

EDSON DELATTRE

EFEITOS DE ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDICOS DA FAMÍLIA DA
GENTAMICINA SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA

Tese submetida ao Instituto de
Biologia da Universidade de
Campinas, para a obtenção do
grau de Mestre em Biologia, na
área de Fisiologia e Biofísica

CAMPINAS - SP

1981

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Este trabalho foi realizado graças a uma licença para pós-graduação concedida pela Fundação Universidade Estadual de Londrina (FUEL), em convênio com a Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através do Plano Institucional de Capacitação de Docentes (PICD).

... e conhecereis a verdade
e a verdade vos libertará.
(João 8:32)

O conhecimento científico não
é necessariamente uma verdade,
senão parte de um caminho na
sua busca.
(ED 15/2/81)

Aos

Grandemente

Simples e humildes

Dedico

AGRADECIMENTOS

AGRADECEMOS:

A DEUS

Pelos ionóforos mas, também, pelos antagonistas que ELE tem semeado nas membranas que temos de transpor.

A TODOS que, nesses 29 anos, nos foram MESTRES.

Ao Dr. Antonio Carlos Boschero, pelos ensinamentos e por sua orientação, sempre segura, paciente e compreensiva.

Ao colega, amigo e Mestre, Prof. Luiz Carlos Jabur Gaziri, pela compreensão, exemplo, incentivo e ensinamentos constantes.

Ao colega Prof. Geraldo Ramón Pereira e família, pela amizade e espírito fraterno.

Ao Dr. Aquiles Piedrabuena e Dra. Maria Teresinha Trovarelli Tornero, pela orientação prestada no tratamento estatístico.

À Prof.^a Maria Alves de Paula Ravaschio, pela supervisão da apresentação bibliográfica.

Ao Dr. Alexandre Pinto Corrado, Dr. Armando de Aguiar Pupo, Prof. Carlos Henrique de Mesquita, Dr. Gilberto D'Assunção Fernandes, Dr.^a Iracélia Torres de Toledo e Souza,

Dr. Júlio Kieffer, Dr. Kenneth E. Collins, Prof.^a Maria Luiza dos Santos e Dr. Roberto Franco do Amaral, pelo auxílio prestado para a execução dos experimentos.

A todos que colaboraram e cujos nomes, involuntariamente, omitimos.

À Fundação Universidade Estadual de Londrina(FUEL) e à CAPES, que possibilitaram a execução deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP), pelo auxílio financeiro proporcionado: processo nº 79/1872.

OBRIGADO

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIMPLIFICAÇÕES

B/Bo	- Razão entre as radioatividades ligadas ao anticorpo, de um tubo qualquer, e aquela verificada na ausência de insulina não-marcada.
B/T	- Razão entre a radioatividade ligada ao anticorpo, de um tubo qualquer, e a radioatividade total utilizada.
BRANCO	- (No RIE-PEG, em particular) indica a radioatividade precipitada, inespecificamente, pelo PEG, na ausência de anticorpo.
CONTROLE	- Solução (KREBS) em que não se incubaram ilhotas.
cpm	- Contagens por minuto (dpm x eficiência de contagem do aparelho).
DE ₅₀	- Dose efetiva mediana.
dpm	- Desintegrações por minuto.
GPAIS	- <i>Guinea pig anti-insulin serum</i> : soro de cobaia imunizada com insulina (porcina, nesse caso).
IIRR	- Insulina imunorreativa de rato.
Incubação estática	- Incubação de ilhotas em KREBS de composição constante, durante certo tempo (90 min, no caso), no final da qual se dosa uma única amostra.
K _a	- Constante de associação.

K_i	- Constante de inibição.
K_m	- Equivale à constante de Michaelis-Menten.
KREBS	- Solução tampão bicarbonato de KREBS-RINGER, suplementada com albumi <u>n</u> a bovina 0,2 % (m/v).
MÁXIMO (TOTAL)	- Radioatividade (cpm) total pipetada em cada um dos tubos do RIE.
MÍNIMO	- (No RIE-CELULOSE, em particular) <u>in</u> dica a radioatividade não-precipitável pela celulose, ou seja, a radioativi <u>d</u> ade inespecífica.
PEG	- Polietilenoglicol.
QCI	- Quantidades crescentes de insulina mar <u>ca</u> da.
r	- Coeficiente de correlação.
RIE	- Radioimunoensaio.
RIE-CELULOSE	- RIE em que a separação das frações de insulina livre ou ligada ao anticorpo foi feita pela celulose.
RIE-PEG	- RIE em que a separação das frações de insulina livre ou ligada ao anticorpo foi feita pelo polietilenoglicol.
TFA	- Tampão fosfato (0,1 M e pH 7,0), suple <u>me</u> ntado com albumina.
TOTAL	- v. MÁXIMO.
ZERO INSULINA	- Tubo desprovido de insulina não-mar <u>ca</u> da.

S U M Á R I O

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. MECANISMO DA SECREÇÃO DE INSULINA	1
1.1.1. CINÉTICA DA SECREÇÃO	3
1.1.2. RECONHECIMENTO DO ESTÍMULO	5
1.1.3. PAPEL DO AMP _c	8
1.1.4. IMPORTÂNCIA E ENVOLVIMENTO DO CÁLCIO	9
1.1.4.1. DINÂMICA DO CÁLCIO	14
1.1.4.2. INTERAÇÕES ENTRE CÁLCIO E OUTROS ÍONS	16
1.1.5. SISTEMA EFETOR E LIBERAÇÃO DA INSULINA	18
1.2. ANTAGONISTAS DO CÁLCIO	21
1.2.1. EFEITOS SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA	22
1.2.1.1. ANTAGONISTAS INORGÂNICOS	22
1.2.1.2. ANTAGONISTAS ORGÂNICOS	23
1.3. ATUAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDICOS SOBRE TECIDOS EXCITÁVEIS	24
1.3.1. AÇÕES DE ANTIBIÓTICOS DA FAMÍLIA DA GEN- TAMICINA SOBRE TECIDOS EXCITÁVEIS	25
1.3.1.1. JUNÇÃO NEUROMUSCULAR	25
1.3.1.2. SISTEMA CARDIOVASCULAR	26
1.3.2. AÇÕES DE OUTROS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICO- SÍDICOS SOBRE TECIDOS EXCITÁVEIS	26
1.3.2.1. JUNÇÃO NEUROMUSCULAR	26
1.3.2.2. SISTEMA CARDIOVASCULAR	28
1.3.2.3. MUSCULATURA LISA RESPIRATÓRIA E INTESTINAL	28
1.3.2.4. TECIDO NERVOSO	29

1.4. OUTRAS AÇÕES DE ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDICOS	29
1.5. ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDICOS E NÍVEIS DE CÁLCIO IONIZADO	30
1.6. SIMILARIDADE DE EFEITOS PROVOCADOS POR ANTIBIÓ TICOS AMINOGLICOSÍDICOS	31
1.7. PROPOSIÇÃO DO TRABALHO	31
2. MATERIAL E MÉTODO	34
2.1. ANIMAIS	34
2.2. TÉCNICA DE ISOLAMENTO DAS ILHOTAS DE LANGERHANS	34
2.3. SECREÇÃO DE INSULINA EM CONDIÇÃO ESTÁTICA	35
2.4. INCORPORAÇÃO DE CÁLCIO (^{45}Ca) POR ILHOTAS DE LANGERHANS ISOLADAS	36
2.5. RADIOIMUNOENSAIO DE INSULINA	39
2.5.1. TÉCNICA DE SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES — LI VRE OU LIGADA AO ANTICORPO — PELA CELU LOSE (RIE-CELULOSE)	39
2.5.2. TÉCNICA DE SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES PELO POLIETILENOGLICOL (RIE-PEG)	41
2.6. TÉCNICA DE MARCAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE INSULINA	45
2.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA INSULI NA MARCADA	48
2.8. VALIDAÇÃO DO RIE-PEG PARA DOSAGEM DA INSULINA DE RATO SECRETADA POR ILHOTAS ISOLADAS	52
2.8.1. TITULAÇÃO DO ANTICORPO	52
2.8.2. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO E DA CAPACIDADE LIGANTE DO ANTICORPO	53
2.8.3. PROVA DA DILUIÇÃO	56
2.8.4. CURVAS DE REFERÊNCIA COM INSULINAS BOVI NA, PORCINA E MURINA	56
2.8.5. CURVA DE EQUIVALÊNCIA	59

2.8.6. CURVAS DE REFERÊNCIA COM INSULINAS MURINAS	62
2.8.7. PRECISÃO INTRA-ENSAIO	62
2.8.8. EFEITO DA SOLUÇÃO DE GENTAMICINA SOBRE O RIE-PEG DE INSULINA	66
2.9. NORMALIZAÇÃO DE RESULTADOS	69
2.10. CURVA DOSE-RESPOSTA À GLUCOSE	70
2.11. RADIOISÓTOPOS E REAGENTES	72
2.12. SOLUÇÕES	73
2.13. TRATAMENTO ESTATÍSTICO	76
3. RESULTADOS	78
3.1. EFEITO DA SISOMICINA E DA GENTAMICINA SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA	78
3.2. EFEITO DA GENTAMICINA SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA ESTIMULADA POR DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUCOSE	78
3.3. EFEITO DO CÁLCIO SOBRE A AÇÃO INIBITÓRIA DA SISOMICINA	82
3.4. EFEITO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE POTÁSSIO SOBRE A INIBIÇÃO PROVOCADA PELA GENTAMICINA	84
3.5. EFEITO DA SISOMICINA E DA GENTAMICINA SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA PROVOCADA PELA COMBINAÇÃO DE BÁRIO E TEOFILINA	84
3.6. EFEITO DA SISOMICINA SOBRE A INCORPORAÇÃO DE CÁLCIO (^{45}Ca)	87
3.7. RELAÇÃO ENTRE A INCORPORAÇÃO DE CÁLCIO E A SECREÇÃO DE INSULINA	89
4. DISCUSSÃO	92
4.1. VALIDAÇÃO DO RIE-PEG	93

4.1.1. VERIFICAÇÃO DA FALTA DE IDENTIDADE IMU- NOQUÍMICA ENTRE AS INSULINAS MURINA E BOVINA	93
4.1.2. CURVA DE EQUIVALÊNCIA	95
4.1.3. PRECISÃO INTRA-ENSAIO	95
4.1.4. CURVA DOSE-RESPOSTA À GLUCOSE	97
4.2. ASPECTOS DO USO DE ILHOTAS ISOLADAS	98
4.3. AÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDICOS SISO- MICINA E GENTAMICINA SOBRE A SECREÇÃO DE INSU- LINA E INCORPORAÇÃO DE CÁLCIO (^{45}Ca)	101
4.3.1. INIBIÇÃO DA SECREÇÃO DE INSULINA	102
4.3.2. REVERSÃO DO EFEITO INIBITÓRIO, PELO AU- MENTO DA CONCENTRAÇÃO EXTRACELULAR DE Ca^{2+}	105
4.3.3. INIBIÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE CÁLCIO (^{45}Ca)	107
4.3.4. RELAÇÃO ENTRE ANTIBIÓTICOS AMINOGLICO- SÍDICOS E CANAIS DE CÁLCIO VOLTAGEM-DE- PENDENTES	110
4.3.5. CORRELAÇÃO ENTRE SECREÇÃO DE INSULINA E INCORPORAÇÃO DE CÁLCIO (^{45}Ca)	112
4.3.6. INIBIÇÃO SECRETÓRIA EM VÁRIAS CONCEN- TRAÇÕES DE GLUCOSE	113
4.3.7. AUSÊNCIA DE EFEITO SOBRE A SECREÇÃO PROVOCADA POR Ba^{2+} E TEOFILINA	114
4.4. EVIDÊNCIAS FAVORÁVEIS A UMA AUSÊNCIA DE AÇÃO DA SISOMICINA E DA GENTAMICINA SOBRE O RECO- NHECIMENTO DA GLUCOSE PELA CÉLULA BETA.	115
4.5. IMPROVÁVEL AÇÃO DA SISOMICINA E GENTAMICINA SOBRE A INSULINOGENESE	116

5. RESUMO E CONCLUSÕES	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
APÊNDICE	156

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. MECANISMO DA SECREÇÃO DE INSULINA

O crescente ritmo de estudo e compreensão dos processos envolvidos na síntese e secreção de insulina, ocorrido nas duas últimas décadas, deve-se, em grande parte, a dois avanços técnicos desenvolvidos, aprimorados e difundidos a partir do final dos anos 50. O primeiro deles, o radioimunoensaio, cujos fundamentos foram simultaneamente estabelecidos por YALOW & BERSON (1960²⁸⁵), nos EUA, e por EKINS (1960⁶³), na Inglaterra, permitiu a dosagem rotineira de hormônios e outras substâncias, com praticidade, exatidão, precisão, sensibilidade e especificidade muito superiores às apresentadas pelas técnicas de mensuração até então praticadas. O segundo avanço se iniciou com o emprego de preparações, *in vitro* ou *in situ*, de tecido pancreático total ou parcial, estendendo-se até nossos dias, com o desenvolvimento de um elevado número de técnicas e variações. Assim, temos: (a) perfusão de pâncreas *in situ* (KUZUYA, KAJINUMA & IDE, 1974¹⁵⁰); (b) perfusão de pâncreas *in vitro* (GRODSKY *et alii*, 1963⁸⁸; SUSSMAN, VAUGHAN & TIMMER, 1966²⁶⁶; CURRY, BENNETT & GRODSKY, 1968a⁴⁴, c⁴⁶; IVERSEN, 1971¹³⁹; LENZEN, 1979¹⁶⁶); (c) perfusão de fragmentos de pâncreas (KIKUCHI *et alii*, 1974¹⁴⁴); (d) incubação de fragmentos de pâncreas fetal (LAMBERT *et alii*, 1967 *apud* HEDESKOV, 1980⁹⁶) ou adulto (COORE & RANDLE, 1964³⁸; MALAISSE, MALAISSE-LAGAE & MAYHEW, 1967¹⁸⁶; MALAISSE, MALAISSE-LAGAE & WRIGHT, 1967¹⁸⁷; FELDMAN, QUICKEL Jr. & LEOVITZ, 1972⁶⁶); (e) cultura de tecido pancreático fetal (VECCHIO & GONET, 1967²⁷³) ou neonatal (HOLLANDE *et alii*, 1976¹²⁶); (f) ilhotas isoladas por micro

dissecção (HELLERSTRÖM, 1964⁹⁷) ou por colagenase (MOSKALEWSKI, 1965²²³; LACY & KOSTIANOVSKY, 1967¹⁵²), incubadas em condições estáticas (KEEN, SELLS & JARRETT, 1965¹⁴³; HOWELL & TAYLOR, 1968¹²⁹; MALAISSE, MALAISSE-LAGAE & KING, 1968¹⁸⁸; VANCE *et alii*, 1968²⁷¹; COLL-GARCIA & GILL, 1969³⁷; ATKINS & MATTY, 1970¹⁶; LERNMARK, 1971¹⁶⁷; HELLMAN *et alii*, 1972¹⁰⁶) ou dinâmicas (IDAHL, 1972¹³⁵; LACY, WALKER & FINK, 1972¹⁵⁵; LAMBERT, HENQUIN & MALVAUX, 1974¹⁶¹) ou, ainda, mantidas em cultura (LAMBERT *et alii*, 1969¹⁶²); (g) cultura de células insulares (KOSTIANOVSKY *et alii*, 1974¹⁴⁹; HOLLANDE *et alii*, 1976¹²⁶); (h) perfusão de células insulares (IDAHL *et alii*, 1976¹³⁷) e (i) incubação de membranas e grânulos de células insulares (DAVIS & LAZARUS, 1976⁴⁷; LAZARUS, DAVIS & O'CONNOR, 1976¹⁶³; DAVIS & LAZARUS, 1977⁴⁸). Considerações sobre as vantagens e limitações apresentadas pelas técnicas *in vitro*, para estudo da secreção de insulina, foram feitas por FELDMAN (1979⁶⁵) e HEDESKOV (1980⁹⁶).

Os agentes capazes de desencadear a secreção de insulina são denominados *iniciadores* ou *estímulos primários*, enquanto aqueles que aumentam uma resposta secretória primária, mas são, por si só, incapazes de elicitar uma resposta secretória, são referidos como *potencializadores* ou *estímulos secundários*. Dentre os agentes primários, tais como carboidratos (v.g. glucose, manose, N-acetilglucosamina, inosina, gliceraldeído, diidroxiacetona, glucosamina); aminoácidos (v.g. arginina, leucina, lisina, fenilalanina); ácidos graxos e outros, a α -D-glucose é, reconhecidamente, o maior estímulo fisiológico da secreção de insulina.

O processo de secreção insulínica estimulado por glucose é aceito, atualmente, como uma seqüência encadeada de etapas. Estas se iniciam com o reconhecimento (metabolismo,

possivelmente) do secretagogo pelas células beta, passando pelo aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} e ativação do sistema de microtúbulos e microfilamentos, indo até a ocorrência da migração das vesículas armazenadoras de insulina, em direção à membrana plasmática, e subsequente extrusão do conteúdo granular para o líquido intersticial.

1.1.1. CINÉTICA DA SECREÇÃO

A secreção de insulina, evocada por glucose em concentração supra-limiar (estímulo em *onda-quadrada*), apresenta um característico padrão bifásico. Assim, após um período de 50 a 100 s de latência, ocorre um rápido aumento da taxa de secreção de insulina, que cai a níveis intermediários (entre os níveis basal e máximo) dentro de 5 a 10 min. Essa fase inicial é seguida de um segundo e prolongado período, que apresenta um aumento mais gradual da secreção (GRODSKY *et alii*, 1968, *apud* HEDESKOV, 1980⁹⁶). Esse padrão de resposta foi, inicialmente, constatado em pâncreas isolado e perfundido (CURRY, BENNETT & GRODSKY, 1968a⁴⁴, b⁴⁵), sendo, posteriormente, observado em outros sistemas isolados, tais como: (a) fragmentos isolados de pâncreas (KIKUCHI *et alii*, 1974¹⁴⁴); (b) ilhotas isoladas (IDAHL, 1972¹³⁵; IDAHL, 1973¹³⁶; LACY, WALKER & FINK, 1972¹⁵⁵; LACY, KLEIN & FINK, 1973¹⁵⁶; LAMBERT, HENQUIN & MALVAUX, 1974¹⁶¹; SIEGEL *et alii*, 1979²⁵⁶) e (c) suspensão de células insulares (IDAHL *et alii*, 1976¹³⁷). Diversas hipóteses têm sido aventadas para explicar esse fenômeno. Nesse sentido, GRODSKY *et alii* (1970, *apud* RANDLE & HALES, 1972²⁴²) propõem um modelo de dois compartimentos para a insulina estocada na célula beta. Um, localizado próximo à membrana, teria dimensões reduzidas e seria rapidamente mobilizado, enquanto o ou

tro, mais interno, apresentaria grandes dimensões e lenta mobilização. Por outro lado, LACY (1970¹⁵¹) sugere que os grânulos de insulina alinhados ao longo dos microtúbulos poderiam ser responsáveis pela primeira fase da secreção, enquanto a fase posterior decorreria da secreção dos grânulos inicialmente livres no citoplasma, e que se ligariam aos microtúbulos. GRODSKY *et alii* (1967, *apud* GRODSKY, 1970⁸⁴) consideram a possibilidade daquele padrão decorrer de um mecanismo de inibição, por *feedback*, da secreção. Esta hipótese é apoiada por evidências eletrofisiológicas sugestivas de uma auto-regulação secretória da célula beta, pela própria insulina (PACE *et alii*, 1977²³²). MALAISSE *et alii* (1974²⁰²) propõem que os grânulos localizados na rede microfilamentar seriam os responsáveis pela primeira fase, enquanto a segunda corresponderia a uma mobilização dos grânulos secretórios localizados ao longo dos microtúbulos. ORCI & UNGER (1975²²⁸) atribuem o padrão bifásico a uma especial disposição histológico-funcional das células insulares. Esta hipótese, entretanto, tornou-se insustentável, após a verificação de um padrão bifásico da secreção de insulina em suspensão de células insulares (IDAHL *et alii*, 1976¹³⁷). Por sua vez, MEISSNER & ATWATER (1976²¹⁵) consideram que o referido padrão seria um fenômeno dependente, ao menos parcialmente, do potencial de membrana. Segundo ATWATER & BEIGELMAN (1976¹⁷), a resposta secretória bifásica seria explicável pela existência de um sistema regulatório na membrana da célula beta, possivelmente um canal de K^+ dependente de Ca^{2+} intracelular. De acordo com DAVIS & LAZARUS (1976⁴⁷) e LAZARUS, DAVIS & O'CONNOR (1976¹⁶³), a atuação da glucose a nível de um hipotético receptor membranar produziria a primeira fase, enquanto a sua simultânea entrada e metabolismo na célula beta iniciaria e manteria

a segunda fase da secreção de insulina. Finalmente, WOLLHEIM *et alii* (1978 ²⁸¹) reúnem evidências de que aquele padrão seria reflexo de uma alteração bifásica na concentração citosólica do Ca^{2+} .

1.1.2. RECONHECIMENTO DO ESTÍMULO

A idéia de que o processo de secreção de insulina envolveria o metabolismo da glucose remonta a décadas passadas. Já em 1958 ²³⁹, POZZA *et alii*, testando o efeito de vários carboidratos, injetados na artéria pancreática de cães, levantaram a hipótese de que a secreção de insulina seria estimulada por açúcares metabolizáveis. Resultados de KILO *et alii* (1962 ¹⁴⁷), KARAM *et alii* (1966 ¹⁴²), IDAHL (1973 ¹³⁶), MALAISSE (1973 ¹⁷⁴) e KUZUYA, KAJINUMA & IDE (1974 ¹⁵⁰) sugerem que a glucose precisa penetrar na célula beta e ser metabolizada, para provocar a secreção de insulina. Por sua vez, GAGLIARDINO & MARTIN (1966 ⁷¹) consideram que o efeito estimulatório da glucose depende do seu metabolismo, provavelmente, no Ciclo de Krebs. Um papel deste Ciclo, como promotor do sinal e energia requeridos para o processo de secreção de insulina, foi sugerido por MALAISSE & MALAISSE-LAGAE (1968 ¹⁸⁰) para explicar o efeito estimulatório provocado por ácidos graxos e aminoácidos. MALAISSE *et alii* (1976d ¹⁹⁹) verificaram que a glicólise representa a maior via de metabolismo da glucose nas ilhotas pancreáticas, estando intimamente envolvida no processo de identificação da glucose, pela célula beta, como um estímulo para a secreção de insulina. Sugerem que, no processo de secreção da insulina por glucose, a glicólise pode regular os processos fisiológicos dentro da célula beta.

MALAISSSE *et alii* (1976f²⁰⁸) consideram que o metabolismo da glucose na célula beta, especialmente no segmento metabólico localizado além do nível de triose-fosfato, representa o componente-chave do dispositivo glucossensor daquela célula. Consideram, também, que o potencial insulínotropico dos carboidratos está em paralelo com sua capacidade de sofrer glicólise. Opiniões concordantes com esta são, igualmente, expressas por MALAISSSE *et alii* (1976c¹⁹⁸) e ZAWALICH *et alii* (1977²⁸⁸). Outrossim, tem-se constatado que as curvas relacionando as taxas de secreção de insulina e a utilização de glucose pela célula beta, com a concentração extracelular de glucose, são similares (ASHCROFT *et alii*, 1972¹⁵; ASHCROFT, WEERASINGHE & RANDLE, 1973¹⁴).

Resultados obtidos por MALAISSSE-LAGAE & MALAISSSE (1971²¹⁰) sugerem que o estímulo para a captação de Ca^{2+} depende do metabolismo da glucose pela célula beta. Segundo SENER, LEVY & MALAISSSE (1976²⁵⁴) e ISHIBASHI *et alii* (1980¹³⁸), a glicólise exerce, na célula beta, um estreito controle sobre a mobilização de Ca^{2+} , levando à secreção de insulina.

Recentemente, foi proposto que a conexão entre os eventos metabólicos e o rearranjo dos fluxos catiônicos da célula beta é feita por intermédio da geração intracelular de NAD(P)H^+ e H^+ , em paralelo com uma produção aumentada de ATP, que pode ser essencial para preencher a necessidade de energia daquela célula (MALAISSSE *et alii*, 1978b²⁰⁹; MALAISSSE *et alii*, 1979a²⁰¹, b²⁰⁵, c²⁰⁷). Assim, a capacidade insulínotropica de um secretagogo dependeria do grau de elevação de nucleotídeos piridínicos reduzidos por ele provocada, nucleotídeos estes que afetariam a afinidade, por cátions, dos sistemas ionoforéticos da célula beta (MALAISSSE *et alii*,

1979c²⁰⁷).

Os resultados experimentais que correlacionam o metabolismo de substratos e a secreção de insulina, pela célula beta, constituem evidências favoráveis ao *modelo do sítio-substrato*, como uma hipótese explicativa para a ação insulínica trópica dos estímulos primários da secreção. Esta hipótese foi, recentemente, discutida em revisão publicada por MALAISSE *et alii* (1979a²⁰¹).

Em oposição, evidências favoráveis ao *modelo do sítio-regulador* têm sido obtidas por outros pesquisadores. Segundo este modelo, a glucose pode desempenhar um papel duplo nas células beta, ao agir como estimulante químico, em adição ao seu papel de substrato metabólico (MATSCHINSKY *et alii*, 1971²¹³). Dessa forma, a glucose, por si mesma, desencadearia a secreção de insulina, ao agir em um glucorreceptor membranar. Dados indicadores de que a glicólise não é um evento necessário para a secreção de insulina foram obtidos por PACE & MATSCHINSKY (1974²³¹), ao verificarem que a citocalasina B provoca inibição da utilização de glucose, em condições que aumentam a secreção de insulina. Entretanto, HEDESKOV (1980⁹⁶), revisando as evidências favoráveis ou contrárias a uma e outra das hipóteses, considera fragmentários e contraditórios os argumentos em favor do *modelo do sítio-regulador*, tendo reunido um maior volume de evidências favoráveis ao *modelo do sítio-substrato*.

