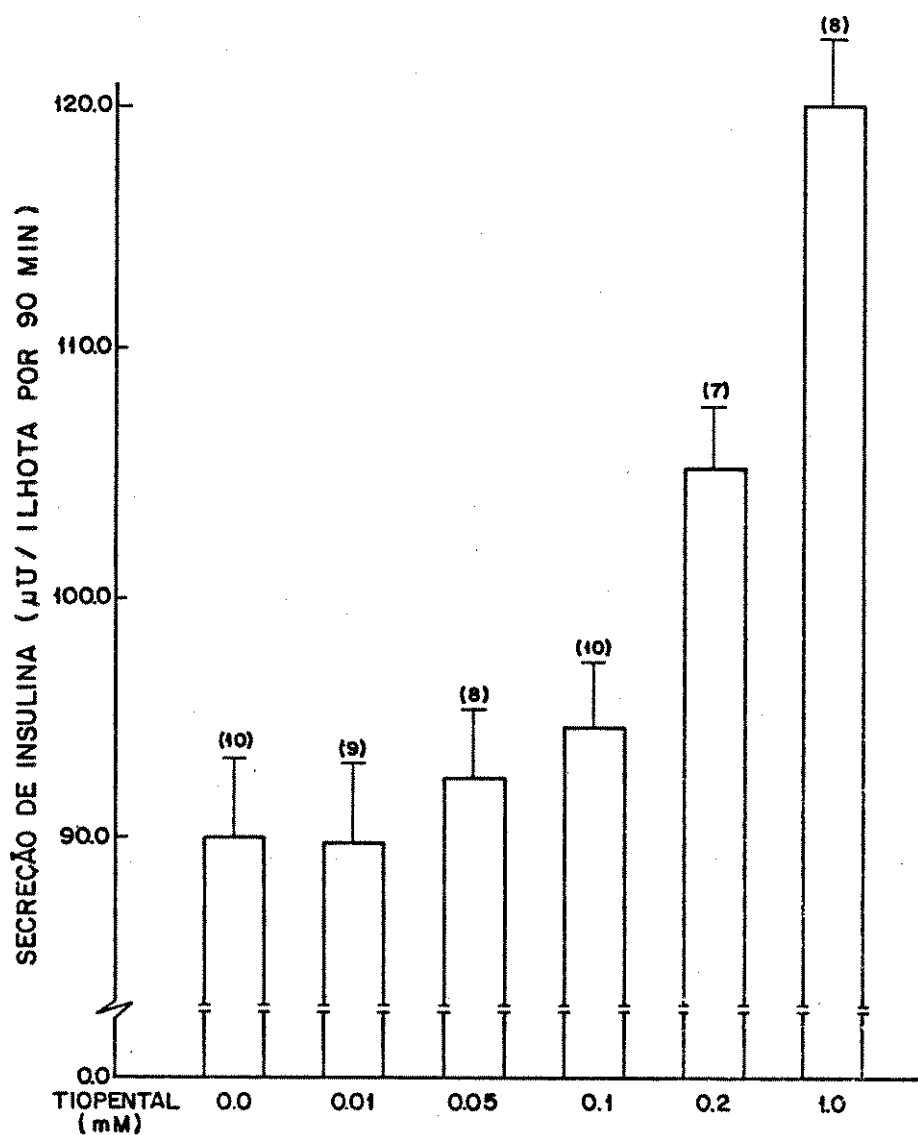


FIGURA 7 - Efeito do tiopental sobre a secreção de insulina estimulada por 6.0 mM de glicose. Representaram - se as médias ($\pm$ erro padrão) do número de observações indicado por n.

TABELA

Efeito de vários agentes sobre o efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$.