1.1.3. PAPEL DO AMPc

O papel do AMPc, no processo de secreção de insulina, tem merecido grande atenção dos pesquisadores nos últimos anos sem que, no entanto, se tenha alcançado uma conclusão satisfatória a esse respeito. CHARLES *et alii* (1973³⁴), perfundindo ilhotas pancreáticas, mostraram uma elevação de 2,5 vezes no nível de AMPc, após 2 ou 20 min de estimulação por 16,7 mM de glucose, acompanhada de rápido aumento da secreção de insulina. Idêntica observação foi feita por GRILL & CERASI (1974⁸³), que verificaram também, em ilhotas isoladas, uma correlação entre a taxa de secreção de insulina, estimulada por glucose, e o conteúdo de AMPc. O acúmulo deste nucleotídeo, aparentemente, precedeu o início da secreção, o que levou aqueles pesquisadores a sugerir que a secreção de insulina, provocada por glucose, poderia ser mediada pelo AMPc. BRISSON, MALAISSE-LAGAE & MALAISSE (1972³²) e HOWELL & TYHURST (1976b¹³¹) propõem, para o AMPc, uma ação mobilizadora de Ca^{2+} , a partir de organelas intracelulares, ocasionando um aumento nos níveis citosólicos desse cátion, o que provocaria a secreção. MALAISSE (1976a¹⁷⁶) levanta a hipótese de que as ações do AMPc, na célula beta, sejam secundárias a uma alteração (de)fosforilação (a) das enzimas que controlam o metabolismo da glucose e (b) dos constituintes membranares envolvidos na distribuição subcelular dos cátions. Não obstante, mais recentemente, SIEGEL *et alii* (1979²⁵⁶) consideram que a ação do AMPc não se processa, unicamente, pelo deslocamento intracelular de Ca^{2+} , mas que ele atua, também, sensibilizando o aparato secretor. Uma ação do AMPc, apenas como modulador do estímulo primário, é defendida por SANDO, BORG & STEINER (1972²⁴⁸) e CHARLES *et alii* (1975³³), ao mesmo tempo em que

hoje se tem reunido evidências sugestivas de que um aumento na concentração de AMPc, na célula beta, não é uma condição necessária, e nem suficiente, para a estimulação da secreção de insulina (HEDESKOV, 1980⁹⁶).

1.1.4. IMPORTÂNCIA E ENVOLVIMENTO DO CÁLCIO

O envolvimento de íons Ca^{2+} em processos de acoplamento estímulo-secreção tem sido constatado em diferentes estruturas nervosas e endócrinas (BIRMINGHAM, ELLIOTT & VALÈRE, 1953²⁷; HUTTER & KOSTIAL, 1954¹³⁴; DOUGLAS, 1968⁵⁸; WILLIAMS, 1972²⁷⁸; LUNDQUIST, FANSKA & GRODSKY, 1976¹⁷²; IVERSEN & HERMANSEN, 1977¹⁴⁰). Para revisão, vide RUBIN (1970²⁴⁶) e HALES *et alii* (1977⁹³).

Perfundindo pâncreas isolado de rato, GRODSKY & BENNETT (1966⁸⁶) foram os primeiros a constatar a necessidade de íons Ca^{2+} no meio extracelular, para a ocorrência de secreção de insulina. Essa verificação foi confirmada, em idêntica preparação, por CURRY, BENNETT & GRODSKY (1968c⁴⁶); em fragmentos de pâncreas de coelho, por MILNER & HALES (1967a²¹⁷); em fragmentos de pâncreas de rato, por MALAISSE, BRISSON & MALAISSE-LAGAE (1970¹⁸⁹); em pâncreas de rato, mantido em cultura, por LAMBERT *et alii* (1969¹⁶²); em ilhotas isoladas de rato, por MALAISSE, BRISSON & BAIRD (1973¹⁹¹) e HELLMAN (1975⁹⁹) e em preparações de membranas e grânulos de secreção isolados, por DAVIS & LAZARUS (1977⁴⁸). Revisões que tratam do papel do Ca^{2+} na secreção de insulina foram feitas por MALAISSE (1972¹⁷³), MALAISSE & PIPELEERS (1973¹⁸²), MALAISSE (1975¹⁷⁵) e MALAISSE *et alii* (1978b²⁰⁹).

A importância do Ca^{2+} para a secreção de insulina tem sido demonstrada, também, através do emprego de substâncias que promovem a sua captação através das membranas (ionóforos) (FUJIMOTO & ENSINCK, 1976⁶⁹) ou inibem essa captação (antagonistas) (DEVIS *et alii*, 1975⁵³; MALAISSE *et alii*, 1976a¹⁹⁶, b¹⁹⁷, e²⁰³; SOMERS *et alii*, 1976a²⁶⁰; MALAISSE, 1977¹⁷⁸; MALAISSE & BOSCHERO, 1977¹⁸³).

O Ca^{2+} é necessário, não somente para a ação estimulatória da glucose sobre a secreção de insulina mas, também, para a ação de outros agentes, como sulfonilurêias (CURRY, BENNETT & GRODSKY, 1968c⁴⁶; MALAISSE *et alii*, 1972¹⁹⁵), aminoácidos, potássio, AMPc e carboidratos insulíntrópicos (MALAISSE *et alii*, 1972¹⁹⁵).

HELLMAN (1975⁹⁹, 1977¹⁰¹) considera importante, para a secreção de insulina, um nível ótimo de Ca^{2+} nos reservatórios funcionais deste cátion na célula beta. Em concordância com esta idéia, tem-se observado que, dentro de um certo intervalo, a secreção de insulina guarda relação direta com o nível de Ca^{2+} do meio extracelular (CURRY, BENNETT & GRODSKY, 1968c⁴⁶; FUJIMOTO & ENSINCK, 1976⁶⁹). Uma elevação da concentração extracelular de Ca^{2+} provocaria um aumento na entrada de Ca^{2+} e/ou inibição do seu efluxo, gerando um suficiente acúmulo desse íon na célula beta, estimulando, assim, a secreção (DEVIS, SOMERS & MALAISSE, 1977⁵²).

MALAISSE & PIPELEERS (1973¹⁸²) e PIPELEERS, MARICHAL & MALAISSE (1973²³⁶) sugerem que a participação de cátions divalentes, especialmente o Ca^{2+} , no acoplamento estímulo-secreção, ocorre em uma etapa final e essencial da sequência secretória de insulina. Por sua vez, HENQUIN (1978b¹¹⁰) con

clui que a mera presença de Ca^{2+} extracelular não é suficiente para a estimulação, pela glucose, da secreção de insulina, mas que deve ocorrer um influxo desse íon na célula beta. Esse mesmo autor considera que a necessidade de Ca^{2+} extracelular parece ser absoluta para a fase inicial, e menos completa para a segunda fase da secreção. Uma verificação conflitante como essa é, no entanto, relatada por WOLLHEIM *et alii* (1978²⁸¹) e KIKUCHI *et alii* (1979¹⁴⁶). Esses concluem que a primeira fase de resposta à glucose é gerada pela utilização do Ca^{2+} intracelular, enquanto a segunda fase requer, para seu pleno desenvolvimento, tanto o Ca^{2+} intracelular, quanto a elevada captação do Ca^{2+} extracelular.

Ao contrário do que se tem constatado em relação à secreção, a síntese de insulina parece prescindir do Ca^{2+} extracelular (CURRY, BENNETT & GRODSKY, 1968a⁴⁴; PIPELEERS, MARICHAL & MALAISSE, 1973²³⁶).

Por outro lado, alguns estudos têm mostrado que o Ca^{2+} , por si só, pode provocar secreção de insulina na ausência de glucose (DEVIS, SOMERS & MALAISSE, 1975⁵¹; WOLLHEIM *et alii*, 1975²⁸²; HELLMAN, 1976¹⁰⁰; DEVIS, SOMERS & MALAISSE, 1977⁵²).

Clinicamente, também se tem verificado a importância do Ca^{2+} para a secreção de insulina. Assim, AMEND Jr. *et alii* (1975¹²), BANSAL *et alii* (1975²¹), YASUDA *et alii* (1975²⁸⁶) e GEDIK & ZILELI (1977⁷²) detectaram resposta insulínica reduzida em pacientes hipocalcêmicos submetidos a sobrecarga de glucose. O mesmo se constatou em mamíferos não-primatas (LITTLEDIKE, WITZEL & WHIPP, 1968¹⁶⁹; WITZEL & LITTLEDIKE, 1973²⁷⁹). Outrossim, nas hipercalcemias,

um aumento da secreção de insulina, desencadeada por vários agentes, tem sido constatado (a) em humanos submetidos a sobrecarga de glucose (YASUDA *et alii*, 1975²⁸⁶; FUJITA *et alii*, 1978⁷⁰; GEDIK, AKALIN & KORAY, 1980⁷³) ou tratados com a sulfoniluréia glibenclamida (GERÖ *et alii*, 1977⁷⁴) e (b) em cães infundidos com glucose (KUZUYA, KAJINUMA & IDE, 1974¹⁵⁰) ou tolbutamida (HARTER *et alii*, 1976⁹⁵).

A localização de reservatórios intracelulares de Ca^{2+} e sua participação no mecanismo de secreção de insulina têm sido objeto de estudo de alguns pesquisadores. HERMAN, SATO & HALES (1973¹²³), empregando a técnica do piroantimoniato, seguida de microscopia eletrônica, verificaram que os maiores depósitos situam-se nas vesículas secretórias, nas mitocôndrias e na membrana celular. Observaram, também, que a incubação das ilhotas, em meio com 16,7 mM de glucose, aumenta a deposição de precipitados de piroantimoniato nas vesículas secretórias e na membrana celular. BLOOM *et alii* (1977²⁸) sustentam que os grânulos secretórios constituem uma parte considerável do estoque de Ca^{2+} glucose-sensível da célula beta. A importância das mitocôndrias na regulação da concentração de Ca^{2+} citosólico nas células beta foi confirmada por HOWELL & TYHURST (1976b¹³¹), empregando Ba^{2+} como traçador daquele cátion; por HOWELL & TYHURST (1976a¹³⁰), através de auto-radiografia e por HOWELL (1977¹²⁷), com o uso de microanálise de raio X. Apesar de controvérsias quanto ao papel específico de cada reservatório, parece que o Ca^{2+} está distribuído entre, no mínimo, dois reservatórios. Um, representado pelo Ca^{2+} citosólico, e outro, heterogêneo, e que corresponde ao Ca^{2+} captado por, ou ligado a, várias organelas (MALAISSE & PIPELEERS, 1973¹⁸²).

A importância transcendental do Ca^{2+} citosólico, no processo de secreção de insulina, tem dirigido a atenção de inúmeros pesquisadores para esse campo de estudos (MALAISSE, 1972¹⁷³; BRISSON, MALAISSE-LAGAE & MALAISSE, 1972³²; MALAISSE, 1973¹⁷⁴; MALAISSE & PIPELEERS, 1973¹⁸²; ATWATER & BEIGELMAN, 1976¹⁷; SOMERS *et alii*, 1976a²⁶⁰; MALAISSE *et alii*, 1978a²⁰⁶, b²⁰⁹), dentre outros. É amplamente aceito que o evento primário que conduz à secreção de insulina é o aumento do cálcio ionizado do citosol da célula beta (MALAISSE, 1972¹⁷³; ATWATER & BEIGELMAN, 1976¹⁷). Ainda segundo esses autores, o conceito de que a acumulação de Ca^{2+} , em um *sítio-crítico* da célula beta, provoca a secreção, tem duas grandes implicações. 1º) Agentes que estimulam ou inibem a secreção de insulina o fariam alterando o manuseio de Ca^{2+} pela célula beta; 2º) o Ca^{2+} poderia desencadear a secreção de insulina através de uma modalidade simples e invariável. O Ca^{2+} exerceria um controle múltiplo sobre a função da célula beta, em que um suprimento suficiente de Ca^{2+} seria requerido para (a) manter o reservatório celular de Ca^{2+} que media a secreção de insulina e (b) regular os processos consumidores de energia, possivelmente localizados na membrana celular (MALAISSE *et alii*, 1978a²⁰⁶). De acordo com MALAISSE *et alii* (1972¹⁹⁵), a estimulação da secreção de insulina, provocada por certos açúcares, aminoácidos, potássio, AMPc ou sulfonilurêias, e a inibição da secreção, causada por Mg^{2+} , adrenalina, diazóxido, anestésicos locais e inibidores metabólicos, sempre resultam de alterações no transporte ou na distribuição de Ca^{2+} na célula beta.

1.1.4.1. DINÂMICA DO CÁLCIO

Uma técnica que permite a avaliação da quantidade de Ca^{2+} incorporado por ilhotas de Langerhans isoladas foi desenvolvida por MALAISSE-LAGAE & MALAISSE (1971²¹⁰). Por sua vez, HELLMAN, SEHLIN & TÄLJEDAL (1976a¹⁰³) adaptaram essa técnica, para permitir a distinção de diferentes reservatórios de Ca^{2+} na ilhota, por meio de lavagens com solução de La^{3+} . Esses pesquisadores, bem como outros, têm, em várias ocasiões, verificado que a glucose estimula a captação de Ca^{2+} por ilhotas isoladas (MALAISSE *et alii*, 1972¹⁹⁵; HELLMAN, SEHLIN & TÄLJEDAL, 1976a¹⁰³, b¹⁰⁴; BLOOM *et alii*, 1977²⁸; NABER, McDANIEL & LACY, 1977²²⁶; HELLMAN *et alii*, 1977¹⁰⁷; FRANKEL *et alii*, 1978⁶⁸; HELLMAN *et alii*, 1978¹⁰⁸; HELLMAN & GYLFE, 1978¹⁰²). Outrossim, HELLMAN, SEHLIN & TÄLJEDAL (1976b¹⁰⁴) constataram a existência de dois reservatórios de Ca^{2+} sensíveis à glucose. Um, que é deslocável pelo La^{3+} (situado na membrana plasmática), e outro, internalizado, resistente a esse cátion. HELLMAN *et alii* (1977¹⁰⁷) verificaram que a captação de Ca^{2+} pelo reservatório não-deslocável pelo La^{3+} é dose-dependente, na faixa de 0 a 20 mM de glucose. Uma relação de dependência também foi observada entre a captação de Ca^{2+} e a sua concentração externa, na faixa de 16 μM a 2,56 mM desse cátion.

Foram obtidas evidências de que o reservatório de Ca^{2+} deslocável pelo La^{3+} é o que apresenta as propriedades necessárias para atuar no processo de acoplamento estímulo-secreção (HELLMAN, SEHLIN & TÄLJEDAL, 1976b¹⁰⁴). Contudo, resultados sugestivos de que o reservatório de Ca^{2+} não-deslocável pelo La^{3+} pode desempenhar um papel na regulação rá-

pida dos fluxos desse íon foram obtidas por HERCHUELZ & MALAISSE (1977¹¹⁵). Resultados de MALAISSE-LAGAE & MALAISSE (1971²¹⁰) sugerem que a captação de Ca^{2+} depende do metabolismo intracelular de glucose, uma vez que a mesma foi reduzida por manoeptulose e 2-deoxiglucose, reconhecidos inibidores desse metabolismo. Entretanto, apesar dos esforços dispendidos, considera-se que a localização precisa do(s) reservatório(s) de Ca^{2+} que controla(m) a secreção de insulina, bem como o mecanismo pelo qual a glucose provoca o acúmulo intracelular de Ca^{2+} , permanecem ainda parcialmente incógnitos (HERCHUELZ, LEBRUN & MALAISSE, 1980¹²⁰).

MALAISSE, BRISSON & BAIRD (1973¹⁹¹) observaram que ilhotas previamente marcadas com ^{45}Ca , quando perfundidas com solução contendo 16,7 mM de glucose, apresentam uma alteração bifásica do efluxo desse cátion radioativo. Inicialmente, o efluxo cai (dentro de 60 s), seguindo-se um acentuado aumento. Suas observações foram, posteriormente, confirmadas por diversos pesquisadores (HERCHUELZ & MALAISSE, 1977¹¹⁵; GYLFE & HELLMAN, 1978⁸⁹; GYLFE *et alii*, 1978⁹⁰; HERCHUELZ & MALAISSE, 1978¹¹⁶; KIKUCHI *et alii*, 1978¹⁴⁵; HERCHUELZ & MALAISSE, 1980a¹¹⁷; HERCHUELZ, COUTURIER & MALAISSE, 1980¹¹⁹). Tem-se proposto que a glucose, inibindo a saída do Ca^{2+} através da membrana da célula beta, conduziria a um acúmulo de Ca^{2+} no citosol, desencadeando, assim, a secreção de insulina (MALAISSE, 1972¹⁷³; MALAISSE, 1973¹⁷⁴; MALAISSE, BRISSON & BAIRD, 1973¹⁹¹). De acordo com HERCHUELZ & MALAISSE (1977¹¹⁵), a glucose exerceria uma ação dual sobre o reservatório de Ca^{2+} não-deslocável pelo La^{3+} (Ca^{2+} internalizado). Inicialmente, ela aumentaria a afinidade, por Ca^{2+} , de algum componente da célula beta, provocando, mais tarde,

um aumento do efluxo, que dependeria da disponibilidade de Ca^{2+} extracelular, o qual entraria na célula por um processo do tipo troca $\text{Ca}^{2+} \times \text{Ca}^{2+}$. Assim, o aumento secundário do efluxo de ^{45}Ca seria reflexo da taxa de entrada de ^{40}Ca nas células insulares, através de canais de Ca^{2+} abertos (HERCHUELZ, COUTURIER & MALAISSE, 1980¹¹⁹).

1.1.4.2. INTERAÇÕES ENTRE CÁLCIO E OUTROS ÍONS

O papel do Ca^{2+} na secreção de insulina está estreitamente interligado ao de outros íons, que também podem participar no desencadeamento desse processo. Assim sendo, MILNER & HALES (1968²²⁰) constataram que uma concentração extracelular de K^+ de 60 mM somente estimula a secreção quando o Ca^{2+} está presente no meio. Hoje, aceita-se que esse efeito se deve à despolarização provocada pela alta concentração extracelular do K^+ (MILNER & HALES, 1967c²¹⁹; GOMEZ & CURRY, 1973⁷⁷; ATWATER, RIBALET & ROJAS, 1978¹⁸), que ocasiona um aumento da incorporação de Na^+ (MILNER & HALES, 1967c²¹⁹) e/ou Ca^{2+} (HELLMAN, SEHLIN & TÄLJEDAL, 1978¹⁰⁵; HERCHUELZ *et alii*, 1980a¹²¹), neste caso, por meio da abertura de canais de Ca^{2+} *voltagem-dependentes*. Em sentido oposto, a remoção do K^+ extracelular provocaria a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, em decorrência de acúmulo de Na^+ nas células insulares, levando a um aumento do estímulo secretório pela glucose (HERCHUELZ & MALAISSE, 1980b¹¹⁸). A supressão do K^+ extracelular ocasiona, também, despolarização da membrana da célula beta (MEISSNER, 1976²¹⁴), com a conseqüente abertura dos canais de Ca^{2+} *voltagem-dependentes* e entrada desse cátion

(HERCHUELZ *et alii*, 1980a¹²¹).

Com relação ao Na^+ , GRIFFEY, CONAWAY & WHITNEY (1974⁸²) verificaram uma secreção intensa e monofásica de insulina, quando suprimiram esse íon do meio perfusor de pâncreas isolado, atribuindo o efeito a uma captação aumentada de Ca^{2+} e/ou a um bloqueio do seu efluxo. Atualmente, pode-se explicar esse efeito pela existência, na célula beta, de um contratransporte de Na^+ e Ca^{2+} (DONATSCH *et alii*, 1977⁵⁶).

Um aumento da concentração intracelular de Na^+ seria o mediador do estímulo da secreção constatado em meio desprovido de K^+ (MILNER & HALES, 1967b²¹⁸). Por sua vez, LOWE *et alii* (1976¹⁷¹) sugerem que o aumento da concentração citosólica de Na^+ promove a liberação de Ca^{2+} dos compartimentos intracelulares. Essa suposição é compartilhada por HERCHUELZ & MALAISSE (1980b¹¹⁸), para explicar o estímulo da secreção provocado por veratridina (ionóforo de Na^+) ou pela remoção do K^+ extracelular.

DONATSCH *et alii* (1977⁵⁶) consideram que, tanto o Na^+ quanto o Ca^{2+} parecem entrar na célula beta através de canais de Na^+ abertos pela veratridina, muito embora se desconheça um significado fisiológico para este efeito. Resultados experimentais sugerem que a abertura dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, mediando a entrada de Ca^{2+} na célula beta, bem como a inibição do seu efluxo por contratransporte Na^+ x Ca^{2+} , representam o mecanismo pelo qual a glucose provoca o acúmulo desse cátion divalente na célula beta e a conseqüente secreção (HERCHUELZ, LEBRUN & MALAISSE, 1980¹²⁰).

SEHLIN & TÄLJEDAL (1975²⁵²) sugerem que a ação despolarizante da glucose sobre as células beta seria media

da, ao menos em parte, por um decréscimo na permeabilidade da membrana ao K^+ . Resultados concordantes com essa sugestão foram obtidos por BOSCHERO *et alii* (1977³⁰) e HENQUIN (1978a¹⁰⁹, c¹¹¹). Outrossim, MALAISSE *et alii* (1978b²⁰⁹) consideram que o maior efeito da glucose sobre o manuseio do K^+ , pelas ilhotas pancreáticas, consiste em reduzir o efluxo, sem afetar o influxo desse íon. A glucose facilita a entrada de Ca^{2+} nas células, pelo menos parcialmente, através de seu efeito inibidor da permeabilidade membranar ao K^+ e conseqüente despolarização, resultando na abertura dos canais de Ca^{2+} (HERCHUELZ *et alii*, 1980a¹²¹, b¹²²). Finalmente, HENQUIN (1979¹¹²) apresenta evidências de que o Ca^{2+} intracelular aumenta a permeabilidade membranar ao K^+ , em células insulares, e que o influxo de Ca^{2+} , estimulado por glucose, pode representar um controle em *feedback* do decréscimo da permeabilidade ao K^+ , mediado por glucose.

Um esquema do acoplamento entre os eventos metabólicos e catiônicos da célula beta é apresentado na figura 1.

1.1.5. SISTEMA EFETOR E LIBERAÇÃO DA INSULINA

A seqüência de alterações metabólicas, iônicas e elétricas, desencadeadas, na célula beta, pela ação dos diferentes agentes secretagogos, converge para uma via final comum, o sistema efetor, constituído pelo aparelho microtubular-microfilamentar, em conexão com a membrana plasmática.

A existência de um cito-esqueleto interno na célula beta foi, originalmente, proposta por LACY *et alii* (1968¹⁵⁸).

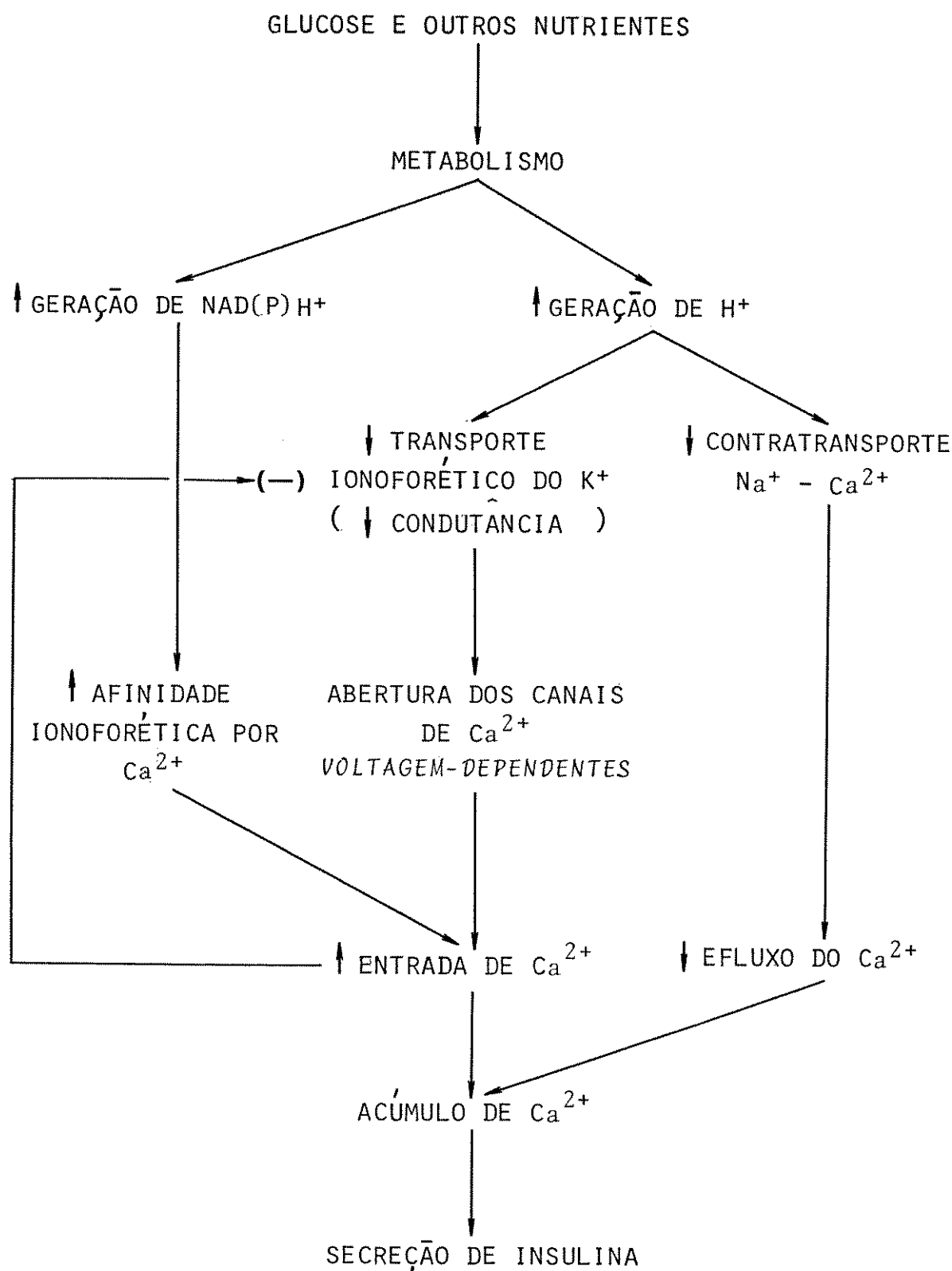


FIGURA 1. Modelo esquemático do acoplamento entre os eventos metabólicos e cationicos, no processo de secreção de insulina. Baseado em HENQUIN (1979¹¹²), ATWATER *et alii* (1979¹⁹), MALAISSE *et alii* (1979a²⁰¹) e HERCHUELZ *et alii* (1980b¹²²).

Segundo estes autores, filamentos contráteis, de material idêntico à actinmiosina, ligariam parte dos grânulos beta à membrana celular e proveriam vias internas para o movimento controlado dos grânulos no citoplasma. Ao longo dos anos, essa hipótese tem sido extensamente fundamentada em experimentos, graças, em grande parte, ao uso de drogas que alteram a estabilidade e/ou conformação de componentes do sistema microtubular-microfilamentar (v.g. colchicina, D_2O , citocalasina B, vincristina). Nesse sentido, diversas pesquisas têm evidenciado a participação dos microtúbulos na dinâmica da secreção de insulina (MALAISSE-LAGAE *et alii*, 1971²¹¹; DEVIS *et alii*, 1974⁵⁴; LACY, WALKER & FINK, 1972¹⁵⁵; MALAISSE, 1976b¹⁷⁷). Segundo LACY, WALKER & FINK (1972¹⁵⁵), ambas as fases da secreção de insulina envolvem a participação do sistema microtubular. Indo adiante, MALAISSE (1976b¹⁷⁷) demonstrou que a integridade do aparelho microtubular é requerida, não somente para a perfeita secreção dos grânulos pré-formados, mas também para a transferência da pró-insulina do retículo endoplasmático rugoso para o Complexo de Golgi. O aparelho microtubular provê a armadura para a secreção funcional dos grânulos, controlando os eventos motores intracelulares para sua translocação (VAN OBBERGHEN *et alii*, 1975²⁷²; MALAISSE 1976b¹⁷⁷), enquanto que a contração dos filamentos tipo actomiosina seria a força motriz que disporia os grânulos em aposição com a membrana, conduzindo à secreção (LEVINE, 1970¹⁶⁸). A ativação do sistema microtubular-microfilamentar seria desencadeada pelo acúmulo de Ca^{2+} na célula beta (MALAISSE & MALAISSE-LAGAE, 1970¹⁸¹; MALAISSE *et alii*, 1971¹⁹⁴), especificamente em um determinado local (MALAISSE, 1972¹⁷³), através da interação desse cátion com as proteínas microtubulares (MALAISSE *et alii*, 1972¹⁹⁵). Evidência adicional do envolvimento do sistema microtubular-

microfilamentar, na translocação intracelular dos grânulos beta, provém de estudos cinemicrográficos realizados por LACY, FINKE & CODILLA (1975¹⁵⁷), que demonstraram a ocorrência de movimentos granulares após a estimulação com glucose. Esses movimentos foram inibidos na ausência de Ca^{2+} .

Quanto à rede microfilamentar, localizada próxima à membrana da célula beta, ela atuaria como uma barreira, prevenindo a fusão incontrolada das membranas vesicular e celular (MALAISSE, HAGER & ORCI, 1972¹⁹⁰; ORCI, GABBAY & MALAISSE, 1972²²⁹; MALAISSE, 1972¹⁷³). Recentemente, MALAISSE & ORCI (1980¹⁸⁵) e SOMERS *et alii* (1980²⁶²) reuniram evidências favoráveis à participação de um processo quimiosmótico na exocitose dos grânulos de insulina. Segundo os autores, esse processo explicaria, em termos bioquímicos, a fissão das membranas no sítio exocitótico, bem como o fenômeno da secreção em cadeia, em que dois ou mais grânulos são descarregados, em fileira, num mesmo local da membrana.

A participação do sistema efetor no processo de secreção de insulina foi revisada por LACY & MALAISSE (1973¹⁵³), OSTLUND (1977²³⁰) e MALAISSE & ORCI (1979¹⁸⁴).

1.2. ANTAGONISTAS DO CÁLCIO

À parte de elementos químicos que apresentam ações antagônicas às do Ca^{2+} (v.g. Mg^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , La^{3+}), várias drogas com efeitos farmacológicos similares, embora com estruturas químicas diversificadas, foram agrupadas como antagonistas orgânicos do Ca^{2+} (FLECKENSTEIN, 1977⁶⁷). As drogas mais representativas do grupo (verapamil, metoxiverapamil (D600), prenilamina, fendilina, nifedipina, diltiazem e suloctidil) in

terferem com a função normal do Ca^{2+} nos organismos vivos. Elas inibem as contrações dos músculos cardíaco e liso, a secreção glandular e a liberação de neurotransmissores (HIMORI, ONO & TAIRA, 1975¹²⁴; FLECKENSTEIN, 1977⁶⁷; NABATA, 1977²²⁵; NAGAO, IKEO & SATO, 1977²²⁷). Suas ações podem ser antagonizadas pelo aumento da concentração extracelular de Ca^{2+} . Várias dessas drogas têm sido utilizadas clinicamente, no tratamento de anginas, hipertensão e arritmias.

1.2.1. EFEITOS SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA

1.2.1.1. ANTAGONISTAS INORGÂNICOS

O efeito antagônico do Mg^{2+} sobre a secreção de insulina foi, inicialmente, estudado por BENNETT, CURRY & GRODSKY (1969²³), com a utilização de pâncreas perfundido. Eles verificaram bloqueio da secreção, quando elevaram a concentração de Mg^{2+} para níveis 2 ou 3 vezes maiores que os do Ca^{2+} . Segundo esses autores, o Mg^{2+} e o Ca^{2+} competiriam pelos mesmos sítios ativos da membrana celular ou granular, sendo que a ocupação desses sítios pelo Mg^{2+} impediria o efeito permissivo ou facilitatório do Ca^{2+} sobre a secreção. Em ilhotas isoladas, MALAISSE *et alii* (1976²⁰³) observaram uma inibição dose-dependente da secreção insulínica, com o uso de Mg^{2+} . Verificaram, também, que altas concentrações deste cátion provocam redução da incorporação de ^{45}Ca por ilhotas isoladas sem, no entanto, alterar o seu efluxo. Recentemente, SOMERS, DEVIS & MALAISSE (1979²⁵⁹) sugeriram a possibilidade de que o Mg^{2+} , em concentrações fisiológicas, exerça algum efeito inibitório sobre o processo de secreção (v.g. pela fa-

cilitação do contratransporte de saída do Ca^{2+}), de tal forma que a sua remoção liberaria a capacidade da célula beta secretar insulina, mesmo na ausência de Ca^{2+} extracelular.

Efeitos inibitórios do Co^{2+} foram observados por LAMBERT & HENQUIN (1974¹⁶⁰) e HENQUIN & LAMBERT (1975¹¹⁴). Em pregando ilhotas isoladas, esses autores verificaram inibição secretória, tanto na ausência quanto na presença de glucose ou leucina. A captação de ^{45}Ca foi, também, inibida. Esses efeitos foram mais acentuados em baixas concentrações de Ca^{2+} , indicando um antagonismo competitivo Ca^{2+} versus Co^{2+} . De acordo com DONATSCH *et alii* (1977⁵⁶), o Co^{2+} atuaria bloqueando o canal de Ca^{2+} *voltagem-dependente* da membrana da célula beta. Contudo, esse efeito, *per se*, não explica a redução da secreção basal (glucose ausente), observada por HENQUIN & LAMBERT (1975¹¹⁴).

Um efeito inibitório sobre a secreção, provocado pela presença de Ni^{2+} no meio extracelular de ilhotas, foi registrado por DORMER *et alii* (1973⁵⁷).

1.2.1.2. ANTAGONISTAS ORGÂNICOS

Efeitos inibitórios sobre a secreção de insulina, provocados por antagonistas orgânicos do Ca^{2+} , têm sido demonstrados por DEVIS *et alii* (1975⁵³) e MALAISSE *et alii* (1977²⁰⁰), com o emprego do verapamil; MALAISSE *et alii* (1976a¹⁹⁶) com o D600; MALAISSE *et alii* (1976b¹⁹⁷) com o R33711; MALAISSE (1977¹⁷⁸) usando o suloctidil e MALAISSE & BOSCHERO (1977¹⁸³) com a nifedipina. Todos esses antagonistas inibiram, de maneira dose-dependente, a secreção de insulina estimulada por glu

cose, sendo que o efeito foi mais acentuado em baixas concentrações de Ca^{2+} . Uma constatação em comum, feita por aqueles pesquisadores, foi a redução da captação de ^{45}Ca , tanto na presença, quanto ausência de glucose. Aparentemente, esses antagonistas não interferem no processo de reconhecimento da glucose como secretagogo.

A explicação que tem sido dada para o efeito inibitório dos antagonistas sobre a secreção de insulina é a redução na entrada de Ca^{2+} na célula beta. Não obstante, CHURCH & ZSOTÉR (1980³⁵), partindo de evidências obtidas com o uso de tecidos musculares, afastam a idéia de um efeito inibitório sobre a entrada de Ca^{2+} e admitem uma ação intracelular, provavelmente sobre a liberação e ligação do Ca^{2+} em reservatórios intracelulares.

1.3. ATUAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDICOS SOBRE TECIDOS EXCITÁVEIS

A gentamicina — gentiomicina C ou gentamicina C, segundo GLASBY (1976⁷⁵), — um dos antibióticos que utilizamos neste trabalho, pertence à divisão aminociclitólica do grupo dos antibióticos aminoglicosídicos. Os antibióticos deste grupo são bases orgânicas (exceção à viomicina), elaboradas por actinomicetos dos gêneros *Streptomyces* e *Micromonospora*. Compõem o grupo as famílias da estreptomicina (estrepto e diidroestreptomicina); da canamicina (canamicina, tobramicina e amiacina); da gentamicina (gentamicina, sisomicina e netilmicina); e da neomicina (neomicina, paromomicina, ribostamicina e lividomicina), além de outros, como aminosidina, soframicina,

espectinomicina, becanamicina, etc.

Todos os componentes do grupo, como apropriadamente indicado pelo nome, apresentam, na sua estrutura molecular, dois ou mais aminoaçúcares, conectados por enlaces glicosídicos a um anel inositólico modificado — o aminociclitol— (SANDE & MANDELL, 1980 ²⁴⁷).

1.3.1. AÇÕES DE ANTIBIÓTICOS DA FAMÍLIA DA GENTAMICINA SOBRE TECIDOS EXCITÁVEIS

1.3.1.1. JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

VITAL BRAZIL & PRADO-FRANCESCHI (1969a ²⁷⁵) verificaram uma interrupção na transmissão neuromuscular de preparações nervo-músculo de gato, após administração de gentamicina, que foi antagonizada pelo Ca^{2+} e, com menos constância, pela neostigmina. Esses mesmos autores observaram paralisia flácida em pombos, após administração de gentamicina. Dados comparáveis foram registrados por ADAMS *et alii* (1976 ⁸), que obtiveram uma redução da magnitude dos abalos musculares provocados por estimulação nervosa, após administração de gentamicina. Este efeito foi antagonizado pelo Ca^{2+} . Em 1972 ⁵⁹, DRETCHEN *et alii* constataram que a gentamicina reduz a liberação de acetilcolina na junção neuromuscular, concomitante com o bloqueio mioneural. Mais recentemente, ALBIERO *et alii* (1978 ⁹) observaram uma alta correlação entre os efeitos bloqueadores neuromusculares da netilmicina, sisomicina e gentamicina, e as suas toxicidades agudas.

1.3.1.2. SISTEMA CARDIOVASCULAR

ADAMS (1975b²) registrou, em babuínos, uma redução dose-dependente da frequência cardíaca, da força de contração do ventrículo esquerdo, do débito cardíaco, bem como das pressões sistólica e diastólica, conseqüentes à administração I.V. de antibióticos aminoglicosídicos, dentre os quais a gentamicina. Os efeitos foram rapidamente revertidos pela administração de Ca^{2+} . Esse mesmo autor (1975c³) demonstrou ações diretas da gentamicina sobre o miocárdio de rato. Por sua vez, ADAMS & DURRETT (1978⁶) sugerem que a gentamicina provoca o desacoplamento do processo de excitação-contração no músculo cardíaco, talvez pela inibição da ligação do Ca^{2+} nos sítios membranares superficiais.

Em musculatura lisa vascular de mamíferos, ADAMS, GOODMAN & WEISS (1974⁷) e GOODMAN & ADAMS (1976⁷⁸) constataram um efeito inibitório, dose-dependente, da gentamicina sobre a captação de ^{45}Ca , bem como depressão da resposta contrátil. Esses autores sugerem que a inibição direta da contratilidade da musculatura lisa vascular pode estar envolvida na etiologia das ações hemodinâmicas depressoras dos antibióticos aminoglicosídicos.

1.3.2. AÇÕES DE OUTROS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDICOS SOBRE TECIDOS EXCITÁVEIS

1.3.2.1. JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

Ocorrências clínicas de efeitos colaterais, provocadas por antibióticos aminoglicosídicos, têm sido descri

tas na literatura. Assim, PRIDGEN (1956²⁴¹) apresenta casos de parada respiratória, decorrentes da administração de neomicina a pacientes. HOKKANEN (1964¹²⁵) observou o efeito agravante causado por antibióticos aminoglicosídicos, em pacientes portadores de miastenia grave. Uma extensa revisão de casos clínicos, a esse respeito, foi feita por PITTINGER, ERYASA & ADAMSON (1970²³⁸).

Experimentalmente, um grande número de pesquisadores tem demonstrado a ação bloqueadora neuromuscular de antibióticos aminoglicosídicos (VITAL BRAZIL & CORRADO, 1957²⁷⁴; CORRADO, RAMOS & DE ESCOBAR, 1959⁴²; ELMQVIST & JOSEFSSON, 1962⁶⁴; VITAL BRAZIL & PRADO-FRANCESCHI, 1969b²⁷⁶; DUNKLEY, SANGHVI & GOLDSTEIN, 1973⁶¹; CORRADO, PRADO & PIMENTA DE MORAIS, 1975⁴³; WRIGHT & COLLIER, 1977²⁸⁴; LEE & DE SILVA, 1979¹⁶⁵) e outros. Uma verificação quase unânime, feita por diferentes estudiosos, é de que o aumento da concentração de Ca^{2+} no meio provoca a reversão dos efeitos daqueles antibióticos. DRETCHEN *et alii* (1973⁶⁰) consideram que a estreptomicina atua, tanto inibindo a atividade do terminal do nervo motor, como reduzindo a sensibilidade da placa motora à acetilcolina. O primeiro efeito decorreria de um antagonismo competitivo entre o Ca^{2+} e a estreptomicina, a nível pré-sináptico (PRADO, CORRADO & MARSEILLAN, 1978²⁴⁰).

Por sua vez, SUAREZ-KURTZ (1974²⁶⁵) obteve resultados indicativos de uma ação depressora da estreptomicina e neomicina sobre a condutância membranar ao Ca^{2+} , o que inibiria o desenvolvimento da tensão muscular.

Para explicar a ação bloqueadora neuromuscular produzida pelos antibióticos aminoglicosídicos, VITAL BRAZIL & PRADO-FRANCESCHI (1969b²⁷⁶) postulam que estes antibióticos,

a nível do terminal nervoso, competiriam com o Ca^{2+} pelos mesmos sítios de ligação deste cátion, impedindo o seu suposto efeito sobre a liberação de acetilcolina. As hipóteses que tentam explicar a ação bloqueadora neuromuscular dos antibióticos aminoglicosídicos foram assunto de revisão elaborada por PITTINGER & ADAMSON (1972²³⁷).

1.3.2.2. SISTEMA CARDIOVASCULAR

Ações inibitórias de antibióticos aminoglicosídicos sobre parâmetros do funcionamento cardíaco têm sido relacionadas por diversos autores (SWAIN, KIPLINGER & BRODY, 1956²⁶⁷; LEADERS, PITTINGER & LONG, 1960¹⁶⁴; COHEN *et alii*, 1970³⁶; ADAMS, 1975a¹, b²; PAYET *et alii*, 1980²³³). Por outro lado, efeitos inibitórios sobre os processos fisiológicos da contratilidade da musculatura lisa vascular foram observados por WOLF & WIGTON (1971²⁸⁰), WEISS, GOODMAN & ADAMS (1973²⁷⁷), GOODMAN, WEISS & ADAMS (1974⁷⁹), ADAMS & GOODMAN (1975⁵) e GOODMAN & ADAMS (1976⁷⁸). Alterações cardiovasculares provocadas pelos antibióticos em geral foram sumarizadas por ADAMS (1976⁴).

1.3.2.3. MUSCULATURA LISA RESPIRATÓRIA E INTESTINAL

Efeitos inibitórios da aminosidina e da estreptomicina sobre a musculatura bronquial foram relatados por BENZI *et alii* (1971²⁴) e ALTINKURT & KANZIK (1980¹¹), respectivamente. A nível de musculatura lisa intestinal, uma ação inibitória exercida pela estreptomicina foi descrita por LEADERS,

PITTINGER & LONG (1960¹⁶⁴), DŽOLJIĆ & ATANACKOVIĆ (1965⁶²) e PIMENTA DE MORAIS, CORRADO & SUAREZ-KURTZ (1978²³⁵). A possibilidade de uma competição entre Ca^{2+} e antibióticos aminoglicosídicos, a nível da membrana celular das fibras musculares lisas, é considerada por PIMENTA DE MORAIS, CORRADO & SUAREZ-KURTZ (1978²³⁵), para explicar os efeitos inibitórios observados.

1.3.2.4. TECIDO NERVOSO

Uma ação ganglioplégica provocada por antibióticos aminoglicosídicos foi verificada por CORRADO (1958³⁹), LEADERS, PITTINGER & LONG (1960¹⁶⁴) e ALKADHI & McISAAC (1978¹⁰), com o uso de estreptomicina; CORRADO & RAMOS (1958⁴⁰) e WRIGHT & COLLIER (1977²⁸⁴), com neomicina e CORRADO & RAMOS (1960⁴¹), empregando a canamicina. Todos esses autores constataram uma reversão do bloqueio ganglionar, após elevarem a concentração extracelular de Ca^{2+} .

Por sua vez, DIECKE, WESTECKER & VOGT (1971⁵⁵) observaram uma inibição nos parâmetros do funcionamento fisiológico de fibras nervosas mielinizadas, conseqüente à aplicação de estreptomicina.

1.4. OUTRAS AÇÕES DE ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSIDÍCOS

PICCININI *et alii* (1973²³⁴), utilizando modelo de membrana, verificaram que gentamicina, neomicina, ampicilina, canamicina e estreptomicina inibem, de maneira dose-de

pendente, a transferência de Na^+ , K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} , efetivada pela cefalina. Aqueles autores constataram que os mesmos antibióticos também inibem o transporte de ^{45}Ca feito pela fosfatidilserina e fosfatidilinositol, com uma potência relativa similar à que se tem observado para os efeitos inibitórios sobre tecidos musculares.

SCHIBECI & SCHACHT (1977²⁵¹) estudaram o efeito da neomicina sobre o metabolismo de fosfolípides, a nível renal. Após tratamento crônico de cobaias com esse aminoglicosídico, notaram uma redução da incorporação de fosfato na fração polifosfoinositolica desse tecido. Em experimentos realizados *in vitro*, os mesmos autores demonstraram, em homogenatos, uma inibição da marcação do fosfatidilinositol-difosfato, bem como, inibição da hidrólise enzimática do fosfatidilinositol-fosfato e difosfato, provocadas pelo mesmo antibiótico.

Recentemente, LODHI, WEINER & SCHACHT (1979¹⁷⁰) consideraram a possibilidade dos polifosfoinositóis atuarem, a nível da membrana celular, como receptores fisiológicos dos aminoglicosídicos.

1.5. ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDICOS E NÍVEIS DE CÁLCIO IONIZADO

CORRADO (1963, *apud* PITTINGER & ADAMSON, 1972²³⁷) atribui o efeito bloqueador neuromuscular da estreptomicina, neomicina e canamicina à sua capacidade de reduzir o nível sérico de cálcio. Sua hipótese foi apoiada por uma publicação de HAVÁ, SOBEK & MIKULÁŠKOVA (1961, *apud* PITTINGER & ADAMSON, 1972²³⁷), que detectaram redução no nível de cálcio ionizado,

provocada por neomicina. A hipótese de quelação do cálcio pelos antibióticos aminoglicosídicos não foi, entretanto, consistente com uma série de resultados experimentais obtidos com o uso desses fármacos (PITTINGER & ADAMSON, 1972²³⁷; CORRADO, PRADO & PIMENTA DE MORAIS, 1975⁴³).

Por outro lado, em desacordo com os resultados de HAVÁ, SOBEK & MIKULÁŠKOVA (1961, *apud* PITTINGER & ADAMSON, 1972²³⁷), ELMQVIST & JOSEFSSON (1962⁶⁴) e SUAREZ-KURTZ (1974²⁶⁵) não detectaram qualquer redução significativa nos níveis de cálcio ionizado em soluções contendo neomicina em concentrações da ordem de 10^{-3} e 10^{-2} M.

1.6. SIMILARIDADE DE EFEITOS PROVOCADOS POR ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDICOS

Verifica-se que, apesar da diversidade das famílias às quais pertencem, os antibióticos aminoglicosídicos provocam, a nível de tecidos excitáveis, efeitos essencialmente idênticos. Nesse sentido, pode-se esperar que antibióticos pertencentes a uma mesma família (v.g. gentamicina e sisomicina, que diferem entre si apenas por um radical metil) produzam efeitos experimentais comparáveis.

1.7. PROPOSIÇÃO DO TRABALHO

Com base nas constatações clínicas e/ou experimentais aqui expostas, de que: (a) o processo da secreção de insulina é dependente do Ca^{2+} extracelular; (b) drogas que ini

bem a entrada de Ca^{2+} na célula beta provocam inibição secre-
tória de insulina e (c) antibióticos aminoglicosídicos produ-
zem efeitos inibitórios nos tecidos excitáveis em geral, atra-
vés de uma interferência com processos ligados à dinâmica do
 Ca^{2+} , decidimos analisar o possível efeito inibitório desses
antibióticos sobre a secreção de insulina e o(s) mecanismos(s)
de ação envolvido(s) neste processo.

MATERIAL E MÉTODO

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos Wistar, de ambos os sexos, de 3 a 6 meses de idade, procedentes do biotério do próprio Departamento. Forneceu-se ração balanceada e água *ad libitum*, suplementados com o complexo vitamínico Vitagold*.

2.2. TÉCNICA DE ISOLAMENTO DAS ILHOTAS DE LANGERHANS

Basicamente, utilizou-se a técnica descrita por MOSKALEWSKI (1965²²³) e LACY & KOSTIANOVSKY (1967¹⁵²), ligeiramente modificada por BOSCHERO, DELATTRE E SANTOS (1980²⁹).

Em cada experimento, de 3 a 6 ratos foram sacrificados por concussão cerebral, decapitados para sangria e laparotomizados para localização do ducto biliar comum. Este ducto foi ocluído na sua extremidade distal, junto ao duodeno, dissecado próximo ao pedículo hepático e uma cânula de polietileno introduzida em direção à sua desembocadura. Injetaram-se de 10 a 20 ml de solução de HANKS que, fluindo retrogradamente através dos ductos pancreáticos, provocou a divulsão do tecido acinoso.

Após excisão e retirada dos nódulos linfáticos e gordura, os pâncreas foram reduzidos a fragmentos de aproxima

* Lab. Tortuga (São Paulo, SP).

damente $0,5 \text{ mm}^3$, utilizando-se tesoura, e posteriormente transferidos para um tubo de ensaio de $12 \times 1,5 \text{ cm}$, contendo de 6 a 10 mg de collagenase para cada pâncreas. Incubou-se a 37°C durante $15 \pm 1 \text{ min}$. Nos primeiros 7 a 8 min o conteúdo foi movimentado pela passagem de carbogênio— $95\% \text{ O}_2 : 5\% \text{ CO}_2$ (v/v), — sendo agitado manualmente no restante do tempo.

Finda a digestão do tecido acinoso, foram executadas quatro sucessivas lavagens do conteúdo. Em cada lavagem, este foi ressuspendido em solução de HANKS e centrifugado. As lavagens serviram para segregar parte do tecido acinoso, reduzir o conteúdo de collagenase e enzimas digestivas do meio e concentrar as ilhotas. O produto final foi depositado em placa de PETRI, para coleta das ilhotas.

Algumas vezes, um procedimento alternativo foi utilizado para o enriquecimento, em ilhotas, do material obtido. Assim sendo, o produto digerido foi lavado cinco vezes com solução de HANKS, seguindo-se decantações, em que o sobrenadante foi aspirado, ficando as ilhotas depositadas no fundo.

2.3. SECREÇÃO DE INSULINA EM CONDIÇÃO ESTATICA

As ilhotas, uma vez isoladas, foram coletadas uma a uma, com o auxílio de alça de vidro e transferidas para pequenos recipientes de plástico contendo 1,0 ml de solução tampão-bicarbonato de KREBS-RINGER (KREBS), suplementada com albumina 0,2% (m/v). Quando necessário, a composição do meio de incubação foi alterada (a) pela introdução de glucose e/ou sais e/ou antibióticos; (b) pela diminuição ou supressão de sais. Estas alterações serão especificadas nos Resultados.

Para atenuar os inconvenientes da grande variabilidade experimental da secreção de insulina, decorrentes de diferenças (a) no tamanho das ilhotas (HELLMAN, 1970⁹⁸; STEINKE, PATEL & AMMON, 1972²⁶⁴) e (b) no grau de atuação da colagenase e enzimas contaminantes (LERNMARK, 1971¹⁶⁷; HAHN *et alii*, 1976⁹¹), os recipientes, preparados para receber as ilhotas coletadas, foram previamente distribuídos ao acaso.

Em todos os experimentos, 4 ou 8 ilhotas foram coletadas em cada recipiente. A seguir, acondicionaram-se os recipientes em frascos de vidro, providos de tampa com dispositivo para entrada e saída de carbogênio. O pH (7,4) do KREBS foi ajustado através da passagem desse gás por 10 min. Os frascos foram completamente vedados, procedendo-se à incubação por 90 min, a 37°C, sob constante agitação (aprox. 100 ciclos/min) em banho-maria. Simultaneamente, e para cada uma das condições experimentais, incubaram-se 3 recipientes contendo solução-controle (sem ilhotas).

Terminada a incubação, os frascos foram introduzidos em gelo, e uma alíquota de cada meio transferida para tubo de ensaio e estocada em congelador até o instante do radioimunoensaio (RIE). A transferência de ilhotas foi evitada examinando-se, sob lupa, cada recipiente.

2.4. INCORPORAÇÃO DE CÁLCIO (^{45}Ca) POR ILHOTAS DE LANGERHANS ISOLADAS

A técnica utilizada foi originalmente descrita por MALAISSE-LAGAE & MALAISSE (1971²¹⁰).

Foram coletadas 300 ilhotas, distribuídas em grupos de 100. A coleta foi feita alternadamente, 10 ilhotas de cada vez, em cada um dos tubos de ensaio 5 x 1 cm, que continham 1,0 ml de KREBS sem glucose.

Terminada a coleta, os sobrenadantes foram descartados, sendo adicionados 500 μ l de KREBS contendo ^{45}Ca (60 $\mu\text{Ci/ml}$). Quando necessárias, modificações da composição (adição de glucose e/ou sisomicina) foram feitas no KREBS, as quais serão indicadas nos Resultados. A partir daí, os tubos receberam tratamento idêntico àquele já descrito no item 2.3., no que se refere ao acondicionamento e incubação dos recipientes.

Após a incubação, o sobrenadante de cada tubo foi transferido para novos recipientes, para ser usado como padrão externo (MÁXIMO). As ilhotas foram lavadas quatro vezes empregando-se, a cada lavagem, 1,0 ml de meio idêntico ao usado na incubação, exceto pela omissão do ^{45}Ca . Em seguida, foram distribuídas em placas de PETRI e recoletadas, em grupos de 8, em frascos plásticos apropriados para cintilação líquida, os quais continham 1,0 ml de água.

Todas as etapas pós-incubação foram executadas a baixa temperatura (0 a 4°C).

A radioatividade que permaneceu nas ilhotas, ao fim das lavagens, foi referida como sendo a incorporação de ^{45}Ca , e o efeito da sisomicina sobre este parâmetro foi investigado. Para determinação da radioatividade do MÁXIMO, tomou-se o equivalente a 1,0 μ l do meio de incubação, de cada uma das condições experimentais.

A cada um dos frascos de contagem adicionaram-se 5,0 ml de líquido de cintilação. A mistura usada consistiu

de 33% (v/v) do agente tensoativo Tinoventine e 67% de toluol, acrescida do cintilador orgânico Omnifluor, na proporção de 4,0 mg/100 ml de toluol. A contagem das desintegrações foi feita em um contador Beckman LS 100C para partículas beta.