Figura	Condição	Condição de Alteração	34°	36°	38°
1	Krebs + Glicose 16.7 mM	Glicose zero 16.7 mM	0.0005	0.025	0.0005
2	Krebs	Tiopental zero 0.2 mM	0.01	0.05	0.05
3	Krebs + Glicose 6.0 mM + Tiopental 0.2 mM	Tiopental zero 0.2 mM	0.1	0.05	0.05
4	Krebs + Glicose 16.7 mM	Tiopental zero 0.2 mM	0.35	0.2	0.05
5	Krebs + Menadione 20 M	Menadione zero 20 M	0.15	0.025	0.05
6	Krebs + Menadione 20 M + Tiopental 0.2 mM	Menadione zero 20 M Tiopental zero 0.2mM	0.0005	0.025	0.005

LEGENDA: A primeira coluna indica as condições experimentais aplicadas durante os 70 minutos de perfusão. A segunda coluna menciona a alteração introduzida no 30^o min de perfusão. As colunas subsequentes referem-se à significância das diferenças entre os valores teóricos obtidos pela extrapolação do registro coletado antes dos 30 minutos. e os reais observados respectivamente no 34°, 36° e 38° mins. da perfusão. Os registros estão agrupados de acordo com a ordem em que aparecem nas figuras.

DISCUSSÃO

O emprego do tiopental aumentou consideravelmente desde sua introdução, atingindo popularidade provavelmente não igualada por qualquer outro anestésico. Embora os sais de sódio do hexobarbital, quemital, tiamital e metohexital sejam usadas como anestésicos intravenosos, o tiopental é o que se usa mais frequentemente. (PRICE & DRIPPS, 1973).

A exemplo da maioria dos barbituratos, o tiopental é usado sempre quando se deseja obter um grau de depressão inespecífica.

Outros efeitos da droga têm sido relatados na literatura tais como a nível respiratório, ou mesmo prevenção contra isquemia e indução de liberação de histamina (REIZ *et alii*, 1981; SKOOGH *et alii*, 1982; ASTRUP, 1980; HIRSHMAN, PETERS & CARTWRIGHTLEE, 1982).

Vários estudos farmacológicos têm demonstrado que os barbituratos, à semelhança dos anestésicos locais reduzem a condutância ao Na^+ e K^+ (TAYLOR, 1959; SHANES *et alii*, 1959; BLAUSTEIN, 1968; SEVCIK, 1980).

No presente trabalho, propusemo-nos investigar as possíveis alterações sobre o efluxo de ^{86}Rb e secreção de insulina em ilhotas de Langerhans, induzidas pelo barbiturato tiopental, bem como estudar os mecanismos envolvidos na produção dessas alterações.

Como já descrito na Introdução, a velocidade de efluxo do ^{86}Rb de ilhotas isoladas é menor na presença que na

ausência de glicose. Em ambos os casos o efluxo diminui exponencialmente refletindo saída passiva do ^{86}Rb das células (BOSCHERO & MALAISSE, 1979). De fato, como pode ser observado na Figura 1, a introdução de 16.7 mM no meio perfusor, reduziu significativamente o efluxo de ^{86}Rb , o qual voltou aos níveis anteriores somente após a retirada da glicose do meio. O efeito da glicose sobre o efluxo de ^{86}Rb pode ser observado também quando se compara o efluxo deste isótopo durante a primeira parte das Figuras 2, 3 e 4 (min 12 ao 30), respectivamente em presença de 6.0 e 16.7 mM, com período idêntico ao da Figura 1, quando o efluxo foi registrado na ausência de glicose. Tais resultados corroboram inúmeras observações encontradas na literatura (HENQUIN, 1978; HENQUIN & MEISSNER, 1982; BOSCHERO *et alii*, 1977; MALAISSE *et alii*, 1978; SEHLIN, 1975) sobre o efeito da glicose no efluxo de ^{86}Rb e, ao mesmo tempo oferece segurança necessária indicando que o sistema de perfusão empregado no presente trabalho apresenta-se em condições satisfatórias.