A quantidade de cálcio incorporado (pmol/ilhota) pode ser obtida calculando-se, inicialmente, a razão de ^{45}Ca incorporado (por ilhota) a partir de um volume arbitrário do meio de incubação e, a seguir, multiplicando-se esse valor pela massa (pmol) de cálcio contida naquele volume. Isso equivale a determinar-se a razão do ^{45}Ca incorporado (cpm*/ilhota) pela atividade específica do ^{45}Ca no meio de incubação (cpm/pmol).

Operacionalmente, para se determinar a quantidade de Ca^{2+} incorporado, obtivemos, de início, um fator F, pela seguinte fórmula:

$$F = \frac{1000}{\text{cpm do (MÁXIMO)} \times 8}$$

A multiplicação do fator F pelo nº de cpm de cá da amostra forneceu a quantidade, em picomoles, do cálcio incorporado, durante 90 min, por ilhota.

Na fórmula:

$$1000 = \text{quantidade (pmol) de } \text{Ca}^{2+} \text{ contida em } 1,0 \mu\text{l do meio de incubação (concentração de } \text{Ca}^{2+} = 1,0 \text{ mM)}.$$

* cpm = contagens por minuto.

cpm do (MÁXIMO) = nº de cpm contados a partir de
1,0 µl do meio de incubação.

8 = nº de ilhotas coletadas em cada frasco.

Os resultados serão expressos em pmol de Ca^{2+} /
ilhota por 90 min.

2.5. RADIOIMUNOENSAIO DE INSULINA

2.5.1. TÉCNICA DE SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES — LIVRE OU LIGADA AO ANTICORPO — PELA CELULOSE (RIE-CELULOSE)

Para a dosagem da insulina imunorreativa de rato (IIRR), contida no líquido de incubação das ilhotas de Langerhans isoladas, utilizou-se a técnica descrita por MALAISSE, BRISSON & MALAISSE-LAGAE (1970¹⁸⁹).

Empregaram-se tubos de vidro de 12 x 1 cm, distribuídos em 4 grupos denominados AMOSTRAS, CONTROLES, MÁXIMOS E MÍNIMOS.

Transferiram-se 0,5 ml das AMOSTRAS e CONTROLES (solução de incubação sem ilhotas) para os respectivos tubos. Os MÁXIMOS e MÍNIMOS receberam 2,0 ml de tampão fosfato suplementado com albumina (TFA) 1,0% (m/v) e foram feitos em duplicatas ou triplicatas, para cada uma das condições experimentais da incubação.

Os tubos referentes às AMOSTRAS e CONTROLES receberam, então, 0,5 ml da solução de anticorpo

(guinea-pig anti insulin serum - GPAIS)* diluído em TFA 1,0%, (m/v). Misturou-se em vortex e incubou-se por 30 min, sem agitação, a 37°C. Esses tubos foram, em seguida, mergulhados em gelo fundente para se inibir a reação anticorpo x insulina.

Adicionaram-se 0,5 ml de uma mistura de insulina** marcada***, com insulina não-marcada****, a todos os tubos. Misturou-se e aguardaram-se 30 min à temperatura ambiente.

Pipetou-se 1,0 ml de uma suspensão de celulose 10,0% (m/v), em tampão fosfato, a cada um dos tubos, excetuando-se aqueles do MÁXIMO. Misturou-se e, após 30 min à temperatura ambiente, os tubos foram novamente agitados e centrifugados, por 10 min a 900 g, em centrífuga não-refrigerada.

Coletou-se 1,0 ml do sobrenadante e transferiu-se para tubo de ensaio de 7,5 x 1,0 cm, procedendo-se, então, à contagem das desintegrações, em contador gama, calibrado para ^{125}I .

A quantidade de insulina secretada no meio de incubação, durante 90 min, foi calculada multiplicando-se o fator F (determinado pela equação que segue) pelo n° de cpm obtido para cada AMOSTRA. Os resultados serão expressos em microunidades (μU)/ilhota por 90 min.

* Anticorpo WRIGHT com capacidade teórica de ligação de 1,62 mU por microlitro do antisoro total extraído de cobaia. Adicionou-se uma quantidade suficiente para ligar o dobro da massa de insulina máxima prevista para cada tubo ensaiado.

** A mistura de insulinas foi feita em TFA 10,0% (m/v).

***Insulina porcina marcada com ^{125}I (aprox. 100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$).

****Insulina bovina não-marcada. Adicionou-se em quantidade equivalente a 3 vezes a insulina máxima prevista.

$$F = \frac{1}{A-B} \times \text{mU insulina} \times \frac{1}{i} \times \frac{1}{0,5} \times \frac{\text{ctl}}{\text{cal}} \times 1000$$

onde:

A = n° máximo de cpm (MÁXIMO)

B = n° mínimo de cpm (MÍNIMO)

mU = quantidade conhecida de insulina bovina, adicionada a cada tubo

i = n° de ilhotas coletadas em cada frasco de incubação

0,5 = volume (ml) da alíquota utilizada na dosagem

ctl = capacidade teórica de ligação do anticorpo

cal* = capacidade aparente de ligação do anticorpo

1000 = fator de conversão de mU para µU.

Um resumo das etapas descritas consta do quadro 1.

2.5.2. TÉCNICA DE SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES PELO POLIETILENOGLICOL (RIE-PEG)

Alíquotas do meio de incubação de ilhotas, de volume entre 10 e 100 µl, foram transferidas para tubos de ensaio de 7,5 x 1,0 cm. Alíquotas menores que 100 µl foram completadas, até esse volume, com KREBS.

$$* \text{ cal} = \frac{C - B}{A - B} \times \frac{\text{mU insulina}}{\mu\text{l de GPAIS}}$$

onde:

C = média do n° de cpm dos CONTROLES

µl GPAIS = volume do antisoro pipetado em cada tubo.

REAGENTES TUBOS (CONDIÇÕES)	AMOSTRA ou CONTROLE (ml)	TFA 1,0 g% (ml)	GPAIS (ml)	MISTURA-SE E AGUARDAM-SE POR 30 min A 37°C AGITAÇÃO		MISTURA de INSULINAS (ml)	MISTURA-SE E AGUARDAM-SE 30 min A TEMPERATURA AMBIENTE	CELULOSE (ml)	
MÁXIMO		2,0				0,5	MISTURA-SE E AGUARDAM-SE 30 min A TEMPERATURA AMBIENTE		MISTURA-SE E AGUARDAM-SE 30 min A TEMPERATURA AMBIENTE CENTRIFUGA-SE POR 10 min a 1200 g
MÍNIMO		1,0				0,5		1,0	
AMOSTRAS	0,5		0,5	MISTURA-SE E INCUBA-SE A 37°C POR 30 min, SEM AGITAÇÃO		0,5		1,0	
CONTROLES	0,5		0,5			0,5			COLETA-SE 1,0 ml DO SOBRENADANTE E CONTA-SE A RADIOATIVIDADE

QUADRO 1. Resumo das etapas do RIE-CELULOSE. Os reagentes estão indicados na parte superior do quadro, sendo seus respectivos volumes, relativos a cada condição, inscritos nos locais correspondentes. A sequência de adição de cada componente segue o sentido da esquerda para a direita. MÁXIMO-indica a quantidade total de insulina radioativa pipetada em cada tubo; MÍNIMO-indica a radioatividade não-precipitável pela celULOSE; AMOSTRAS-alíquotas do meio de incubação das ilhotas; CONTROLE-alíquotas do meio de incubação sem ilhotas; TFA 1 g%-tampão fosfato suplementado com albumina 1,0 g% (m/v); GPAIS-quinea-pig anti *insulin serum* - solução contendo anticorpo de cabaia, antiinsulina de porco; MISTURA DE INSULINAS-solução contendo insulina porcina marcada e insulina bovina não-marcada; CELULOSE-suspensão de celULOSE 10,0 g% (m/v) em tampão fosfato.

Adicionaram-se 100 μ l de uma solução de GPAIS diluído em tampão veronal e misturou-se em *vortex*. Após 3 h de incubação em temperatura ambiente, foram misturados 100 μ l de uma solução, em tampão veronal, de 125 I-insulina (200 a 240 μ Ci/ μ g; aprox. 1,2 μ U/tubo).

Para a separação das frações de insulina marcada (livre ou ligada ao anticorpo), utilizou-se a técnica de precipitação do complexo antígeno-anticorpo pela adição de polietilenoglicol (PEG), de acordo com especificações de DESBUQUOIS & AURBACH (1971⁵⁰). Assim sendo, decorridas 3 h (temp. ambiente) após adição de insulina marcada, adicionaram-se 100 μ l de soro *strip** e 1,0 ml de solução de PEG** 20% (m/v)***. Misturou-se vigorosamente e centrifugou-se a 800 g por 15 min, em centrífuga não-refrigerada. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade do precipitado, lida em contador gama.

Em cada RIE-PEG executou-se uma curva de referência com insulina bovina, de atividade biológica conhecida, juntamente com uma curva de equivalência. Esta foi obtida a partir de diluições de um pool de insulina secretada *in vitro*, conforme descrito no item 2.8.5. Quando se dispôs de insulina murina

* O soro *strip* (soro isento de insulina) foi preparado adicionando-se 1,25% (m/v) de carvão Norit A e 0,25% (m/v) de dextran T₇₀ a soro bovino, agitando-se por 2 h e centrifugando-se várias vezes, até que o soro se apresentasse límpido.

** O PEG foi dissolvido em tampão fosfato 0,05 M e pH 7,5, sendo misturado por 30 min. Acertou-se o pH para 8,6 pela adição de NaOH 1 N. Sua temperatura foi reduzida para 4°C antes da pipetagem.

*** Testaram-se concentrações de PEG entre 18 e 22% (m/v) (resultados não incluídos), não se observando diferenças significativas nas suas capacidades de precipitar o complexo insulina-anticorpo.

cristalizada, de atividade biológica conhecida, a mesma foi usada para a curva de referência.

Em paralelo, foram feitos o BRANCO, que recebeu 100 μ l de KREBS e 100 μ l de tampão veronal, e o ZERO INSULINA, no qual se pipetaram 100 μ l de KREBS e 100 μ l da solução de GPAIS. Esses tubos seguiram as mesmas etapas dos anteriores, a partir da 1.^a incubação. A quantidade (TOTAL) de insulina utilizada em cada tubo de ensaio foi avaliada pela contagem das desintegrações em 100 μ l de insulina marcada.

Os pontos da CURVA, BRANCO, TOTAL e ZERO INSULINA foram sempre executados em duplicatas ou triplicatas.

Para os cálculos, a radiação (cpm) média dos BRANCOS foi descontada de todos os tubos, exceção ao TOTAL. A radiação de cada ponto da CURVA e das AMOSTRAS foi referida percentualmente à radiação média dos ZERO INSULINA, resultando na relação B/B_0^* . A curva de referência foi traçada dispondo-se B/B_0 versus concentração de insulina, ambos em escala logarítmica. A melhor reta de regressão foi obtida pelos mínimos quadrados.

Os valores de IIRR, quando obtidos em termos de *equivalentes de insulina bovina*, foram ajustados através da aplicação de uma *curva de equivalência*, sendo o resultado final expresso em μ U de insulina/ilhota por 90 min. Em alguns

* *Bound* da AMOSTRA ou ponto da CURVA / *bound* do ZERO INSULINA. Relação, geralmente expressa em percentagem, entre a radioatividade (cpm) do precipitado (nessa técnica em particular) da AMOSTRA ou ponto da CURVA e a radioatividade do ZERO INSULINA.

RIE-PEG, utilizou-se diretamente uma curva de referência feita com insulina murina liofilizada, de atividade biológica conhecida, dispensando, assim, a aplicação das curvas de insulina bovina e de equivalência.

O quadro 2 resume todas as etapas descritas para a dosagem.

2.6. TÉCNICA DE MARCAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE INSULINA

O procedimento utilizado (iodação de radicais tirosil) baseou-se no original de HUNTER & GREENWOOD (1962¹³³) e de GREENWOOD, HUNTER & GLOVER (1963⁸¹), com modificações introduzidas por ROTH (1973²⁴⁵). Essas modificações incluem a forma de adição do agente oxidante (cloramina T), que foi feita de maneira gradativa (estequiométrica), objetivando um menor dano à molécula de insulina. Assim sendo, a um tubo de ensaio de 7,5 x 1 cm, adicionaram-se, sucessivamente: 1,0 mCi de $^{125}\text{I}^{*,**}$; 35,0 μl de tampão fosfato 0,3 M e pH 7,4; de 2,0 a 5,0 μl **

* Na^{125}I em NaOH 0,1 M, aprox. 350 mCi/ml e 17 Ci/mg

** Os volumes de ^{125}I e insulina porcina foram ajustados, considerando-se a atividade específica (AE) desejada para a ^{125}I -insulina, de acordo com a expressão:

$$\text{AE} = \frac{A^{125}\text{I} \times V^{125}\text{I}}{m} \times 0,65$$

sendo que:

AE = Atividade específica que se deseja para a ^{125}I -insulina ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)

$A^{125}\text{I}$ = Atividade da solução de iodo radioativo ($\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)

$V^{125}\text{I}$ = Volume da solução de iodo radioativo (μl)

m = massa de insulina porcina (μg)

0,65 = eficiência média prevista para a marcação

REAGENTES	AMOSTRA ou CURVA	KREBS	GPAIS	TAMPÃO VERONAL	INSULINA MARCADA	SORO STRIP	PEG	
TUBOS (CONDIÇÕES)	(µl)	(µl)	(µl)	(µl)	(µl)	(µl)	(ml)	
TOTAL					100			
BRANCO		100		100	100	100	1	MISTURA-SE E CENTRIFUGA-SE POR 15 min a 800 g
ZERO		100	100		100	100	1	MISTURA-SE O SOBRENADANTE E LE-SE A RADIOATIVIDADE DO PPT.
INSULINA		100	100		100	100	1	
PONTOS			100		100	100	1	
DA CURVA	100							
AMOSTRAS	10-100	90-0	100		100	100	1	

QUADRO 2. RESUMO DAS ETAPAS DO RIE-PEG. Os reagentes estão indicados na parte superior do quadro, sendo seus respectivos volumes, relativos a cada condição, inscritos nos locais correspondentes. A sequência de adição de cada componente segue o sentido da esquerda para a direita. BRANCO indica a radioatividade precipitável inespecificamente; ZERO INSULINA indica a radioatividade precipitável na ausência de insulina não-marcada; PONTOS DA (CURVA) são cada uma das concentrações de insulina não-marcada utilizadas; AMOSTRA(S) são alíquotas do meio de incubação das ilhotas; KREBS é a solução tampão bicarbonato, suplementada com albumina 0,2% (m/v); GPAIS é a solução do anticorpo antiinsulina; TAMPÃO VERONAL 0,15 M pH 7,4; INSULINA MARCADA é a solução contendo insulina porcina radioiodada; SORO STRIP é soro bovino tratado com carvão neutro e dextrans, isento de insulina, e PEG é solução de polietilenoglicol 20% (m/v) em tampão fosfato.

de solução de insulina porcina (1,0 mg/ml, em HCl 0,01 N) e 20,0 μ l de cloramina T (40 μ g/ml em tampão fosfato 0,3 M e pH 7,4).

Uma amostra da mistura foi retirada com ponta de agulha, misturada com 1,0 ml de TFA 0,2% e 1,0 ml de solução de ácido tricloroacético 10% (TCA) e centrifugada. A radioatividade do sobrenadante e do precipitado foi lida em contador gama, e a relação B/T* calculada. Subseqüentes adições de cloramina T foram feitas, até a obtenção de uma relação B/T de 60 a 70%.

Uma vez obtida a atividade específica desejada para a insulina, adicionaram-se 5,0 μ l de metabissulfito de sódio (200,0 μ g/ml, em tampão fosfato 0,3 M e pH 7,4), para inibir a oxidação do iodeto. Finalmente, acrescentaram-se 100 μ l de TFA 2,5% (m/v).

Para a separação da fração indene de insulina iodada, daquela danificada e do iodo livre, utilizou-se uma coluna de celulose Whatman, de 4 cm de altura, compactada em pipeta Pasteur, sobre a qual se aplicou o material da reação.

Lavou-se a coluna com 6,0 ml de água destilada, passando-se 1,0 ml de cada vez, para eliminação do iodo livre e fragmentos de insulina.

Para eluição da insulina marcada, empregou-se uma mistura de álcool-ácido**. Foram feitas 5 eluições, passando-se

* B/T = relação entre a radioatividade (cpm) do precipitado e a radioatividade total colocada no tubo.

** 75 % de álcool etílico absoluto
1,5% de ácido clorídrico concentrado, 36-37% (m/v)
23,5% de água destilada
Os percentuais são (v/v).

0,4 ml da mistura, de cada vez. Obtiveram-se, assim, 5 frações de insulina marcada.

Para avaliação do índice de pureza de cada fração, bem como da massa de insulina marcada de cada uma, um volume conhecido (1,0 a 5,0 μ l) de cada fração eluída foi transferido para tubo de ensaio contendo 1,0 ml de TFA 0,2% (m/v) e 1,0 ml de TCA. Após mistura, centrifugou-se e leu-se, em separado, a radioatividade do sobrenadante e do precipitado. O grau de pureza foi calculado pela razão percentual entre a radioatividade do precipitado e a radioatividade total. Para cada fração eluída, o índice de pureza (IP) foi determinado em duplicata e pode ser expresso pela fórmula:

$$IP = \frac{\text{cpm do precipitado}}{\text{cpm total}} \times 100$$

As frações com índice de pureza superior a 90% foram diluídas em tampão veronal suplementado com albumina 3,0% (m/v), divididas em frascos apropriados e cristalizadas sob baixa pressão, à temperatura ambiente, por 18 h. Foram, então, estocadas em congelador até uso no RIE.

2.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA INSULINA MARCADA

A atividade específica da ^{125}I -insulina foi estimada pela técnica do autodeslocamento, originalmente descrita por GOCKE *et alii* (1969, *apud* MORRIS, 1976 ²²²) e reavaliada por MORRIS (1976 ²²²).

Em síntese, a técnica requer: 1) a execução de

uma curva de referência e, 2) uma série de tubos com quantidades crescentes da insulina marcada (QCI) de atividade específica a ser determinada.

A curva de referência foi executada com insulina porcina não-marcada, da forma constante do item 2.5.2., usando-se necessariamente, como traçador, a própria insulina marcada de que se quer determinar a atividade específica.

Para a série QCI, cada tubo recebeu 100 μ l de solução, em tampão veronal, da mesma insulina marcada referida acima. A radioatividade pipetada em cada tubo variou de 1 500 a 180 000 cpm. Misturou-se e incubou-se por 3 h, à temperatura ambiente.

A separação das frações foi realizada conforme descrito no item 2.5.2. Foram lidas, em contador gama, tanto a radioatividade total de cada tubo, quanto aquela exclusiva do precipitado.

Traçada a curva de referência (μ U de insulina não-marcada x B/T), determinou-se a concentração de insulina radioativa presente em cada tubo da série QCI, pela interpolação, nessa curva, dos seus respectivos B/T.

A seguir, dispendo-se linearmente a radioatividade total de cada tubo da série QCI (na abscissa) versus sua concentração de insulina marcada (na ordenada) (Fig.2), traçou-se, pela técnica dos mínimos quadrados, a reta de melhor ajuste dos pontos. O prolongamento desta reta até a ordenada forneceu a concentração (e a massa) de insulina marcada que fora utilizada na curva de referência. A concentração corresponde ao valor absoluto do ponto de interceptação da reta com aquele eixo. A reta deve interceptar a abscissa no valor de cpm corresponden-

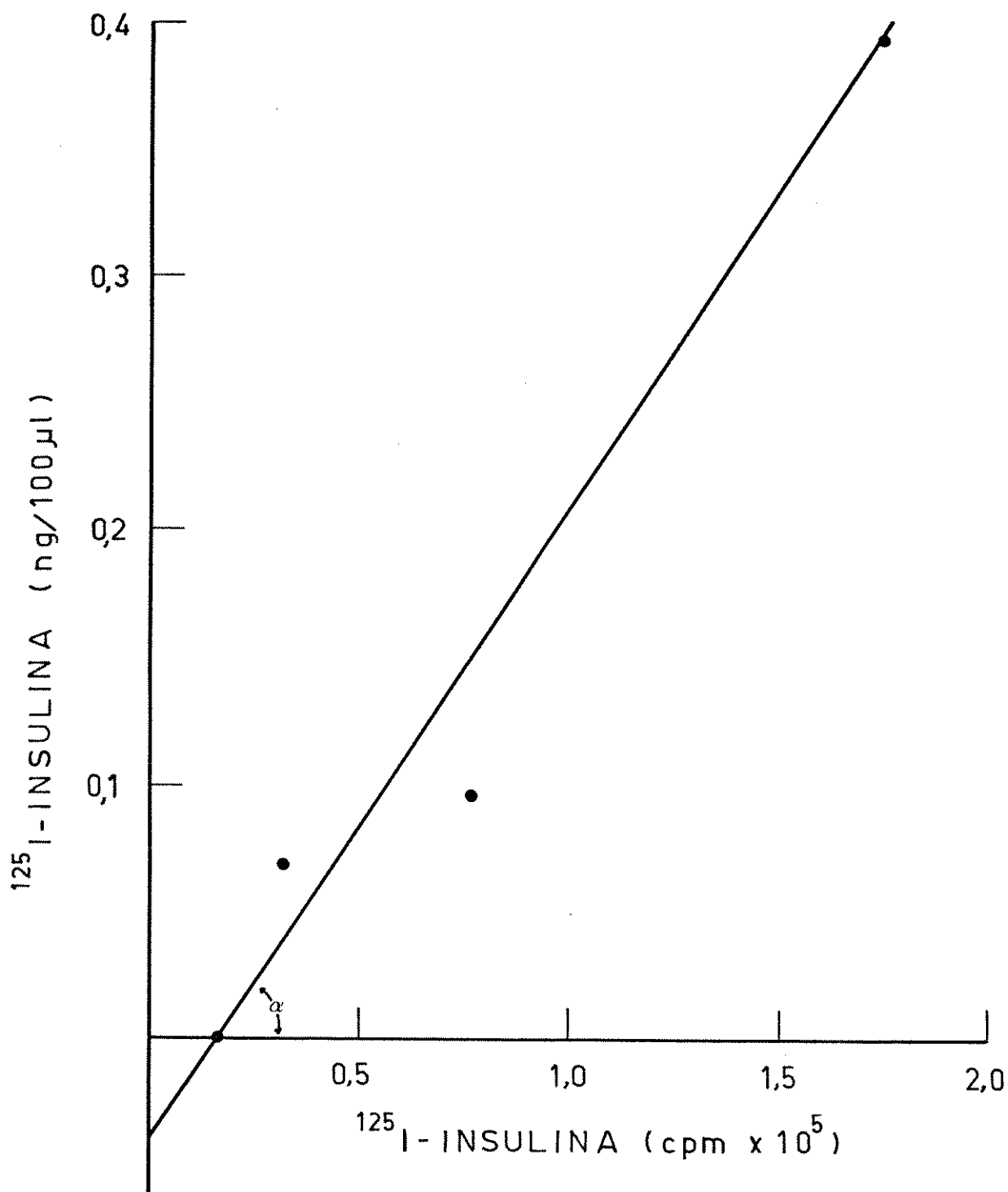


FIGURA 2. Curva para determinação da massa e atividade específica da insulina marcada. Correlacionou-se concentração e radioatividade da insulina marcada, presente em cada tubo da série contendo quantidades crescentes de traçador. O ajuste foi feito através de regressão linear (mínimos quadrados). A reta obtida apresenta uma inclinação que corresponde à recíproca da atividade específica do traçador. A interceptação da abscissa ($0,154 \times 10^5$ cpm) e da ordenada ($-0,037$ ng, tomada em valor absoluto) correspondem, respectivamente, à radioatividade e à massa do traçador adicionado a cada tubo da curva de referência.

te ao total de insulina radioativa pipetada em cada tubo da curva de referência.

A atividade específica (AE) foi, então, calculada pela fórmula:

$$AE (\mu\text{Ci}/\mu\text{g}) = \frac{\text{TOTAL}}{222 \times 10^4 \times \xi \times m}$$

sendo que:

TOTAL = radioatividade média pipetada em cada tubo da curva de referência

222×10^4 = constante equivalente ao nº de desintegrações por minuto (dpm) de 1 μCi de material radioativo

ξ = eficiência de contagem do contador gama utilizado, em valor relativo (cpm/dpm)

m = massa de insulina radioativa colocada em cada tubo da curva de referência (μg).

No experimento ilustrado pela figura 2, temos que:

$$AE = \frac{15\,379 \text{ cpm}}{(222 \times 10^4 \text{ dpm}) \times 0,8 \times (37 \times 10^{-6} \mu\text{g})}$$

$$AE = 234 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$$

A AE também pode ser determinada pela recíproca da inclinação da reta de regressão. Assim sendo:

$$AE (\text{nCi}/\text{ng}) = (\text{tg}\alpha \times \xi \times 2200)^{-1}$$

onde:

$\text{tg}\alpha$ = inclinação da reta

ξ = eficiência do contador gama (valor relativo)

2200 = constante equivalente ao nº de dpm de 1 nCi de material radioativo.

$$AE = \left(\frac{0,4 \text{ ng}}{1,65 \times 10^5 \text{ cpm}} \times 0,8 \times 2200 \text{ dpm} \right)^{-1}$$

$$AE = 234 \text{ nCi/ng}$$

2.8. VALIDAÇÃO DO RIE-PEG PARA DOSAGEM DA INSULINA DE RATO SECRETADA POR ILHOTAS ISOLADAS

2.8.1. TITULAÇÃO DO ANTICORPO

O título do anticorpo foi determinado a cada novo lote de insulina marcada. Para tanto, foram testadas diluições na faixa de 1:50 000 a 1.200 000 (2,0 ng/ 100 µl a 500,0 pg/100 µl, respectivamente), a partir do anti-soro liofilizado.

Cada tubo recebeu 100 µl de KREBS, 100 µl da diluição do anti-soro e 100 µl da insulina marcada (aprox. 40 pg). Cada condição foi testada em duplicata.

Para avaliar a precipitação inespecífica de radioatividade (BRANCO), uma duplicata foi preparada de maneira idêntica aos tubos anteriores, exceção feita ao anti-soro, que foi substituído por tampão veronal.

Duplicatas contendo unicamente a insulina marcada foram feitas, para se determinar a contagem total (TOTAL).

Após mistura dos reagentes, os tubos foram incubados por 3 h à temperatura ambiente. A separação das frações foi processada pelo PEG, conforme já descrito no item 2.5.2.

Para cada diluição do anti-soro, foi calculada a

relação B/T média, após ser descontado o BRANCO.

Um gráfico foi traçado dispondo-se diluições do anti-soro versus B/T percentual (Fig. 3). Determinando-se uma reta de regressão para os pontos, o título obtido foi a diluição de anticorpo em que se obteve 50% de precipitação da insulina marcada (BT = 50%).

Nos RIE-PEG utilizaram-se diluições de anticorpo capazes de ligar de 30 a 60% da insulina marcada (na ausência de insulina fria).

2.8.2. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO E DA CAPACIDADE LIGANTE DO ANTICORPO

A figura 4 ilustra a determinação da constante de associação e da capacidade de ligação do GPAIS (título 1:100 000), a partir de dados extraídos de uma curva de referência confeccionada com insulina murina, em um RIE-PEG executado a 25°C, conforme descrito no item 2.5.2. O procedimento empregado baseou-se em SCATCHARD (1949²⁵⁰), BERSON & YALOW (1959²⁵) e GOLDMAN *et alii* (1978⁷⁶).

Os dois componentes lineares do SCATCHARD plot foram obtidos por regressão linear, pela técnica dos mínimos quadrados. Para o sítio de maior afinidade, a ligação, na faixa das maiores concentrações de insulina livre, foi corrigida subtraindo-se a contribuição do sítio de menor afinidade. A constante de associação (K_a) de cada ligante foi calculada a partir da inclinação da sua reta correspondente, enquanto que a interceptação da abscissa por aquela reta forneceu a concentração do ligante.

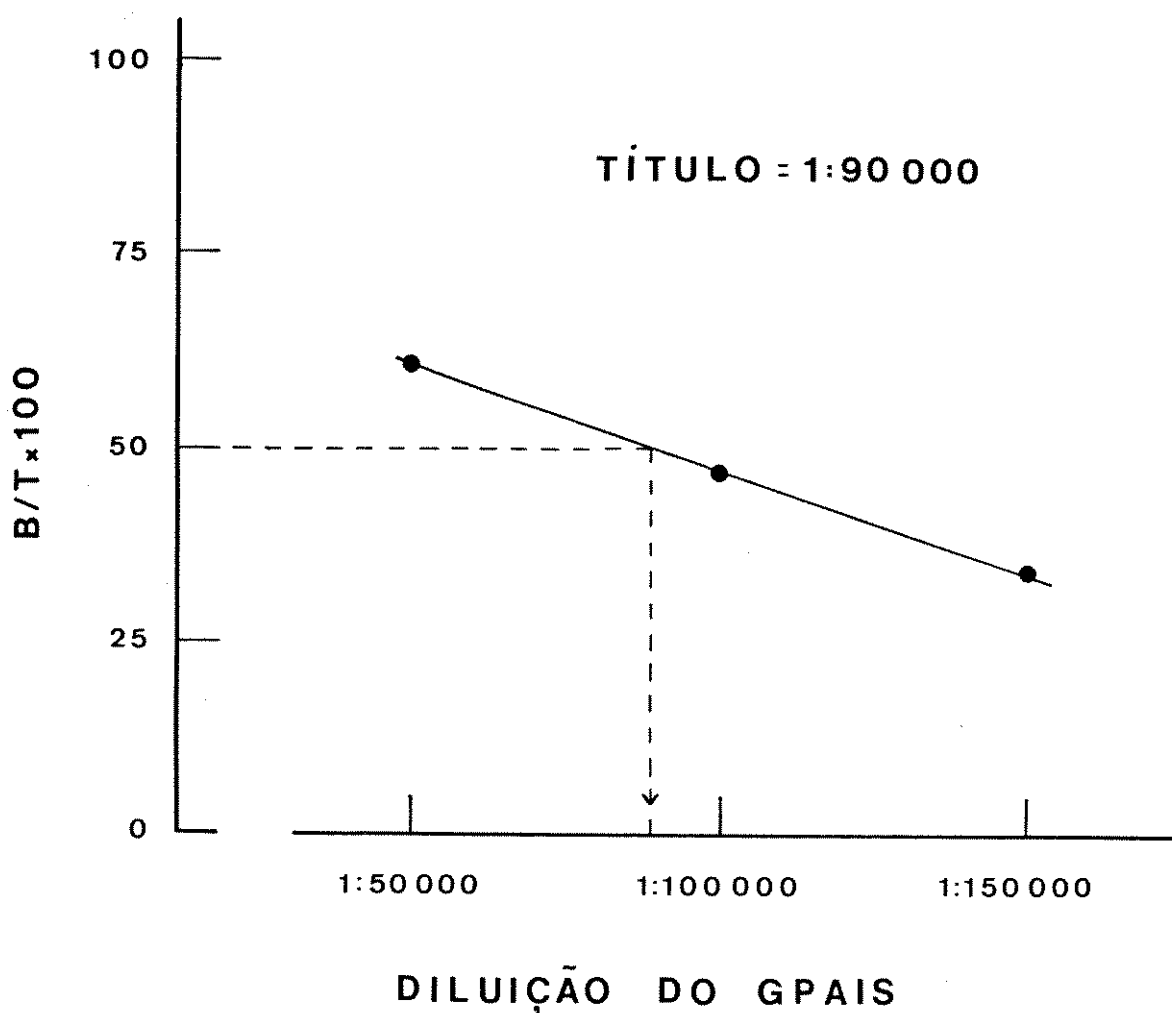


FIGURA 3. Curva de titulação do anticorpo (GPAIS). Cada tubo recebeu 100 μ l de KREBS, 100 μ l da solução de GPAIS e 100 μ l (aprox. 40 pg) da insulina marcada. A mistura foi incubada por 3 h, na temperatura ambiente. Os pontos são médias de duplicatas, descontadas da precipitação não-específica (BRANCO). A reta de regressão foi obtida pelos mínimos quadrados.

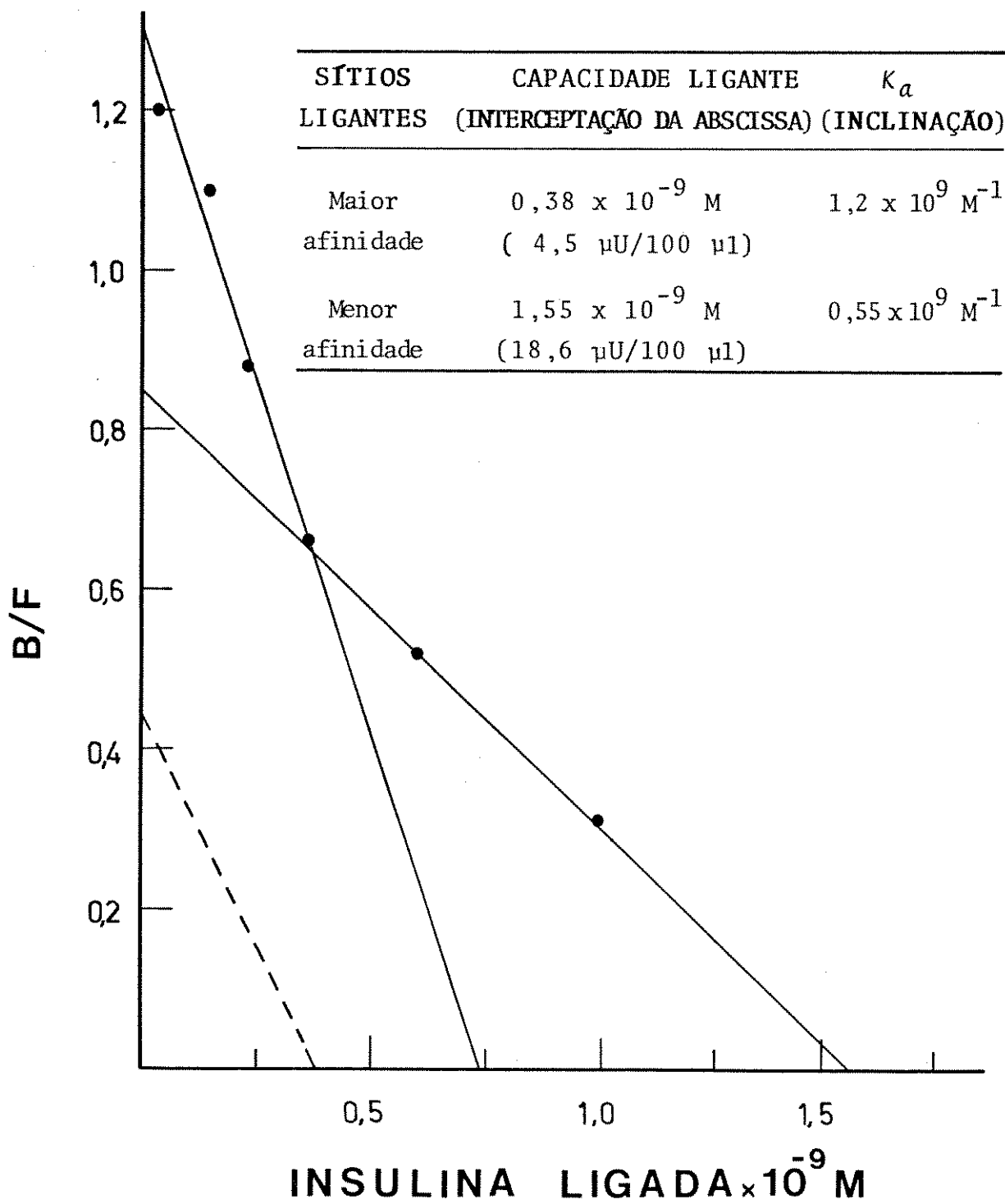


FIGURA 4. SCATCHARD plot representativo dos dados para a associação de insulina murina e anticorpos específicos, em KREBS contendo entre 7×10^{-11} e 4×10^{-9} M de insulina total e GPAIS no título de 1:100 000. A insulina marcada (40 pg/tubo) foi adicionada após 3 h de incubação (25°C) da mistura de anticorpo e insulina não-marcada. Após mais 3 h de incubação, as frações foram separadas pela adição de PEG. Os pontos indicados representam valores unitários obtidos da análise de uma única curva de referência. A ligação inespecífica (BRANCO) foi previamente descontada. As linhas contínuas correspondem à representação linear direta dos dados referentes aos dois componentes da ligação insulina-anticorpo. A linha descontínua é a representação linear dos dados da ligação do sítio de maior afinidade, corrigida pela contribuição do sítio de menor afinidade para a ligação total. B/F expressa a razão entre as radioatividades ligada e livre de cada tubo.

O SCATCHARD *plot* dos dados de ligação foi, aparentemente, curvilíneo, o que pode indicar uma heterogeneidade dos sítios de ligação. Duas espécies de ligantes puderam ser detectadas a partir da análise efetuada. Um componente de maior afinidade, com K_a de $1,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ e menor capacidade ligante ($0,38 \times 10^{-9} \text{ M}$) e um componente de menor afinidade, com um K_a de $0,55 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ e maior capacidade ligante ($1,55 \times 10^{-9} \text{ M}$).

2.8.3. PROVA DA DILUIÇÃO

Como requisito para se verificar da adequação da curva feita com insulina bovina, como referencial para os ensaios de insulina de rato, foram feitas dosagens de uma mesma amostra utilizando-se, porém, alíquotas de volumes variados (entre 2 e 100 μl). Para cada volume, as dosagens foram feitas em quadruplicata. Utilizaram-se alíquotas retiradas de um meio contendo 16,7 mM de glucose, no qual se havia incubado 4 ilhotas, nas condições expressas no item 2.3. Todos os volumes foram completados com KREBS para 100 μl . Os resultados constam da tabela 1 e da figura 5.

2.8.4. CURVAS DE REFERÊNCIA COM INSULINAS BOVINA, PORCINA E MURINA

Para verificar da identidade imunoquímica entre as insulinas bovina, suína e murina, foram feitas curvas de referência usando-se insulinas liofilizadas de boi e porco, bem como insulina de rato secretada por ilhotas de Langerhans (nas condições descritas no item 2.3).

TABELA 1. PROVA DA DILUIÇÃO - Efeito do volume da alíquota sobre o valor de insulina imunorreativa de rato, usando-se insulina bovina como referencial. Dosou-se um produto da incubação de 4 ilhotas de rato (90 min a 37°C, em KREBS contendo 16,7 mM de glucose). Para cada volume, as dosagens foram feitas em quadruplicata. Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão.

VOLUME DA ALÍQUOTA (μ l)	μ U de INSULINA		
	no VOLUME DOSADO	/100 μ l	/ilhota por 90 min
2	4,5 $\pm$ 0,50	225 $\pm$ 24,9	562 $\pm$ 62,2
4	6,3 $\pm$ 0,25	158 $\pm$ 6,2	394 $\pm$ 15,5
5	7,2 $\pm$ 0,46	144 $\pm$ 9,2	360 $\pm$ 22,9
10	9,9 $\pm$ 0,45	99 $\pm$ 4,5	248 $\pm$ 11,2
20	14,0 $\pm$ 0,70	70 $\pm$ 3,5	175 $\pm$ 8,7
50	20,5 $\pm$ 1,40	41 $\pm$ 2,8	102 $\pm$ 7,0
100	26,2 $\pm$ 2,48	26 $\pm$ 2,5	65 $\pm$ 6,2

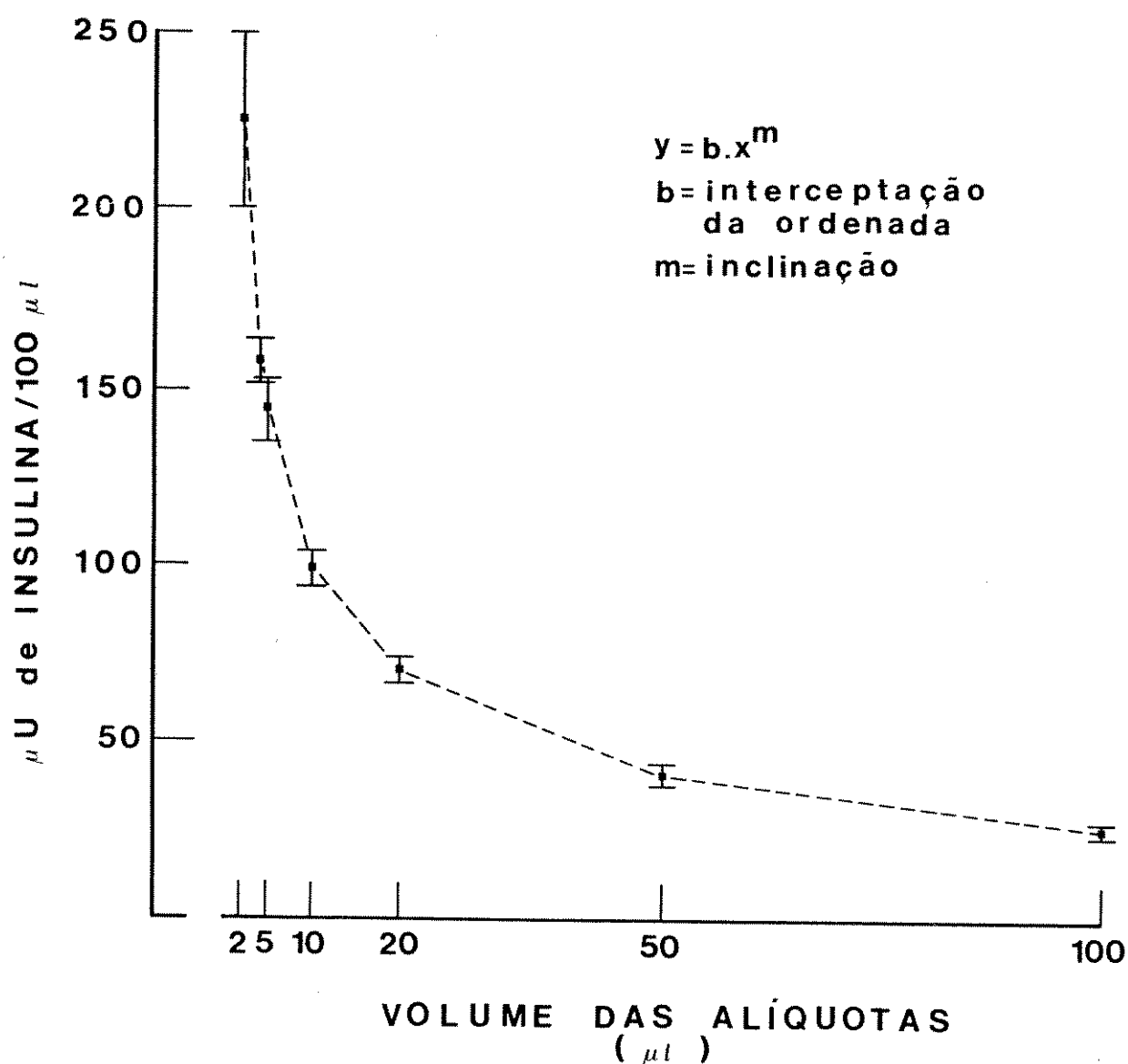


FIGURA 5, Efeito do volume da alíquota sobre o valor obtido pela dosagem de insulina imuno-reativa de rato, usando-se insulina bovina como referencial. Dosou-se um *pool* de incubações (4 ilhotas de Langerhans isoladas de rato e incubadas em KREBS contendo 16,7 mM de glucose, por 90 min a 37°C). Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão de 4 determinações.

As curvas foram traçadas em papel di-log, dispondo-se as concentrações na abscissa e a relação B/B_0 na ordenada, e a inclinação de cada uma foi determinada (Figs. 6 e 7).

2.8.5. CURVA DE EQUIVALÊNCIA

Conforme ilustrado pela tabela 1 e figuras 5, 6 e 7, não se verificou uma identidade imunoquímica entre a insulina de rato e a de boi ou porco. Usando-se curva de insulina bovina como referencial, constatou-se que os valores obtidos nas dosagens de uma mesma amostra foram crescentes, na medida em que se tomaram alíquotas de menor volume.

Por outro lado, através de resultados obtidos em nosso laboratório, empregando-se RIE-CELULOSE, e condizentes com dados da literatura, foi possível estabelecer-se um determinado volume do desconhecido como sendo o adequado para se fazer as dosagens. Nesse dado volume, o RIE-PEG de insulina forneceu valores idênticos aos encontrados na literatura, mesmo se utilizando curva de insulina bovina como referencial.

Conseqüentemente, baseado nas razões expostas, passou-se a considerar que o RIE-PEG de 10 μ l do produto de incubação de 4 ilhotas de Langerhans de rato, em 1,0 ml de KREBS contendo 16,7 mM de glucose (por 90 min a 37°C), fornecia a quantidade aproximada de IIRR presente na amostra.

Em todos os RIE-PEG dosou-se um pool de 10 meios de incubação idênticos ao acima descrito, tomando-se volumes entre 2 e 100 μ l (em quadruplicatas). Considerando o valor de IIRR contida nos 10 μ l do meio de incubação citado, como sendo um ponto de referência, pôde-se calcular, por simples regra de

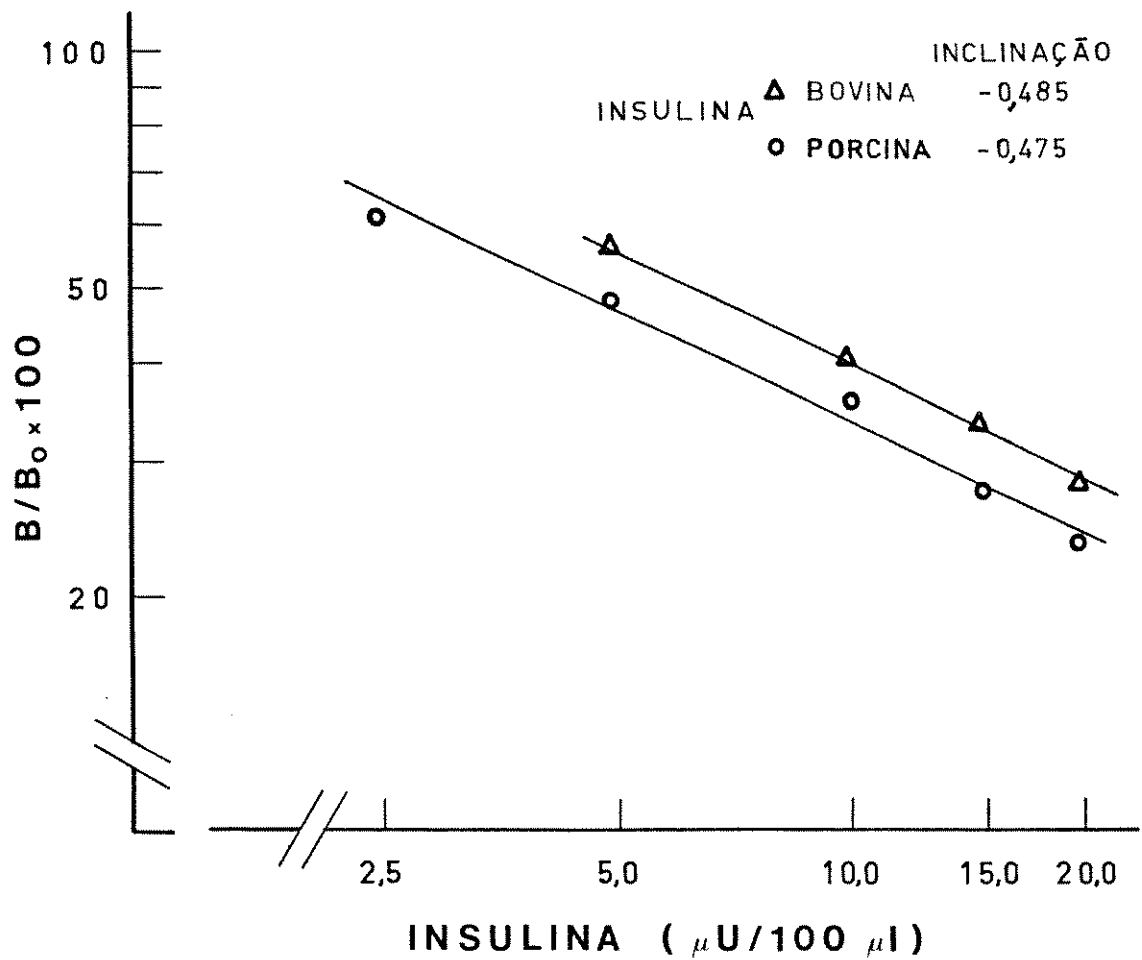


FIGURA 6. Curvas de referência de insulinas bovina e porcina. Projeção (log x log) do percentual de insulina marcada ligada ao anticorpo ($B/B_0 \times 100$) em função de quantidades conhecidas de insulina. Os valores de cpm foram previamente corrigidos pela ligação inespecífica (BRANCO).

B = cpm da fração de insulina radioativa fixada ao anticorpo, em presença de insulina não-marcada.

B_0 = cpm da fração de insulina radioativa fixada ao anticorpo, na ausência de insulina não-marcada.

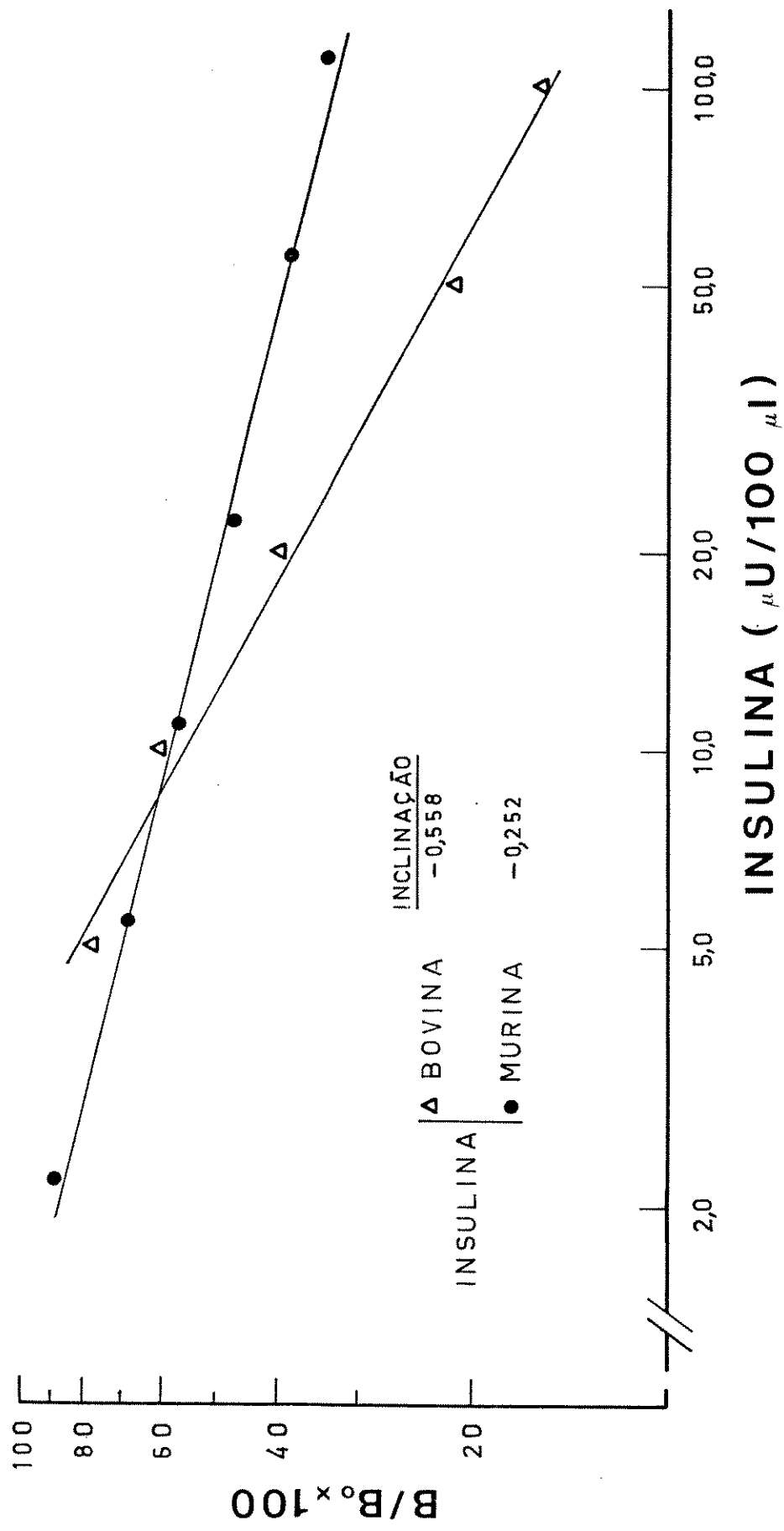


FIGURA 7. Curvas de referência de insulinas bovina e murina. Projeção ($\log \times \log$) do percentual de insulina marcada ligada ao anticorpo (B/Bo x 100) em função de quantidades conhecidas de insulina bovina ou quantidades estimadas de insulina murina. Para a curva de insulina murina, as diluições foram feitas a partir do produto da incubação de 4 ilhotas de Langerhans, em KREBS contendo 16,7 mM de glucose, nas condições descritas no item 2.3. Os valores de insulina contida nessas diluições foram obtidos conforme descrito no item 2.8.5.

três, os valores de IIRR presentes em volumes maiores ou menores que aquele. Obteve-se, assim, para cada volume dosado, um valor lido na curva de insulina bovina e um valor obtido pela relação de proporcionalidade com a insulina existente no volume de 10 μ l. Esses valores foram correlacionados em gráficos denominados *curva de equivalência* (Figs. 8 e 9). Dessa forma, em cada RIE-PEG o valor de B/B_0 do desconhecido serviu para uma leitura inicial na curva de insulina bovina. O resultado assim obtido foi interpolado na *curva de equivalência*, obtendo-se, daí, o valor de IIRR da amostra dosada.