Uma vez observado o efeito da glicose sobre o efluxo do ^{86}Rb passamos a estudar as possíveis alterações provocadas pelo tiopental (0.2 mM) sobre o referido parâmetro. Esta concentração utilizada foi escolhida após verificação que a mesma potencializou significativamente a secreção de insulina por ilhotas isoladas e incubadas durante 90 min em presença de 6.0 mM de glicose (Figura 8). Estudos de atividade elétrica em células beta confirmam essas observações e, mostram ainda, que a aplicação do tiopental potencializa o efeito de concentrações sublimiáres de glicose despolarizando a membrana de tal célula e induzindo potenciais de ação. (BOSCHERO E GONÇALVES, 1982; BOSCHERO, GONÇALVES & LANGONE, 1982). Na ausência de glicose, o tiopental reduziu significativamente o efluxo do ^{86}Rb

como mostra a Figura 3. Tal redução permaneceu numa concentração de 6.0 mM de glicose mas foi desprezível quando se elevou a concentração de glicose para 16.7 mM. Esses efeitos sugerem um efeito aditivo do tiopental ao da glicose. Aliás, resultados semelhantes a estes foram observados por HERCHUELZ (1980) e CARPINELLI & MALAISSE (1980), quando da utilização do TEA, substância que sabidamente bloqueia os canais de K^+ sensíveis a voltagem e por HENQUIN *et alii* (1975) quando da utilização da quini-na, substância que inibe o efluxo de K através do bloqueio de permeabilidade ao K^+ sensível ao Ca^{2+} .

Além das substâncias referidas no parágrafo acima, outras são capazes de aumentar secreção de insulina e reduzir o efluxo de ^{86}Rb tais como a Tolbutamida, aminoácidos, ácidos graxos, etc. (MALAISSE *et alii*, 1980; HENQUIN, 1981; HENQUIN & MEISSNER, 1981). Os efeitos dos aminoácidos, dos ácidos graxos bem como a própria glicose estão diretamente relacionados com sua metabolização pela célula beta, com suas ações sobre a referida permeabilidade se processando indiretamente, ou seja, através da alteração do estado redox da célula e consequente geração de ATP e principalmente H^+ e NAD(P)H (MALAISSE *et alii*, 1979a, b, c; MALAISSE *et alii*, 1980; BOSCHERO *et alii*, 1983; PANTEN & ISHIDA, 1975; PANTEN *et alii*, 1973).

Como o pentobarbital (entre 2.0 e 3.0 mM) interfere com o metabolismo celular, induzindo aumento da concentração de NAD(P)H, seria lícito supor que também a ação do tiopental, sobre a permeabilidade ao K^+ na membrana, fosse consequência indireta e resultante de seu efeito sobre o metabolismo celular.

Para melhor esclarecer esta questão, realizaram-se experimentos com a menadione, substância aceptora de H^+ e que se mostrou efetiva em reduzir a formação de NAD(P)H em ilhotas isoladas (MALAISSE *et alii*, 1978).

Em condições basais (na ausência de glicose e tiopental) a menadione (20 M) aumentou significativamente a taxa de efluxo do $^{86}\text{Rb}'$, o qual persistiu mesmo após a retirada da droga do meio perfusor (Figura 5). A introdução concomitante de tiopental e menadione no meio perfusor provocou uma significativa redução do efluxo de ^{86}Rb (Figura 6) semelhante àquele observado quando da introdução somente de tiopental (Figura 2).

Considerando-se que numa concentração semelhante de menadione, a secreção de insulina induzida por 16.7 mM de glicose foi totalmente abolida e, que a capacidade da glicose em reduzir o efluxo do $^{86}\text{Rb}'$ também foi drasticamente alterada (MALAISSE *et alii*, 1978), fica difícil afirmar que, o efeito do tiopental na concentração 0.2 mM, sobre o efluxo nas células beta seja via aumento da concentração de NAD(P)H.

A exemplo da ação em outros tecidos, é provável que também nas células beta, o tiopental aja diretamente a nível de membrana inibindo preferencialmente a permeabilidade ao K^+ .