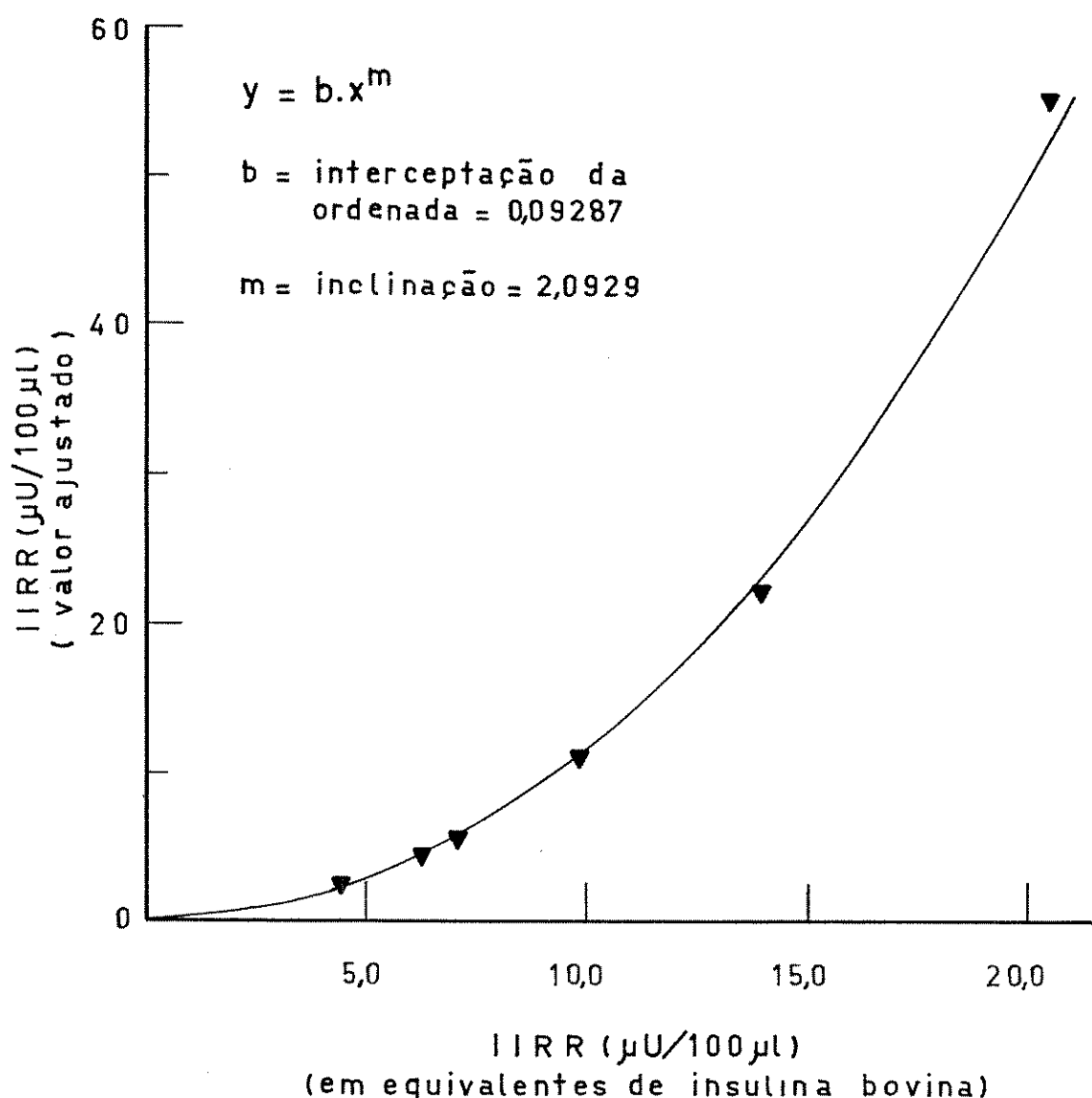
2.8.6. CURVAS DE REFERÊNCIA COM INSULINAS MURINAS

A figura 10 mostra o paralelismo entre as curvas feitas com insulina murina liofilizada, de atividade biológica conhecida, e aquela obtida com diluições do meio de incubação (cf. 2.8.3 e 2.8.5.),

2.8.7. PRECISÃO INTRA-ENSAIO

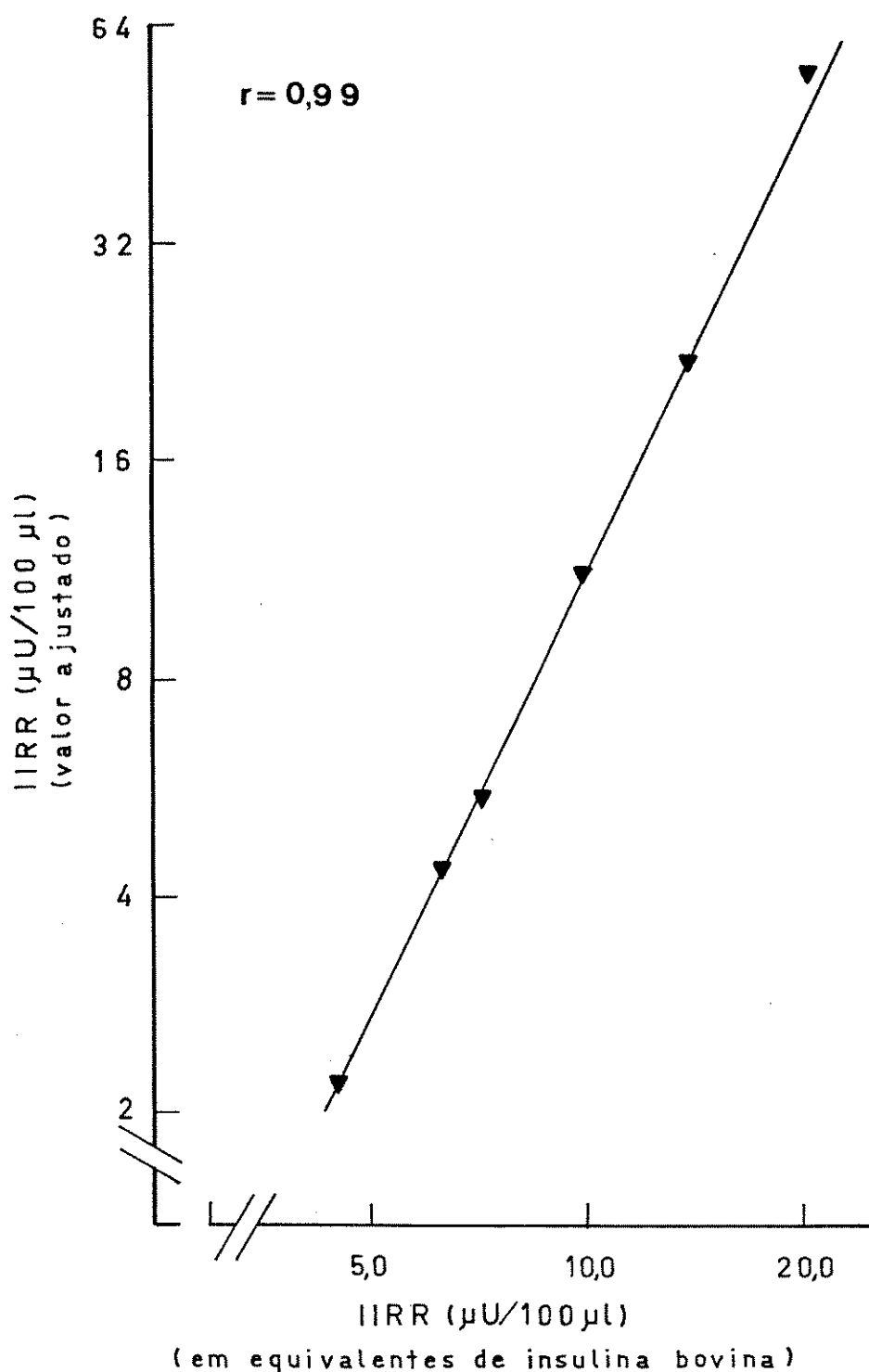
Para se avaliar a amplitude da variabilidade das dosagens de uma mesma amostra contendo insulina secretada *in vitro*, a precisão intra-ensaio foi determinada em condições de rotina do laboratório, através da dosagem, em um mesmo RIE-PEG, de 15 alíquotas (10 μ l cada), provenientes de um mesmo pool de meios de incubação. Usou-se o produto da incubação de 4 ilhotas de Langerhans de rato, em KREBS com 16,7 mM de glucose, nas condições descritas no item 2.3,

Os valores foram lidos, inicialmente, em uma curva de insulina bovina e, a partir dos mesmos, chegou-se às quantidades de IIRR através do emprego da *curva de equivalência*, conforme explicado no item 2.8.5. Os resultados foram expressos em μ U de insulina/10 μ l, sendo calculados o desvio padrão e o



CURVA DE EQUIVALÊNCIA

FIGURA 8. Os valores da abscissa foram obtidos pela dosagem de volumes crescentes de uma mesma amostra (produto da incubação de 4 ilhotas em KREBS contendo 16,7 mM de glucose, por 90 min a 37°C), usando-se insulina bovina como referencial. A ordenada representa os valores ajustados, assumindo-se que o resultado obtido na dosagem de 10 μl do meio de incubação (leitura pela curva de insulina bovina) represente a quantidade aproximada de insulina imunorreativa de rato (IIRR). A curva foi traçada mediante ajuste pelos mínimos quadrados.



CURVA DE EQUIVALÊNCIA

FIGURA 9. Anamorfose da curva da figura 8, mediante logaritmação decimal dos valores das coordenadas. A reta foi obtida por regressão linear dos pontos, pelos mínimos quadrados. Os valores da abscissa foram obtidos pela dosagem de volumes crescentes de uma mesma amostra (produto da incubação de 4 ilhotas em KREBS contendo 16,7 mM de glucose, por 90 min a 37°C), usando-se insulina bovina como referencial. A ordenada representa os valores ajustados, assumindo-se que o resultado obtido na dosagem de 10 μl do meio de incubação (leitura pela curva de insulina bovina) represente a quantidade aproximada de insulina imunorreativa de rato (IIRR).

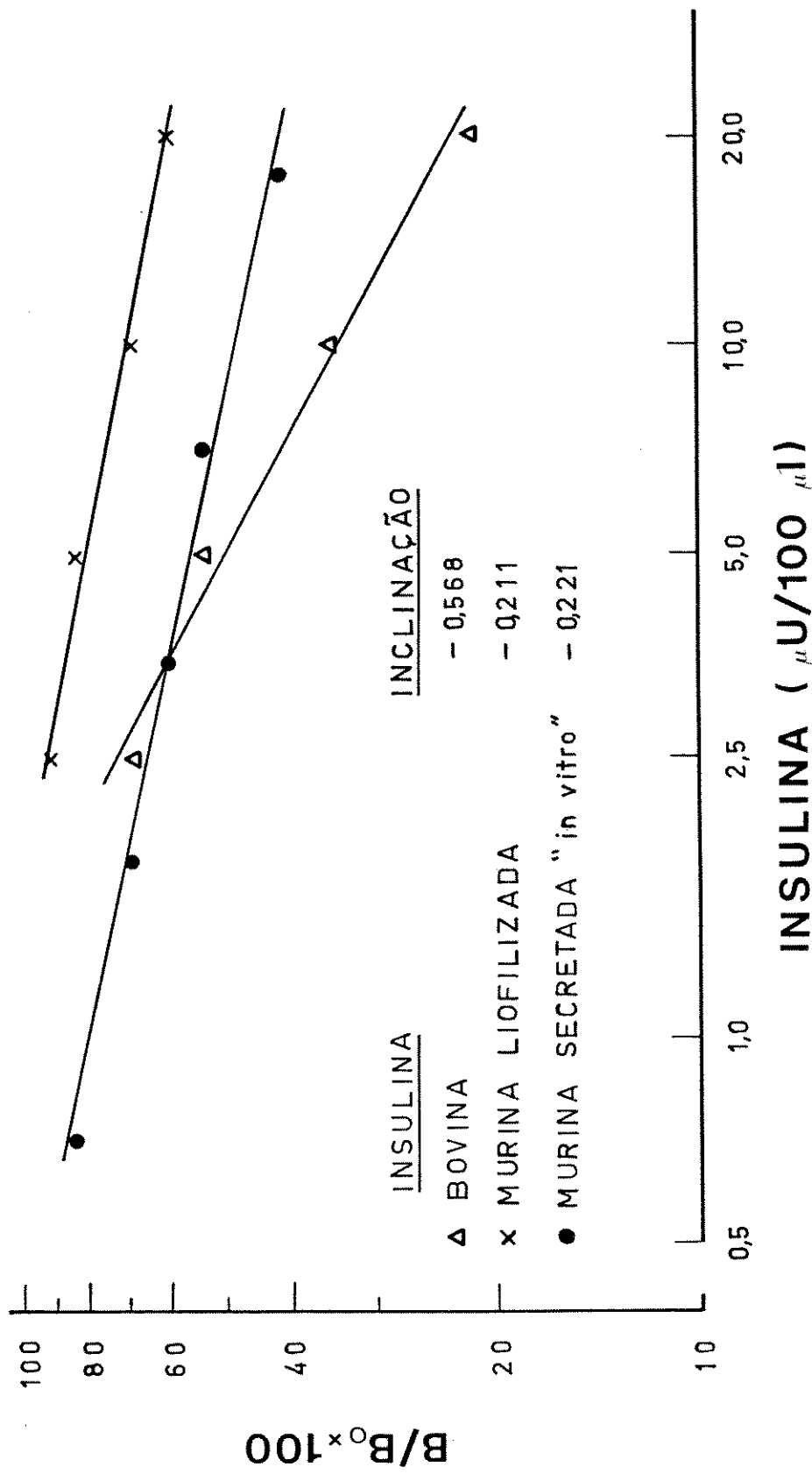


FIGURA 10, Curvas de referência de insulinas murinas e bovina. Projeção (log x log) do percentual de insulina marcada ligada ao anticorpo (B/Bo x 100) em função de quantidades conhecidas de insulina murina ou bovina liofilizada, ou quantidades estimadas de insulina murina secretada *in vitro*. Descontou-se a ligação inespecífica.

coeficiente de variação (Tab. 2).

2.8.8. EFEITO DA SOLUÇÃO DE GENTAMICINA SOBRE O RIE-PEG DE INSULINA

Para verificar da possibilidade da solução de gentamicina, empregada em incubações de ilhotas isoladas, interferir no RIE-PEG de insulina, executou-se um protocolo de dosagem desse hormônio, variando-se unicamente a concentração de gentamicina presente no tubo de reação.

Foram ensaiadas três condições, a saber:

1º) Produto de incubação de ilhotas em KREBS contendo 16,7 mM de glucose, nas condições descritas em 2.3.

2º e 3º) Produto de incubação de ilhotas em KREBS com 16,7 mM de glucose, ao qual se acrescentou a solução de gentamicina, momentos antes do RIE, para resultar em uma concentração final de 10^{-3} e 10^{-4} M, respectivamente.

A concentração de 10^{-3} M empregada foi, deliberadamente, superior a qualquer concentração de gentamicina presente nos tubos do RIE, em qualquer de suas etapas, ao longo dos ensaios efetuados.

A insulina foi dosada pelo RIE-PEG, conforme descrito no item 2.5.2. Um único *pool* de insulina secreta da foi utilizado nas três condições. Os valores de IIRR presente nas amostras foram obtidos pela curva de insulina bovina, seguidos de ajuste pela curva de equivalência, conforme descrito no item 2.8.5. Os resultados estão expressos na tabela 3.

TABELA 2, PRECISÃO INTRA-ENSAIO - Determinação da reprodutibilidade, em condições habituais de trabalho, de 15 dosagens de insulina de rato, secretada *in vitro*. Em cada dosagem, foram utilizados 10 μ l de uma mistura de meios (contendo 16,7 mM de glucose) onde se havia incubado 4 ilhotas de Langerhans isoladas de rato (90 min a 37 °C).

TUBOS	CONCENTRAÇÃO DE INSULINA (μ U/10 μ l)
1	4,6
2	4,6
3	5,0
4	6,7
5	4,1
6	6,9
7	6,2
8	4,1
9	6,0
10	5,0
11	4,0
12	5,3
13	3,7
14	4,1
15	4,0

Concentração média = 4,95 μ U/10 μ l

Desvio padrão = 1,05 μ U/10 μ l

Coefficiente de variação = 21%

TABELA 3. Efeito da solução de gentamicina sobre o RIE-PEG. As médias são valores de IIRR contida em 10 μ l de um produto da incubação de 4 ilhotas, nas condições expressas no item 2.3. Os valores de "t" e "P" referem-se à comparação com o controle.

CONDIÇÃO	INSULINA DOSADA (μ U/100 μ l)	N	t	P
Glucose 16,7 mM (Controle)	4,9 $\pm$ 0,26	16	-	-
Glucose 16,7 mM + 10 ⁻³ M de gentamicina	4,5 $\pm$ 0,18	14	1,214	>0,20
Glucose 16,7 mM + 10 ⁻³ M de gentamicina	6,0 $\pm$ 0,41	14	1,444	>0,10

2.9. NORMALIZAÇÃO DE RESULTADOS

Os resultados de alguns protocolos necessitaram de normalização, em decorrência dos seguintes fatores:

1º) Variações na atividade secretória entre lotes de ilhotas isoladas. Essas variações, supostamente, se deveram a diferentes intensidades de ação da enzima collagenase durante o período de isolamento das ilhotas, bem como a diferenças na constituição de tecido conjuntivo entre pâncreas. Esses dois fatores, aliados, podem ter feito com que as ilhotas tenham sofrido, em maior ou menor grau, o efeito nocivo, não só da collagenase, como também de outras enzimas contaminantes (cf. LERNMARK, 1971¹⁶⁷; HAHN *et alii*, 1976⁹¹; HEDESKOV, 1980⁹⁶).

2º) Ajuste de curvas de referência. Conforme exposto nos itens 2.8.3., 2.8.4. e 2.8.5., a inconveniência das curvas de insulina bovina e porcina, como referencial para leitura de insulina de rato, obrigou a se utilizar uma curva de equivalência para o ajuste dos resultados lidos em curva de insulina bovina. Não obstante, a referida curva de equivalência fundamentou-se na assunção de que a dosagem de 10 μ l do produto de incubação de 4 ilhotas isoladas de rato, nas condições já referidas, forneceria o valor aproximado de IIRR, mesmo se utilizando, como referencial, uma curva de insulina bovina (cf. 2.8.5.). A posterior utilização de curvas feitas com insulina murina liofilizada, de atividade biológica conhecida, revelou que os valores anteriormente obtidos eram subestimações da insulina presente nas incubações. Isto pode ser constatado pela comparação das duas curvas feitas com insulina murina, da figura 10.

Assim sendo, com base nas razões expostas, adotou-se a prática de normalização dos resultados de uma parte dos protocolos (indicados nos Resultados), tomando-se como ponto referencial o valor de secreção obtido na condição de 16,7 mM de glucose presente no meio de incubação. Para tanto, calculou-se a média geral da secreção provocada por 16,7 mM de glucose, englobando: a) protocolos dosados pelo RIE-CELULOSE e b) protocolos dosados pelo RIE-PEG e cujos valores foram obtidos por leitura direta em curva feita com insulina liofilizada de rato.

O valor médio obtido foi de $312 \pm 9,3$ μ U/ilhota por 90 min ($n = 77$). Esta média, dividida pelo valor médio correspondente de cada protocolo (secreção na condição de 16,7 mM de glucose), resultou em um fator ($>1,0$), pelo qual se multiplicou cada resultado unitário daquele protocolo.

2.10. CURVA DOSE-RESPOSTA À GLUCOSE

A figura 11 mostra a característica curva sigmóide que correlaciona secreção de insulina por ilhotas de Langerhans isoladas de rato e concentração de glucose no meio de incubação. Nenhuma diferença significativa ($p > 0,50$) na secreção de insulina foi observada entre as concentrações zero e 2,8 mM de glucose ($48 \pm 3,3$ e $55 \pm 11,0$ μ U/ilhota por 90 min, respectivamente). O limiar estimulatório foi de aproximadamente 5,5 mM de glucose. Entre 5,5 e 16,7 mM observou-se um rápido aumento das taxas de secreção de insulina, sendo que a metade da ação estimulatória máxima (K_m) foi obtida com 10,2 mM de glucose. Embora se tenha constatado diferença significativa entre as secreções provocadas por glucose 16,7 e 27,7 mM, a secreção, aparentemente, tendeu a se estabilizar em um platô, nas

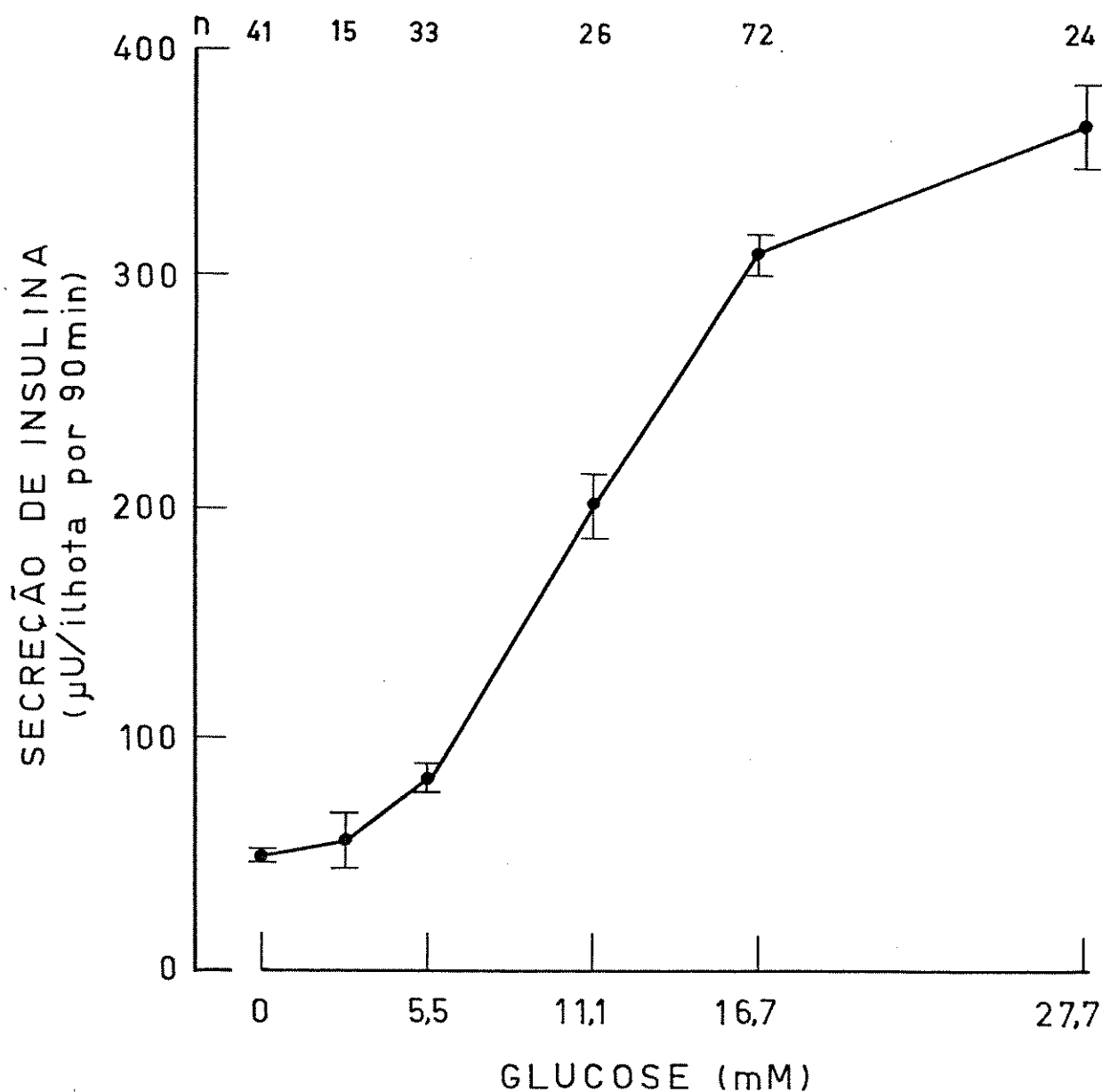


FIGURA 11. Efeito da D-glucose sobre a secreção de insulina por ilhotas de Langerhans isoladas de rato e incubadas por 90 min a 37°C. Cada valor da secreção representa a média ($\pm$ erro padrão) do número de observações indicado na parte superior da figura, após normalização dos resultados (v. 2.9.) obtidos em experimentos efetivados em diferentes dias.

concentrações de glucose maiores que 16,7 mM.

2.11. RADIOISÓTOPOS E REAGENTES

ISOLAMENTO E INCUBAÇÃO DE ILHOTAS

Todos os sais, bem como a D-glucose e demais substâncias adicionadas ao meio de isolamento e/ou incubação, possuíam grau analítico de pureza (PA). Albumina bovina fração V e colagenase (260 U/mg) foram obtidas da Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo). Teofilina anidra foi da Schwarz-Mann (Orangeburg, NY). Sisomicina e gentamicina, na forma de sal sulfato, foram do Lab. Schering (Rio de Janeiro, RJ)*.

MARCAÇÃO DE INSULINA

Insulina porcina cristalizada foi da Eli Lilly Lab. (Indianápolis, Ind)**. ^{125}I (Na^{125}I) da New England Nuclear Corp. (Boston, Mass)**. Celulose Whatman (CF 11: fibras de comprimento médio) W & R Balston Ltd. (England). Ácido clorídrico, ácido tricloroacético, álcool etílico absoluto, cloramina T e os sais foram todos PA.

Radioisótopos e reagentes gentilmente cedidos por:

* Dr. A.P. CORRADO

** Dr. A.A. PUPO

RIE DE INSULINA E INCORPORAÇÃO DE CÁLCIO (^{45}Ca)

Empregou-se insulina marcada com ^{125}I das seguintes procedências: New England Corp. (Boston, Mass)*; Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN (São Paulo, SP)**; Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaaios da USP (São Paulo, SP)*** e do nosso próprio laboratório. Insulina bovina cristalizada da Eli Lilly Lab. (Indianápolis, Ind). Insulina murina do Novo Research Inst. (Bagsvaerd, Denmark)****. Anticorpo anti-insulina porcina (WRIGTH)****. Celulose da Macherey-Nagel + Co (Düren, Germany). ^{45}Ca * e Omnifluor da New England Nuclear. Agente tensoativo Tinoventine da Cyba Geigy (São Paulo, SP)*****. Carvão Norit A da Amend Drug Chemical (Irvington, NJ). Dextran T₇₀ da Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suécia). PEG 6000 da Atlas Indústrias Químicas (São Paulo, SP). Toluol da J. T. Baker Produtos Químicos (São Paulo, SP). Todos os sais possuíam grau PA.