O efeito do tiopental sobre o efluxo do ^{86}Rb pode ser comparado com aquele observado por HERCHUELZ (1980) e CARPINELLI & MALAISSE (1980) usando a TEA. Contudo, em situação experimental semelhante, o efeito potencializador da TEA sobre a secreção de insulina foi muito maior que aquele observado quando do uso do tiopental. Isto nos leva a considerar que possivelmente o tiopental aja em outras etapa(s) da secreção interferindo negativamente na(s) mesma(s). A propósito, HELMAN (1977) sugere que o pentobarbital participa da redistribuição do Ca^{2+} intracelular. Recentemente, experimentos pilotos indicam uma possível redução da incorporação de Ca^{2+} por ilhotas durante 90 min. (BOSCHERO, comunicação pessoal). Tal redução pode ser imputada a

5622/PC

uma rápida redução da permeabilidade ao Ca^{+} quando do emprego de glicose mais tiopental.

Concluindo, o presente trabalho mostra que o tiopental, na concentração de 0.2 mM, potencializa a secreção de insulina provavelmente através da redução da permeabilidade do K^{+} na membrana das células β . Os resultados obtidos com a menadione indicam uma ação direta do anestésicos sobre a membrana ao invés de uma ação indireta via aumento dos nucleotídeos de piridina reduzidos nas células secretoras de insulina.

RESUMO E CONCLUSÕES

Com o presente trabalho objetivamos estudar os efeitos do tiopental sobre a secreção de insulina e a permeabilidade ao K^+ em ilhotas isoladas. Tal propósito advém do fato desse anestésico reduzir a permeabilidade ao K^+ em outros tecidos.

Na realização do projeto utilizaram-se ilhotas isoladas com as quais se mediram a secreção de insulina e o efluxo de ^{86}Rb (substituto do K^+).

Para a secreção de insulina, ilhotas de Langerhans isoladas pelo método da collagenase foram incubadas durante 90 min a 37° na presença de 6.0 mM de glicose e diferentes concentrações de tiopental. Após a incubação avaliou-se a secreção pela técnica de RIE.

Para análise do efluxo de ^{86}Rb , grupos de 100 ilhotas cada foram pré incubados durante 90 min, lavados 4 vezes e transferidos para uma câmara de 0.25 ml contendo filtro milipore e perfundidos com o auxílio de uma bomba peristáltica na razão de 0.5 ml/min durante 70 min. A solução perfusora provinha de dois recipientes, sendo que a solução controle foi mantida no 1º frasco e, no 2º, as substâncias em estudo. O perfusato durante os 30 minutos iniciais foi proveniente do 1º frasco, do 30º min ao 50º min proveniente do 2º frasco e do 1º frasco até o final da perfusão. O efluente coletado a cada 2 min foi avaliado em termos de fração de efluxo.

Os resultados obtidos foram:

1. Em presença de 6.0 mM de glicose, tiopental (0.2 mM) aumentou significativamente a secreção de insulina, nas concentrações 0.2 e 1.0 mM.
2. Na ausência ou presença de 6.0 mM de glicose, tiopental reduziu significativamente o efluxo de ^{86}Rb .
3. Em presença de 16.7 mM de glicose, o efeito de tiopental foi praticamente inexistente.
4. Tiopental (0.2 mM) reduziu significativamente o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ na presença de Menadione.
5. Em todas as perfusões o efeito do tiopental foi rápido e imediatamente revertido quando da sua retirada do líquido perfusor.

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. Na ausência ou presença de concentrações sublimiares de glicose, o tiopental na concentração de 0.2 mM induz a um bloqueio da permeabilidade ao K^+ . Este efeito parece ser aditivo ao da glicose uma vez que em 16.7 mM de glicose o tiopental praticamente não reduz a permeabilidade de tal íon.
2. O efeito do tiopental sobre a retenção de K^+ parece ser predominantemente um efeito de membrana.
3. A potencialização da secreção de insulina pelo tiopental em

presença de 6.0 mM de glicose provavelmente foi devido a um bloqueio da permeabilidade ao K.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTRUP, J. Barbiturate protection in focal cerebral ischemia. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 40:201-203, 1980.