2.12. SOLUÇÕES

A SOLUÇÃO PARA ISOLAMENTO DE ILHOTAS foi preparada segundo a composição salina descrita por HANKS & WALLACE (1949⁹⁴), apresentando a seguinte fórmula:

Radioisótopos e reagentes gentilmente cedidos por:

- * Dr. A.P. CORRADO
- ** Dr. J. KIEFFER
- *** Dr. A.A. PUPO
- **** Dr. W.J. MALAISSE e
Dr. A. HERCHUELZ
- ***** Dr. K.E. COLLINS

NaCl	8,000 g
KCl	0,400 g
CaCl ₂ anidro	0,140 g
ou CaCl ₂ .2H ₂ O	0,185 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,200 g
Na ₂ HPO ₄ anidro	0,048 g
ou Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,060 g
ou Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0,121 g
KH ₂ PO ₄	0,060 g
NaHCO ₃	0,350 g
H ₂ O destilada (qsp)	1 000 ml

No momento de uso adicionaram-se 2,8 mM de glicose.

A SOLUÇÃO TAMPÃO-BICARBONATO DE KREBS-RINGER (KREBS) tem a seguinte composição:

NaCl	26,886 g
NaHCO ₃	8,065 g
KCl	1,491 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,813 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,588 g
H ₂ O destilada (qsp)	1 000 ml

No momento de uso, foram adicionados 2% (m/v) de albumina bovina fração V.

TAMPÃO FOSFATO 0,1 M e pH 7,0 (usado no RIE-CELU
LOSE)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	13,800	g
H_2O destilada (qsp)	1 000	ml
NaOH 5 N até obtenção de pH 7,0		

TAMPÃO FOSFATO 0,3 M e pH 7,4 (usado na marcação
de insulina)

K_2HPO_4 anidro	42,495	g
KH_2PO_4 anidro	7,757	g
H_2O destilada (qsp)	1 000	ml
Acertar o pH com NaOH ou HCl		

TAMPÃO VERONAL 0,15 M e pH 7,4 (usado no RIE-PEG)

ESTOQUE

Barbital sódico	29,428	g
Acetato de sódio	19,428	g
H_2O destilada (qsp)	1 000	ml

PREPARAÇÃO PARA USO:

Estoque	50	ml
HCl 0,1 N	50	ml
NaCl	7,650	g
H_2O destilada (qsp)	1 000	ml

TAMPÃO FOSFATO 0,05 M e pH 7,5 (usado para diluição do PEG)

ESTOQUE 0,2 M e pH 7,5

KCl	1,490 g
KH_2PO_4	13,600 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	35,800 g
NaNO_3	0,520 g
H_2O destilada (qsp)	1 000 ml

PREPARAÇÃO PARA USO:

Estoque	250 ml
H_2O destilada	750 ml
Acerta-se o pH 7,5.	

2.13. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Primeiramente, o teste F foi utilizado para verificar da homogeneidade entre as variâncias das amostras que se desejava comparar. Se constatada homogeneidade, aplicou-se o teste t de Student, não pareado, com variâncias ponderadas pelo n amostral, como descrito por BAHN (1972²⁰). Quando se verificou heterogeneidade entre variâncias, aplicou-se (a) uma adaptação daquele teste, descrita por SNEDECOR & COCHRAN (1971²⁵⁸), para análise de amostras independentes, quando $\sigma_1 \neq \sigma_2$ ou (b) o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, conforme descrito por SIEGEL (1975²⁵⁵). Este teste foi aplicado, especificamente, no tratamento dos dados constantes da figura 14 e tabela IV.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. EFEITO DA SISOMICINA E DA GENTAMICINA SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA

Os valores de secreção de insulina e as concentrações de sisomicina ou gentamicina, presentes no meio, foram correlacionados (Figs. 12 e 13). No intervalo de concentrações utilizadas, os antibióticos inibiram, de maneira dose-dependente, a secreção de insulina provocada por glucose 16,7 mM, em ilhotas de Langerhans isoladas de rato. Já na concentração de 10^{-5} M, a sisomicina e a gentamicina provocaram uma inibição média, na secreção, de $39,3 \pm 9,5\%$ e $24,4 \pm 10,2\%$, respectivamente, com relação aos controles (sem antibiótico) ($p < 0,05$ ou menos). Na concentração de 10^{-3} M, os antibióticos reduziram drasticamente a secreção de insulina, para níveis idênticos àqueles obtidos na ausência de glucose e antibiótico. Gentamicina e sisomicina, na concentração de 10^{-6} M, foram ineficazes em reduzir a secreção de insulina. A DE_{50} (K_L aparente) encontrada para o efeito inibitório desses antibióticos situou-se entre 5,0 e $5,5 \times 10^{-5}$ M.

3.2. EFEITO DA GENTAMICINA SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA ESTIMULADA POR DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUCOSE

A figura 14 ilustra a secreção de insulina por ilhotas incubadas em KREBS, com ou sem 10^{-3} M de gentamicina, em função da concentração de glucose no meio. A curva superior

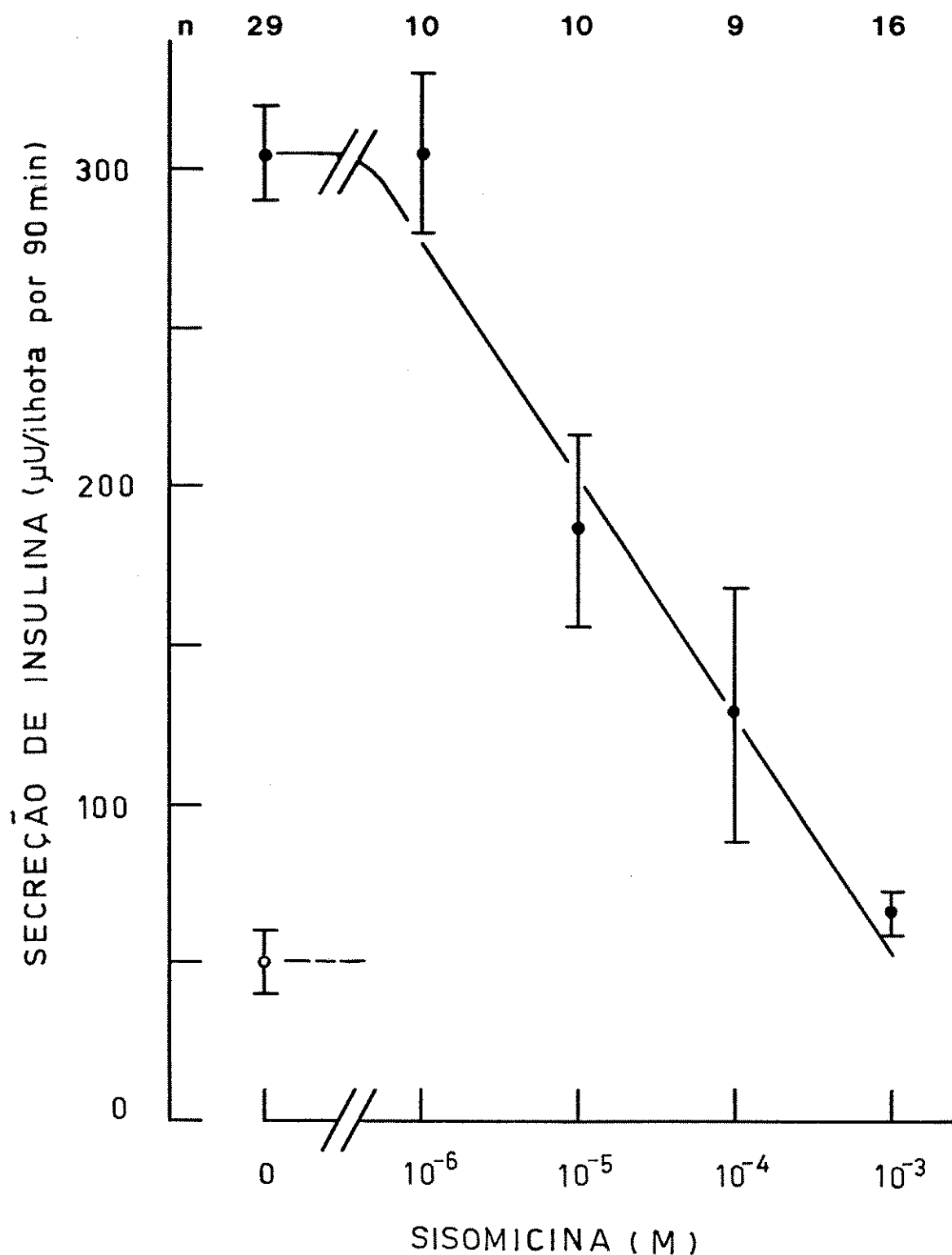


FIGURA 12. Insulina secretada (média $\pm$ erro padrão) por ilhotas de Langerhans isoladas e incubadas em presença de 16,7 mM de glucose e de sisomicina em concentrações crescentes (escala logarítmica). Os resultados foram normalizados (v. 2.9.). O ajuste entre 10^{-6} e 10^{-3} M foi obtido por regressão linear (mínimos quadrados). O número de observações de cada condição experimental, em presença de glucose, consta da parte superior da figura. Também se indica a secreção de insulina na ausência de glucose ($\bigcirc$ — — —) para $n = 20$.

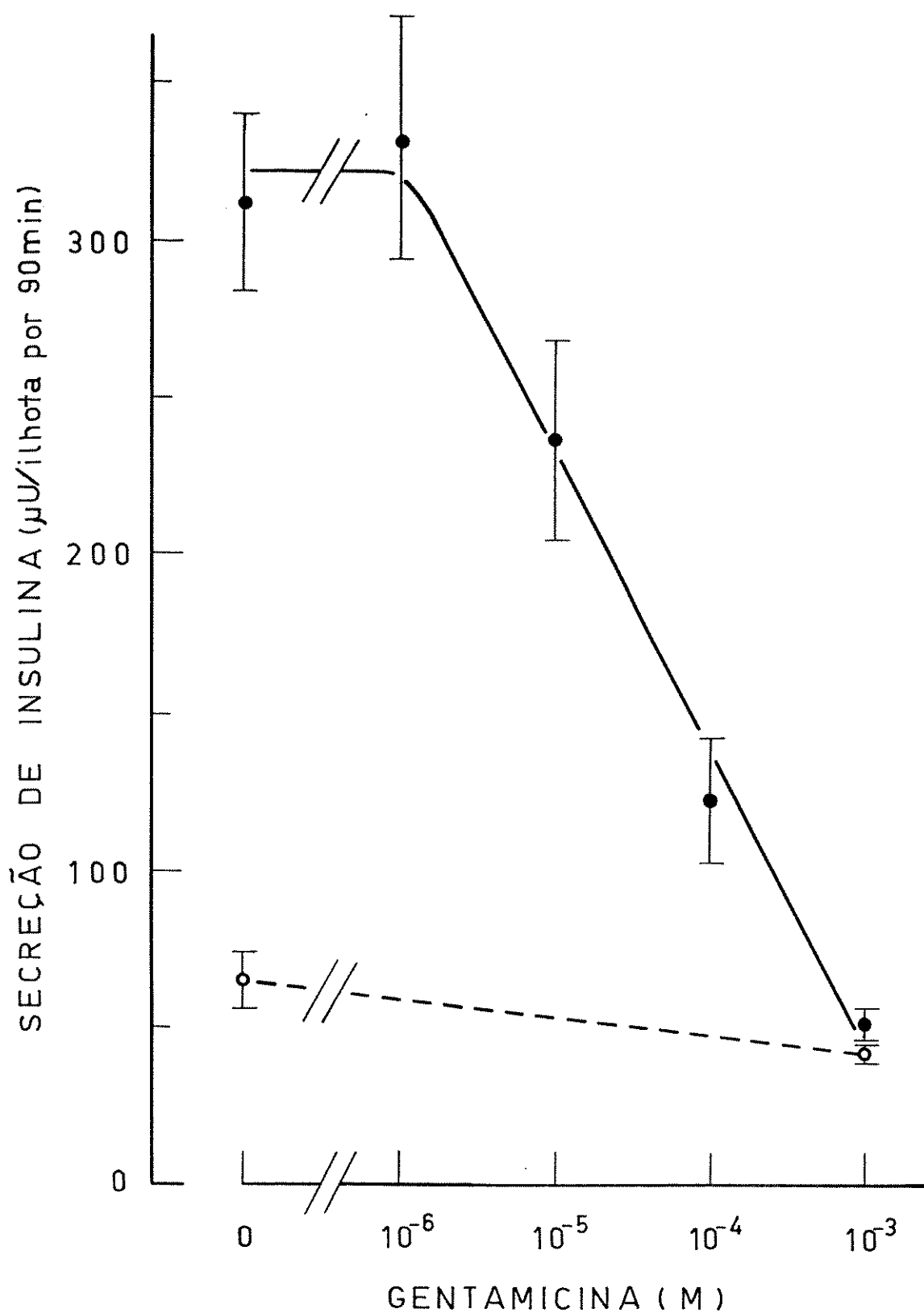


FIGURA 13. Insulina secretada (média $\pm$ erro padrão) por ilhotas de Langerhans isoladas e incubadas (90 min a 37°C) na ausência (linha interrompida) ou em presença de 16,7 mM de glicose (linha contínua) e de gentamicina em concentrações crescentes (escala logarítmica). O número de observações de cada experimento, em presença de glicose, foi 11 ou 12. Na ausência do secretagogo $n = 5$ e $n = 7$, na ausência ou presença de gentamicina, respectivamente.

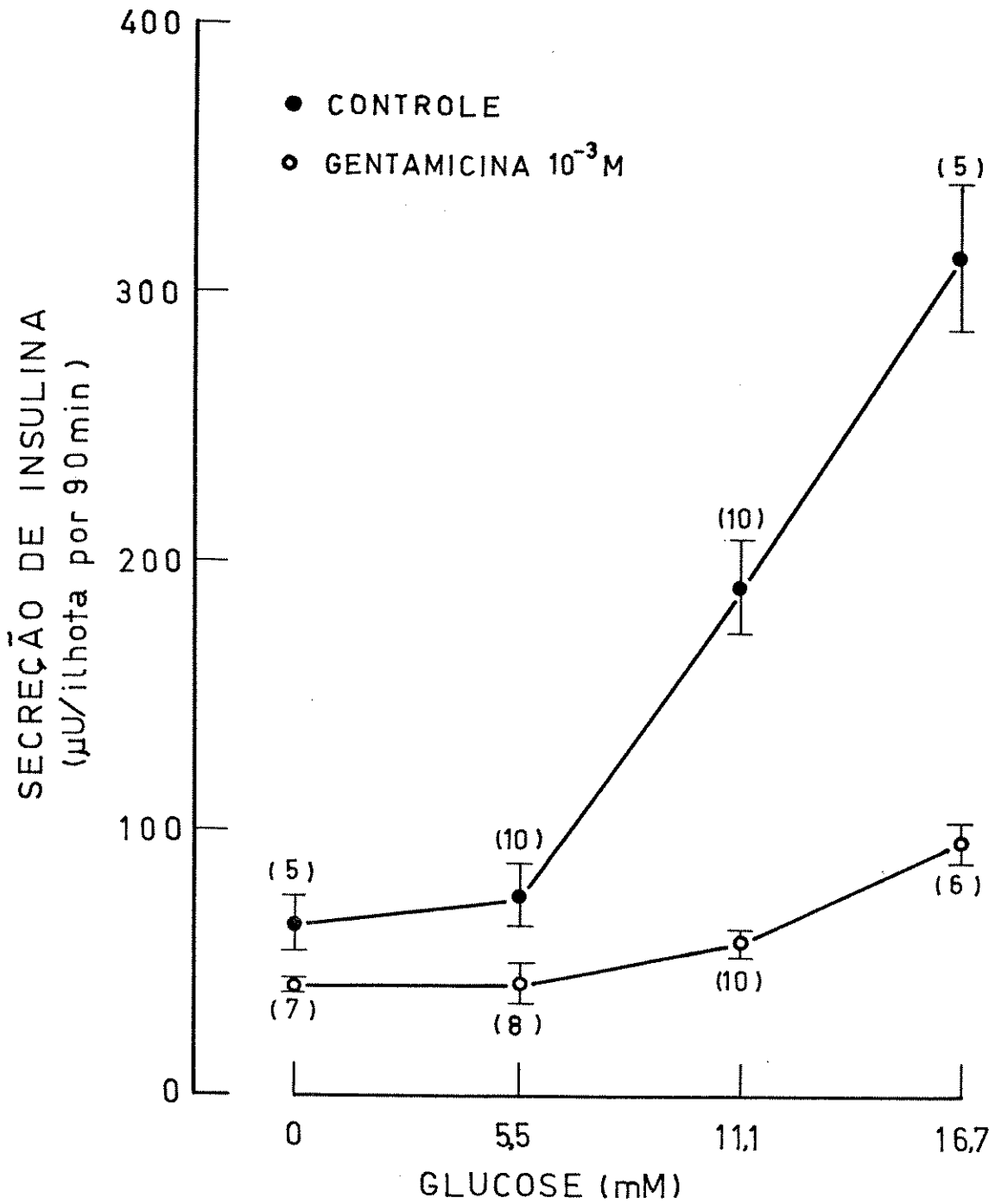


FIGURA 14. Efeito de 10^{-3} M de gentamicina sobre a secreção de insulina, por ilhotas isoladas de rato, estimulada por concentrações crescentes de glucose. Representaram-se as médias ($\pm$ erro padrão) do número de observações indicado entre parênteses, após normalização dos resultados.

corresponde aos segmentos inicial e médio da característica curva dose-resposta à glucose, observando-se o incremento rápido e linear da secreção, no trecho compreendido entre 5,5 e 16,7 mM do secretagogo. Gentamicina 1,0 mM reduziu a secreção em todas as concentrações de glucose utilizadas. Na ausência de glucose, já se observou uma significativa inibição de $35,4 \pm 3,8\%$ na secreção de insulina ($p < 0,05$). A inibição foi mais intensa nas concentrações mais elevadas de glucose, atingindo um máximo de $69,8 \pm 2,5\%$ em 11,1 mM do secretagogo ($p < 0,001$). Apesar da gentamicina haver reduzido a secreção em todas as concentrações de glucose testadas, ela não inibiu completamente o efeito estimulatório dessa hexose. Observa-se, ainda na figura 14, que a curva dose-resposta à glucose sofreu um acentuado deslocamento para a direita. Nesta condição, o limiar estimulatório da secreção de insulina foi elevado dos 5,5 (na ausência de gentamicina) para 11,1 mM de glucose.

3.3. EFEITO DO CÁLCIO SOBRE A AÇÃO INIBITÓRIA DA SISOMICINA

A figura 15 evidencia o efeito do aumento da concentração de cálcio no meio extracelular sobre a inibição causada pela sisomicina. Verifica-se que o antibiótico (10^{-5} M) reduziu em $36 \pm 10,1\%$ a secreção induzida por 16,7 mM de glucose ($p < 0,0025$) e que a elevação do cálcio para 2,0 ou 4,0 mM antagonizou o efeito inibitório, restaurando completamente a secreção para níveis controle. Na concentração de 10^{-3} M, a sisomicina reduziu em $76 \pm 6,7\%$ a secreção de insulina ($p < 0,001$), enquanto que o aumento do cálcio de 1,0 para 4,0 mM também reverteu, embora parcialmente, a ação do antibiótico ($p < 0,001$).

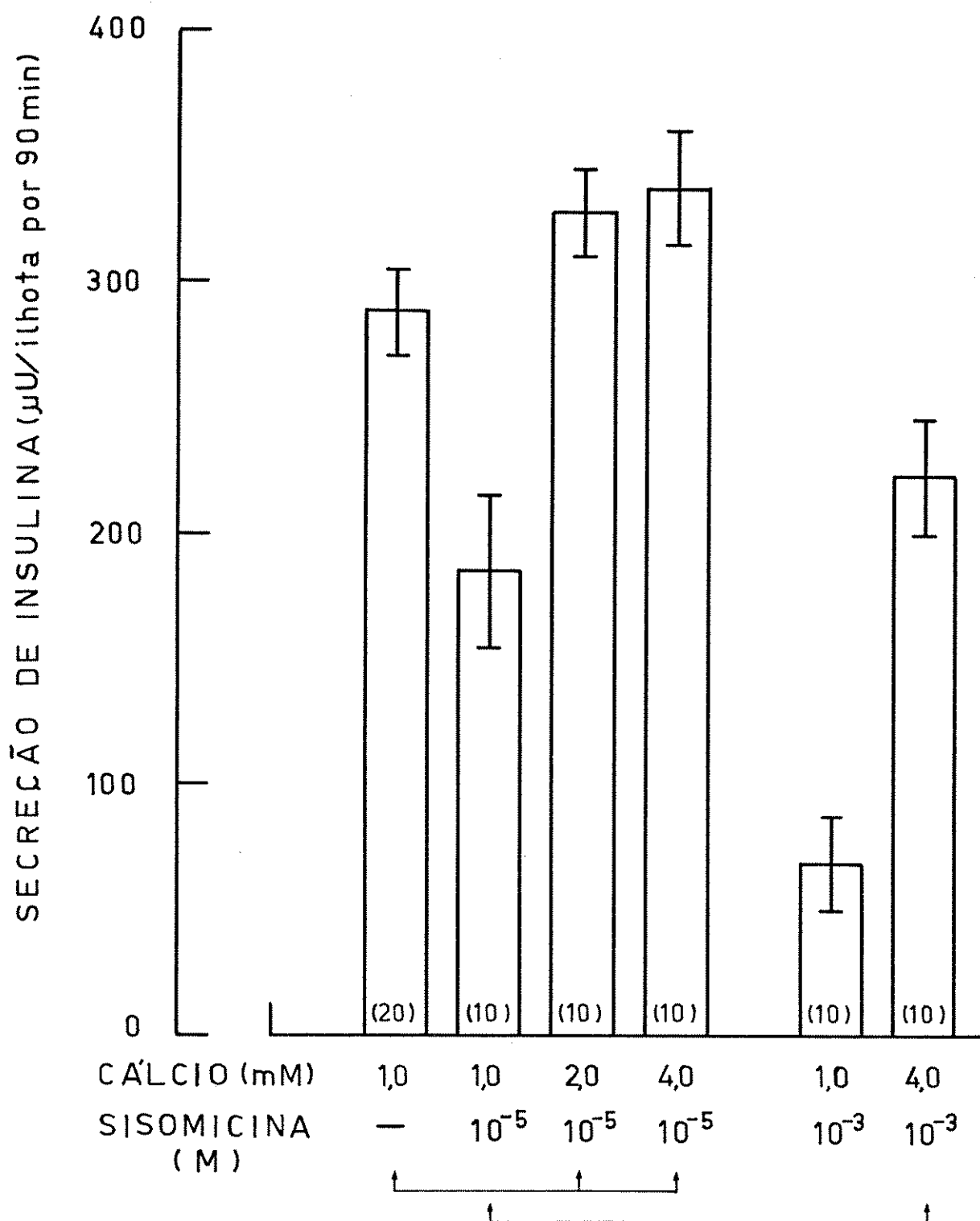


FIGURA 15. Efeito do Ca^{2+} sobre a inibição, pela sisomicina, da secreção de insulina por ilhotas isoladas e incubadas por 90 min (37°C), em meio com 16,7 mM de glucose. Os valores são média $\pm$ erro padrão do número de observações mostrado entre parênteses. As duas linhas horizontais, na parte inferior da figura, indicam as barras cujas médias não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

Assim sendo, nessas condições, a secreção de insulina passou de $69 \pm 19,3$ para $224 \pm 22,0$ $\mu\text{U}/\text{ilhota}$ por 90 min .

3.4. EFEITO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE POTÁSSIO SOBRE A INIBIÇÃO PROVOCADA PELA GENTAMICINA

A elevação da concentração de potássio, de 5,0 para 20,0 mM no meio de incubação, potencializou em $47 \pm 11,7$ % a secreção de insulina induzida por 16,7 mM de glucose, que passou de $331 \pm 12,9$ para $485 \pm 38,8$ $\mu\text{U}/\text{ilhota}$ por 90 min ($p < 0,0025$) (Fig. 16). Em meio contendo 5,0 mM de potássio, gentamicina 10^{-4} M reduziu em $63 \pm 6,0$ % a secreção de insulina ($p < 0,001$). Entretanto, quando se elevou para 20,0 mM a concentração desse cátion, gentamicina 10^{-4} M não provocou qualquer redução dos níveis secretórios de insulina ($p > 0,70$).

3.5. EFEITO DA SISOMICINA E DA GENTAMICINA SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA PROVOCADA PELA COMBINAÇÃO DE BÁRIO E TEOFILINA

A figura 17 mostra que a sisomicina e a gentamicina, na concentração de 10^{-4} M, não afetaram a secreção de insulina provocada pela combinação de bário e teofilina (2,0 mM de cada um), por ilhotas de Langerhans isoladas de rato e incubadas em meio desprovido de Ca^{2+} e glucose ($p > 0,60$ ou mais).

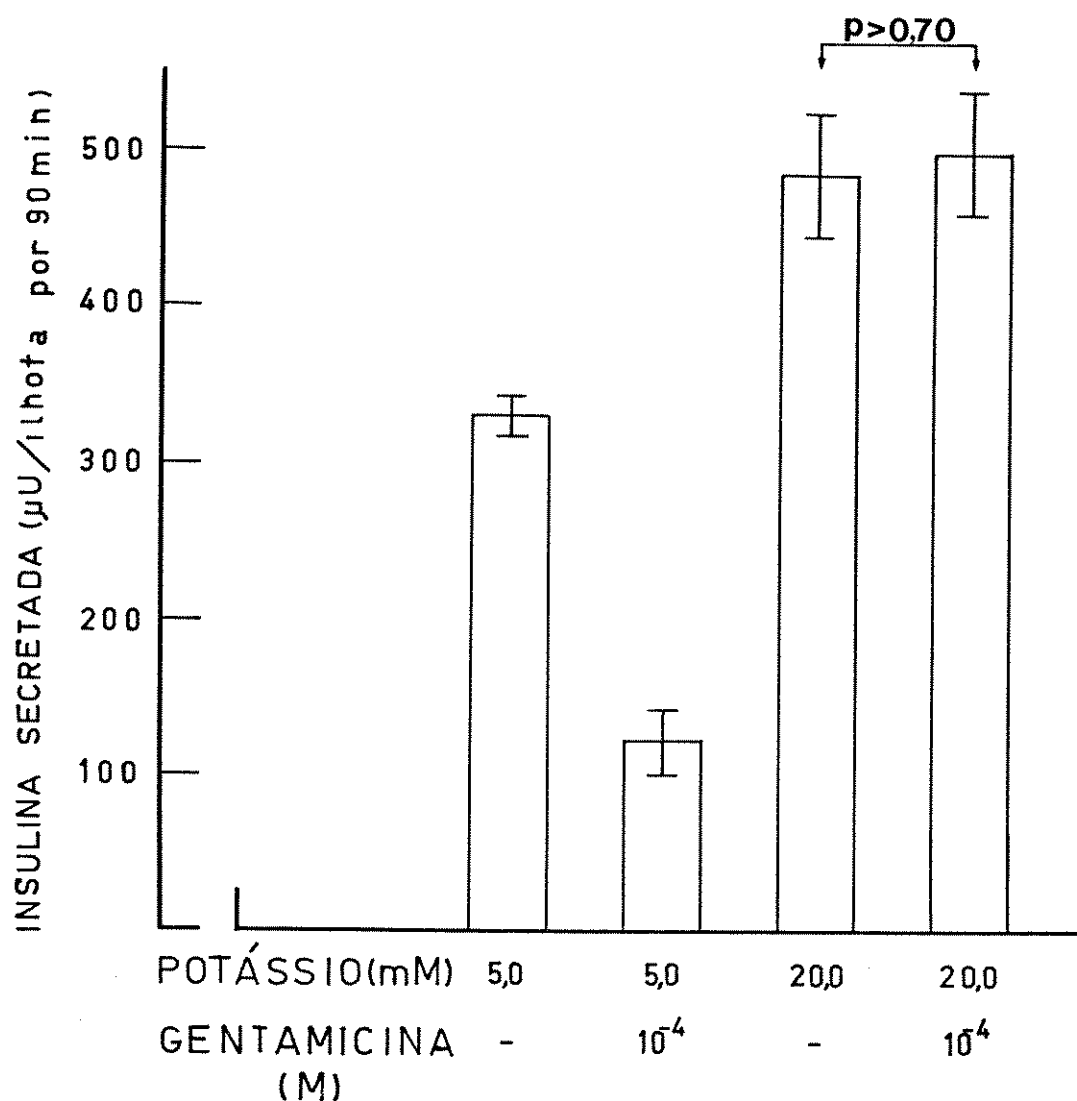


FIGURA 16. Efeito da gentamicina sobre a secreção de insulina provocada por 16,7 mM de glucose e potencializada por 20,0 mM de potássio. As ilhotas foram incubadas por 90 min a 37°C. Os valores são média $\pm$ erro padrão de 12 ou 13 observações. Exce_ tuando-se a indicação feita na parte superior da figura, todas as demais diferenças entre médias são altamente significativas ($p < 0,01$).