ATWATER, I. Control mechanism for glucose induced changes in the membrane potential of mouse pancreatic β -cell. *Ciênc. Biol.*, 5: 299-315, 1980.

_____; GONÇALVES, A.A., ROJAS, E. Eletrophysiological measurement of on oscillating potassium permeability during the glucose-stimulated burst activity in mouse pancreatic β -cell. *Biom. Research*, 3:645-648, 1982.

BARKER, J.L. & GAINER, H. Pentobarbital: Selective depression of excitatory postsynaptic potentials. *Science*, 182:720 - 722, 1973.

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

_____. Barbiturates block calcium uptake by stimulated and potassium despolarized rat sympathetic ganglia. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 196:80-86, 1976.

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

- _____ ; MALAISSE, W.J. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXIX. Regulation of $^{86}\text{Rb}^+$ efflux from perifused islets. *Am. J. Physiol.*, 236:E139-146, 1979.
- _____ ; DELATTRE, E. & SANTOS, M.L. Isolamento de ilhotas de Langerhans de rato. (Apresentado ao 12º Congresso Brasileiro de Fisiologia, Ribeirão Preto, 1980).
- _____ ; GONÇALVES, A.A. Permeabilidade da membrana das células beta ao K^+ : Efeito do tiopental (T) sobre a atividade elétrica (AE). *Ciência e Cultura*, 34(Supl. 5):672, 1982.
- _____ ; _____ ; LANGONE, F. Tiopental induz alterações da permeabilidade ao K^+ nas células beta: Efeitos sobre o potencial e a resistência da membrana. *Anais do VII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Biofísica*, Rio de Janeiro, p. 77, 1982.
- _____ ; _____ ; DAWSON, O.M.; ATWATER, I.J.; ROJAS, E. Valinomycin inhibition of the electrical activity of mouse pancreatic β -cells. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 16:153-160, 1983.
- CARPINELLI, S.R.; MALAISSE, W.J. Regulation of ^{86}Rb outflow from pancreatic islets. IV. Effect of cyclic AMP, Dibutyryl - cyclic AMP and theophylline. *Acta diabet. lat.*, 17:199-205, 1980a.
- _____ ; _____. Regulation of ^{86}Rb outflow from pancreatic islets. II. Effect of changes in extracellular and intracellular pH. *Diab. & Metabolisme*, 6:193-198, 1980b.

COTE, I.L.; WILSON, W.A. Effects of barbiturates on inhibitory and excitatory responses to applied Neurotransmitters in *Aplysia*. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 214: 161-165, 1980.

DEAN, P.M.; MATTHEWS, E.K. Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature*, 219: 389-390, 1968a.

———; ———. Alloxan on islet cell membrane potentials. *Br. J. Pharmac. Chemother*, 34: 667, 1968.

———; ———. Electrical activity in pancreatic islet cells, of ions. *J. Physiol.*, 210: 265-275, 1970.

DELATTRE, E. Efeitos de Antibióticos aminoglicosídicos da família da Gentamicina sobre a secreção de insulina. Tese de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, 1981.

——— & BOSCHERO, A.C. Validação de um Radioimunoensaio para a dosagem de insulina murina. *Ciência e Cultura*: 36:107-114, 1984.

DESBUQUOIS, B. & AURBACH, G.D. Use of polyethylene-glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radio-immunoassays. *J. Clin. Endocr. Metabol.*, 33:732-738, 1971.

DIAS, O.; REIS, L.C.; DELATTRE, E.; GONÇALVES, A.A. & BOSCHERO, A.C. K-Permeability and insulin secretion: Effect of thio-pental. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 15:303, 1982.

GRODSKY, G.M.; BENNET, L.L. Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas. *Diabetes*, 15:910-913, 1966.

HALES, C.N.; MILNER, R.D.G. The role of sodium and potassium in insulin secretion from rabbit pancreas. *J. Physiol. (Lond.)*, 194: 725-743, 1968.

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

HARRIS, R.A.; STOKES, J.A. Effects of a sedative and a convulsant barbiturate on synaptosomal calcium transport. *Brain Res.*, 242: 157-163, 1982.

HELLMAN, B. Calcium and pancreatic β -cell function. I. Stimulatory effects of pentobarbital on insulin release. *Biochimica et Biophysica Acta*, 497: 766-74, 1977.

HENQUIN, J.C: & LAMBERT, A.E. Cationic environment and dynamics of insulin secretion. II. Effect of high concentration of potassium. *Diabetes*, 23: 933-942, 1974.

———; ———. Cationic environment and dynamics of insulin secretion. III. Effect of the absence of potassium. *Diabetologia*, 10: 789-794, 1974b.

———; HOREMANS, B.B.; NENQUIN, M.; VERNIERS, J.; LAMBERT, A. E. Quinine-induced modifications of insulin release and glucose metabolism by isolated pancreatic islets. *FEBS LETT.*, 67: 371-374, 1975.

———; LAMBERT, A.E. Potassium ions and insulin release. *J. Physiol.*, 72: 747-756, 1976.

———. Tetraethylammonium potentiation of insulin release and inhibition of rubidium efflux in pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 77: 551-556, 1977.

———. D-Glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islet cells. *Nature*, 271: 271-273, 1978.

———; MEISSNER, H.P. Effects of amino acids on membrane potential and $^{86}\text{Rb}^+$ fluxes in pancreatic β -cells. *Am. J.*, 240: E245-E252, 1981.

——— & ———. Opposite effects of tolbutamide and Diazoxide on $^{86}\text{Rb}^+$ fluxes and membrane potential in pancreatic β -cells. *Biochemical Pharmacology*, 31:1407-1415, 1982.

HERCHUELZ, A. Regulation des flux calciques dans us ilots de Langerhans. These presentee en vue de l'obtention du grade D'Agrege de l'enseignement superieur Universete Libre de Bruxelles, 1980.

HIRSHMAN, C.A.; PETERS, J.; CARTWRIGHT-LEE, I. Leukocyte histamine release to Thiopental. *Anesthesiology*, 56: 64-67, 1982.

HOWELL, S.L.; TAYLOR, K.W. Potassium ions and the secretion of insulin by islets of Langerhans incubated in vitro. *Biochem. J.*, 108: 17-24, 1968.

LACY, P.E. & KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, 16: 35-39, 1967.

LARRABEE, M.G.; POSTERNAK, J.M. Selective action of anesthetics on synapses and axons in mamalian sympathetic ganglia . *J. Neurophysiol.*, 15: 91-114, 1952.

LAMBERT, A.E.; JEANRENAUD, B.; JUNOD, A.; RENOLD, A.E. Organ culture of fetal rat pancreas II. Insulin release induced by amino and organic acids, by hormonal peptides by cationic alterations of the medium and by others agents. *Biochim. Biophys. Acta.*, 184: 540-533, 1969.

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

—————; SENER, A.; HERCHUELZ, A. & HUTTON, J.C. Insulin release: The fuel hypothesis. *Metabolism*, 28: 373-386, 1979a.

—————; HUTTON, J.C.; KAWAZU, S.; HERCHUELZ, A.; VALVERDE, I. & SENER, A. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXXV. The links between metabolic and cationic events. *Diabetologia*, 13: 331-341, 1979b.

—————; KAWAZU, S.; HERCHUELZ, A.; HUTTON, J.C.; SOMERS, G.; DEVIS, G. & SENER, A. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Effect of lactate upon islet function. *Arch. Biochem. & Biophys.*, 194: 49-62, 1979c.

—————; HUTTON, J.C.; CARPINELLI, A.R.; HERCHUELZ, A.; SENER, A. The stimulus-secretion coupling of Amino-Acid-induced insulin release. *Diabetes*, 29: 431-437, 1980.

MEISSNER, . .; HENQUIN, J.C.; PREISSLER, M. Potassium dependence of the membrane potential of pancreatic β -cells. *FEBS LETTERS*, 94: 87-89, 1978.

MILNER, R.D.G. & HALES, C.N. Cations and the secretion of insulin. *Biochem. biophys. Acta*, 150: 165-167, 1968.

MORGAN, R.G.; BRYANT, S.H. Pentobarbital: Presynaptic effect in the squid giant synapse. *Experientia*, 33: 487-488, 1976.

MOSKALEWSKI, S. Isolation and culture of the islet of Langerhans of the guinea pig. *Gen. Comparat. Endocrinol.*, 5: 342-353, 1965.

NARAHASHI, T.; MOORE, J.W. & FOSTON, R.N. Anesthetic blocking of nerve membrane conductance by internal and external applications. *J. Neurobiol.*, 1: 3-22, 1969.

PANTEN, U.; CHRISTIANS, J.; KRIEGSTEIN, E.V.; POSEK, W.; HASSELBLATT, A. Effect of carbohydrates upon fluorescence of Reduced Pyridine Nucleotides from perfused isolated pancreatic islets. *Diabetologia*, 9: 477-481, 1973.

———; ISHIDA, H. Fluorescence of oxydized flavoprotein from perfused isolated pancreatic islets. *Diabetologia*, 11: 569-573, 1975.

PRICE, H.L.; DRIPPS, R.D. VIII. Anestésicos gerais in "As bases farmacológicas da terapêutica", editado por GOODMAN, L. S. & GUILMAN, A. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1973, p. 90.

REIZ, S.; BALFORS, E.; FRIEDMAN, A.; HAGGMARK, S.; PETER, T. Effects of thiopental on cardiac performance coronary hemodyna

namics and myocardial oxygen consumption in chronic ischemic heart disease. *Acta Anaesth. Scand.*, 25: 103-110, 1981.

SCHUARZ, S.R. The mode of action of phenobarbital on the excitable membrane of the node the Ramvier. *Eur. J. Pharm.*, 56: 51-60, 1979.

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

———; ———. Glucose-induced decrease in Rb^{+} permeability in pancreatic beta cells. *Nature*, 253: 635-636, 1975.

———. Potassium-stimulated $^{45}Ca^{2+}$ uptake by subcellular particles of pancreatic -cells. *Am. J. Physiol.*, 240: C35-C38, 1981.

SEYAMA, I. & NARAHASHI, T. Mechanisms of blockade of Neuromuscular transmission by pentobarbital. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 192: 95-104, 1975.

SENER, A.; KAWAZU, S.; MALAISSE, W.J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin Release Metabolism of glucose in K^{+} -deprived islets. *Biochem. J.*, 186: 183-190, 1980.

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

- SHANES, A.M.; FREYANG, W.H.; GRUNDFEST, H.; AMATNIER, E. Anesthetic and calcium action in the voltage clamped squid giant axon. *J. Gen. Physiol.*, 42: 793-802, 1959.
- SKOOGH, B.E.; HOLTZMAN, M.J.; SHELER, J.R.; NADEL, J.A. Barbiturates depress vagal motor pathway to ferret trachea at ganglia. *J. Appl. Physiol.: Respirat Environ Exercise Physiol.*, 53:253-257, 1982.
- SOMERS, E.; DEVIS, G.; MALAISSE, W.J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced Insulin Release. XL. Effect of K^+ Deprivation upon Insulin Release by the perfused rat pancreas. *Pflügers Arch.*, 385:217-222, 1980.
- TAYLOR, R.E. Effect of procaine on electrical properties of squid axon membrane. *Amer. J. Physiol.*, 196: 1071-1078, 1959.
- THESLEFF, S. Effect of anesthetic agents on skeletal muscle membrane. *Acta Physiol. Scand.*, 37: 355-349, 1956.
- THOMSON, T.D.; TURKANIS, S.A. Barbiturate-induced transmitter release at a frog neuromuscular junction. *Br. J. Pharm.*, 48: 48-58, 1973.
- WALLER, M.B.; RICHTER, J.A. Effects of Pentobarbital and K^+ - stimulated release of several endogenous neurotransmitters from rat midbrain slices. *Bioch. Pharm.*, 29: 2189-2198, 1980.