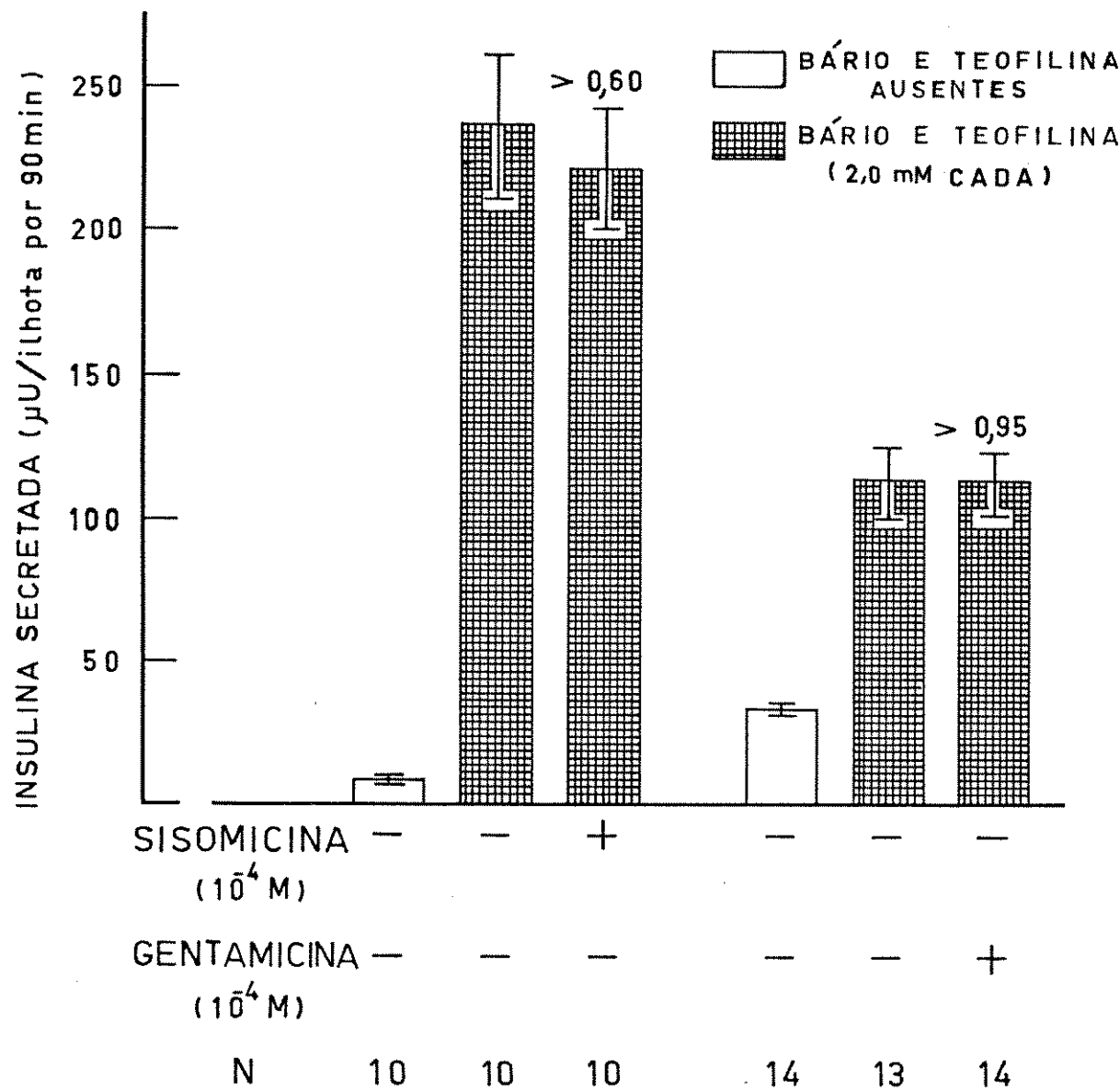


FIGURA 17, Efeito da sisomicina e da gentamicina sobre a secreção de insulina, por ilhotas de Langerhans isoladas de rato, estimulada pela combinação de bário e teofilina, na ausência de glucose. N indica o número de observações. As linhas verticais representam o erro padrão. Os valores de p (indicados na parte superior da figura) são relativos à comparação com a média indicada pela barra imediatamente à esquerda.

3.6. EFEITO DA SISOMICINA SOBRE A INCORPORAÇÃO DE CÁLCIO (^{45}Ca)

Avaliou-se o efeito da sisomicina sobre a incorporação de cálcio (^{45}Ca) por ilhotas de Langerhans isoladas e incubadas, por 90 min, na ausência ou presença de glucose (Fig. 18). A incorporação basal (na ausência de glucose) oscilou entre $4,33 \pm 0,227$ e $4,47 \pm 0,294$ pmol/ilhota por 90 min, enquanto que, em presença de glucose (16,7 mM), verificou-se acentuada elevação para $9,68 \pm 0,54$ pmol/ilhota por 90 min. Esta incorporação foi reduzida para $7,00 \pm 0,582$ pmol/ilhota por 90 min, em presença de sisomicina 10^{-3} M ($p < 0,005$). Na ausência de glucose, sisomicina 10^{-3} M reduziu drasticamente a incorporação, que passou de $4,33 \pm 0,227$ para $2,02 \pm 0,192$ pmol/ilhota por 90 min ($p < 0,001$). O efeito inibitório da sisomicina (10^{-3} M), com relação ao valor encontrado na sua ausência, foi mais acentuado na falta ($53,3 \pm 4,4$ %) que em presença de glucose ($27,7 \pm 6,0$ %). A figura 18 também evidencia que o efeito estimulatório da glucose, sobre a incorporação de Ca^{2+} , se manifestou mesmo na presença de gentamicina. Assim, em meio contendo 10^{-3} M de gentamicina, a secreção provocada por 16,7 mM de glucose foi 3,5 vezes maior que na ausência do secretagogo.

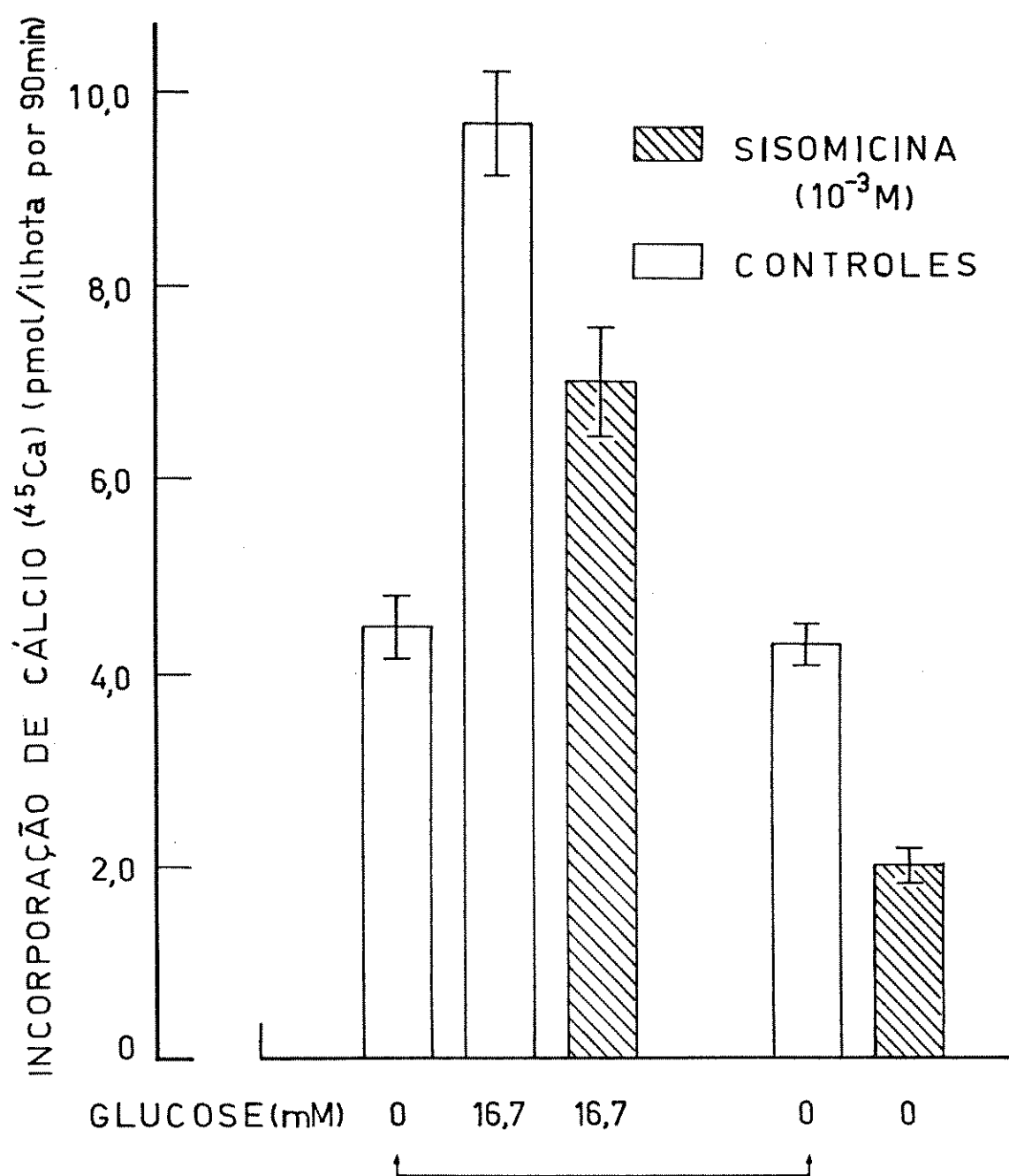


FIGURA 18. Efeito da sisomicina sobre a incorporação de cálcio (^{45}Ca) por ilhotas incubadas em ausência ou presença de glucose (90 min a 37°C). A concentração de Ca^{2+} no meio de incubação foi 1,0 mM. Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão de 8 a 10 observações. Excetuando-se a indicação na parte inferior da figura, todas as demais diferenças entre médias são altamente significativas ($p < 0,01$ ou menos).

3.7. RELAÇÃO ENTRE A INCORPORAÇÃO DE CÁLCIO E A SECREÇÃO DE INSULINA

A figura 19 representa a relação entre incorporação de cálcio e secreção de insulina, por ilhotas isoladas. Estas foram incubadas em meio com ou sem glucose 16,7 mM, contendo ou não antibiótico. Essa relação caracterizou-se pelo fato da secreção de insulina aumentar, acima do seu valor basal, quando o total de cálcio incorporado excedeu, aproximadamente, 50% da incorporação verificada em presença de glucose 16,7 mM.

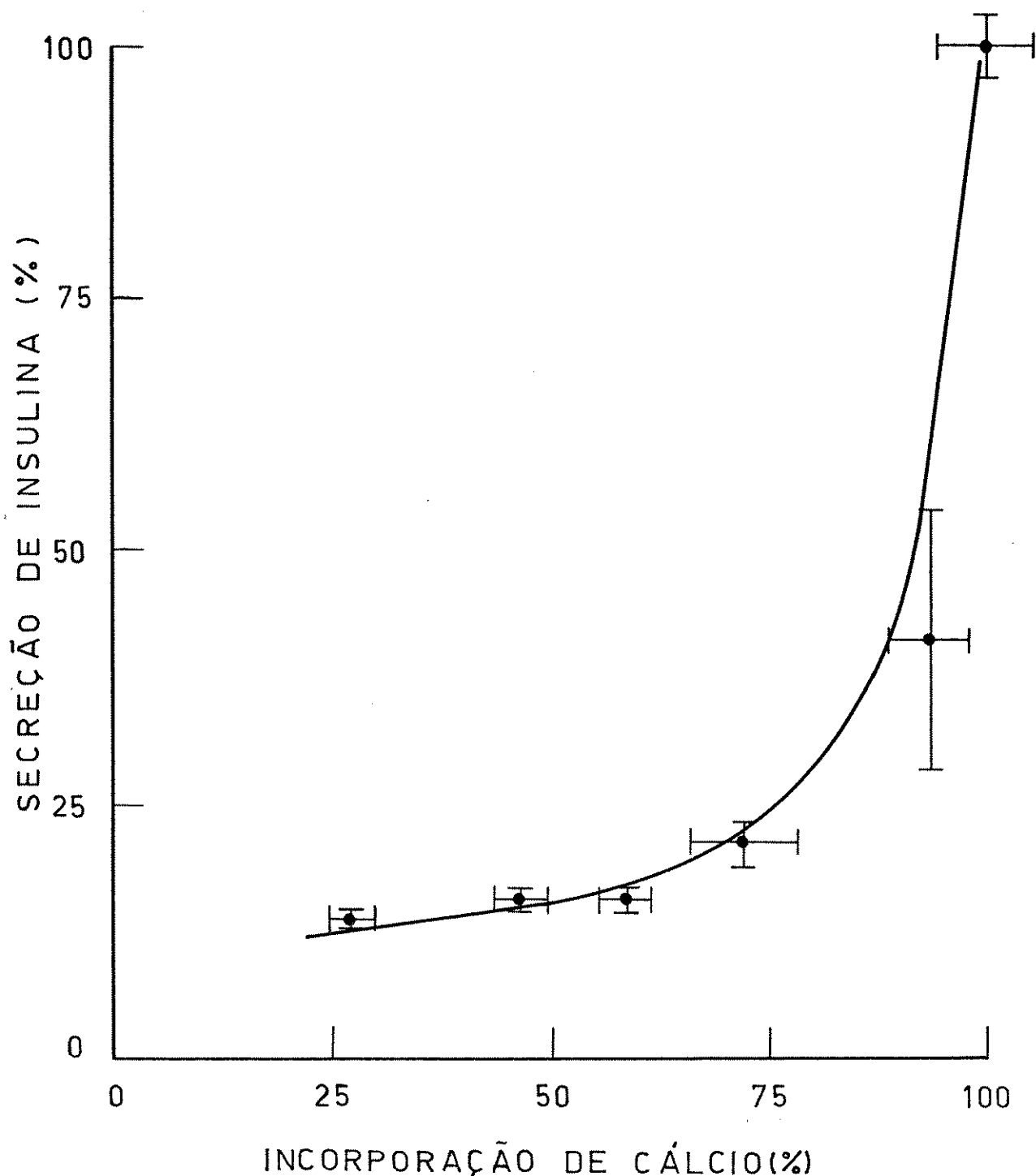


FIGURA 19. Relação entre a incorporação de cálcio (^{45}Ca) e a secreção de insulina (nas condições experimentais constantes nas figuras 11, 12 e 18 e tabelas I, II e VIII) por ilhotas de Langerhans isoladas de rato. Ambos os parâmetros (média $\pm$ erro padrão) são expressos como porcentagem do valor encontrado para grupos de ilhotas incubadas em meio-controle contendo: 16,7 mM de glucose e 1,0 mM de cálcio, sem antibiótico. Os percentuais de incorporação de cálcio foram calculados a partir de dados da tabela VIII e figura 18; para a secreção de insulina, utilizaram-se valores extraídos das tabelas I e II, bem como das figuras 11 e 12.

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Após a obtenção da estreptomicina, em 1944, e com a posterior instituição do uso clínico de vários antibióticos aminoglicosídicos, um número apreciável de casos de efeitos colaterais, provocados por essas drogas, tem sido relatado. Assim, tem-se observado efeitos, principalmente, a nível renal, vestibulo-coclear e neuromuscular. Por outro lado, em laboratório, vem-se estudando os seus efeitos a nível de miocárdio, junção neuromuscular, musculatura lisa, gânglios autonômicos, neuroipófise e em modelos de membrana.

A freqüente verificação do envolvimento do cálcio em todos esses efeitos levou-nos a cogitar uma possível atuação de antibióticos aminoglicosídicos a nível de célula beta, uma vez que está extensamente comprovado o papel desse cátion no processo de secreção de insulina.

No presente trabalho, propusemo-nos investigar os possíveis efeitos dos antibióticos aminoglicosídicos sisomicina e gentamicina sobre a secreção de insulina por ilhotas isoladas de rato, bem como estudar o(s) mecanismo(s) que estaria(m) envolvido(s) na produção desses efeitos. O trabalho está dividido em duas partes distintas. Uma primeira, que trata de aspectos relativos à padronização do RIE para a dosagem de insulina de rato, e a segunda, que se refere, especificamente, à proposição do trabalho.

4.1. VALIDAÇÃO DO RIE-PEG

O RIE-CELULOSE utilizado, inicialmente, para a dosagem de insulina de rato secretada por ilhotas isoladas, em incubações estáticas (Quadro 1), apresenta as vantagens conferidas pela grande rapidez e por dispensar o uso da curva de referência. A sua sensibilidade, relativamente baixa, em nada prejudica sua aplicação para a referida dosagem, já que as quantidades de insulina presentes estão acima do valor mínimo detectável. Na impossibilidade de continuarmos empregando essa técnica, face à escassez da celulose apropriada e ao alto consumo de anticorpo que ela envolve, passamos à padronização da técnica do RIE-PEG (Quadro 2). Esta, dentre outras, tem sido empregada para dosagens de insulina humana, sendo que não encontramos, na literatura específica, nenhuma adaptação da mesma para dosagem de insulina de rato. Suas vantagens são: (a) o baixo consumo de anticorpo; (b) o uso de polietilenoglicol, de fácil aquisição e baixo custo, como separador das frações; (c) a relativa rapidez, embora seja mais demorada que o RIE-CELULOSE; (d) apresentar maior sensibilidade, embora esta característica não seja essencial para as dosagens executadas.

4.1.1. VERIFICAÇÃO DA FALTA DE IDENTIDADE IMUNOQUÍMICA ENTRE AS INSULINAS MURINA E BOVINA

Um dos requisitos para a validação de um RIE é que o valor obtido pela dosagem de uma amostra independa do volume que se utiliza. A observância desse requisito é resultante de um paralelismo entre a curva definida pelos valores encontrados nas amostras de volumes variados, e aquela curva utili-

zada como referencial nas dosagens. Esse é o *critério do paralelismo*, que pode ser analisado quando as curvas são dispostas em escala logarítmica (MIDGLEY Jr., NISWENDER & REBAR, 1969²¹⁶; SKELLEY, BROWN & BESCH, 1973²⁵⁷; STANDARDIZATION of..., 1974²⁶³).

Diante da constatação de que o uso de curva feita com insulina bovina, para dosagem de insulina de rato, fornecia resultados diferentes, dependentes do volume da amostra (Fig. 5), tornou-se inviável, *a priori*, o emprego daquela insulina como referencial nas dosagens. Assim sendo, quando os dados foram dispostos como duas curvas, em escala *duplo log* (Fig. 7), foi possível a verificação da ausência de paralelismo entre elas (a inclinação foi de -0,558 e -0,252 para a curva com insulina bovina e murina, respectivamente). Essa observação indicou uma falta de identidade imunoquímica entre as insulinas bovina e murina secretada *in vitro* (v. DELATTRE & BOSCHERO, 1981⁴⁹), ao contrário do observado entre as insulinas bovina e porcina (Fig. 6), cujas curvas tiveram aproximadamente a mesma inclinação. Observações comparáveis foram feitas por KARAM & GRODSKY (1962¹⁴¹), GRODSKY *et alii* (1963⁸⁸), GRODSKY *et alii* (1967⁸⁷) e TAYLOR *et alii* (1968²⁶⁸).

Essas observações são explicáveis, ao menos em parte, pelas diferenças existentes na estrutura primária das insulinas bovina e murina. Verifica-se que 6 aminoácidos são diferentes entre uma e outra insulina (HUMBEL, BOSSHARD & ZAHN, 1972¹³²). A nível de reatividade imunológica entre as insulinas e o anticorpo, a explicação seria dada por uma menor avidéz do anticorpo utilizado (antiinsulina porcina) pela insulina de rato, em comparação com a insulina bovina. Sendo assim, uma dada quantidade de insulina bovina é imunologicamente equivalente a uma maior quantidade de insulina de rato. Isto acarreta

uma subestimação das quantidades de IIRR obtidas a partir de curvas de insulina bovina, conforme pode-se constatar na figura 10, comparando-se as duas curvas feitas com insulinas liofilizadas de atividade biológica conhecida. Essa comparação permite verificar, também, que o grau absoluto de subestimação é tanto maior quanto mais para a direita da curva (Fig. 10) se analisam os dados. Ficou, assim, caracterizada uma falta de identidade imunoquímica entre as insulinas bovina e murina, identidade essa imprescindível para a validação de um RIE (BERSON & YALOW, 1976²⁶).

4.1.2. CURVA DE EQUIVALÊNCIA

Com base na constatação de que os valores de IIRR, resultantes do uso de curva de insulina bovina, não refletiam a real concentração das amostras, aplicou-se um fator de correção dos dados, o qual variava de acordo com o ponto da curva que se utilizava, e que, graficamente, era dado por uma função de potência, conforme disposto nas figuras 8 e 9. O traçado gráfico definido por essa função foi denominado *curva de equivalência*. Esta curva, *se a priori* não forneceu os valores exatos de IIRR, ao menos permitiu uma estimativa qualitativamente correta, possibilitando a ulterior normalização dos resultados, assim que dispusemos de insulina de rato liofilizada e de atividade biológica conhecida (cf. item 2.9).

4.1.3. PRECISÃO INTRA-ENSAIO

A precisão intra-ensaio pode ser definida como o grau de concordância entre uma série de medidas de uma amostra e a sua média, i.e., a amplitude da variação em uma estimativa

(MIDGLEY Jr., NISWENDER & REBAR, 1969 ²¹⁶). O coeficiente de variação encontrado para as dosagens de insulina pelo RIE — PEG — 21% — é relativamente elevado, se comparado com valores obtidos, em dosagens de insulina plasmática humana — 7,6% —, por TOLEDO e SOUZA (1972 ²⁶⁹). Essa diferença pode ser atribuída, em grande parte, à especificidade comparativamente baixa do anticorpo usado, pela insulina de rato, em relação à especificidade apresentada para com a insulina porcina, usada como traçador. Vale lembrar que o anticorpo utilizado foi extraído de cobaias imunizadas com insulina porcina e que, portanto, seria realmente previsível uma maior reatividade com a insulina porcina iodada. Essa característica se traduziu, graficamente, em curvas de insulinas murinas que apresentam inclinações acentuadamente menores que as evidenciadas com insulinas porcina e bovina (Figs. 6, 7 e 10). Uma menor inclinação significa que uma maior quantidade de insulina não-marcada é necessária para causar um certo decréscimo na proporção de insulina marcada ligada ao anticorpo e, por extensão, em B/B_0 . Em contraposição, uma pequena variação na relação B/B_0 já é suficiente para alterar os valores procurados através da curva de menor inclinação, comprometendo, com isso, o grau de exatidão e precisão do ensaio. Esse inconveniente pode ser, de imediato, contornado, ao menos parcialmente, por meio de (a) dosagens repetidas de uma mesma amostra e (b) redução no erro de contagem da radiação. A superação do problema requereria a obtenção e uso de um anticorpo de maior avidéz pela insulina de rato, possivelmente anticorpo antiinsulina de rato. Sua produção poderia ser tentada em cobaia, que apresenta insulina diferente da do rato em 17 dos 51 aminiácidos, através da administração de extratos parcialmente purificados de pâncreas endócrino de rato.

4.1.4. CURVA DOSE-RESPOSTA À GLUCOSE

A validade do RIE-PEG e da curva de equivalência, empregados na dosagem da insulina secretada, bem como a viabilidade fisiológica das ilhotas isoladas pela collagenase, puderam ser constatadas através dos resultados obtidos com a incubação de ilhotas em meios contendo concentrações crescentes de glucose. As características da curva sigmóide dose-resposta à glucose (Fig. 11) foram semelhantes às obtidas por MALAISSE-LAGAE & MALAISSE (1971²¹⁰), GREEN & TAYLOR (1972⁸⁰), ASHCROFT, BASSETT & RANDLE (1972¹³), LAMBERT (1976¹⁵⁹), ZAWALICH & MATSCHINSKY (1977²⁸⁷), ZAWALICH *et alii* (1977²⁸⁸), HENQUIN (1978a¹⁰⁹), MALAISSE *et alii* (1979c²⁰⁷), ISHIBASHI *et alii* (1980¹³⁸) e MALAISSE *et alii* (1980²⁰⁴), todos utilizando ilhotas de rato, isoladas por collagenase. O limiar estimulatório encontrado (por volta de 5,5 mM de glucose), bem como o K_m (10,2 mM) situam-se na faixa dos valores que são descritos por aqueles autores, enquanto que a secreção basal ($48 \pm 3,3$ μ U/ilhota por 90 min, $n = 41$) se aproximou dos números por eles obtidos. Este valor está, porém, muito abaixo dos valores observados por LACY, YOUNG & FINK (1968¹⁵⁴) e MONTAGUE & TAYLOR (1969²²¹), com idêntica preparação experimental. Devemos salientar que estes dois grupos de pesquisadores foram pioneiros na utilização de ilhotas isoladas por collagenase, o que justificaria o fato de haverem obtido valores elevados de secreção basal, decorrentes de uma técnica incipiente.

Assim, foi possível concluir-se que a insulina que se estava medindo não decorria de um simples vazamento, mas sim, de uma resposta fisiológica, já que as ilhotas secretaram em intensidade proporcional à concentração de glucose, tendo-se observado uma secreção basal, um limiar estimulatório,

uma resposta linearmente proporcional na faixa intermediária da curva e uma *saturação*.

4.2. ASPECTOS DO USO DE ILHOTAS ISOLADAS

A utilização de ilhotas isoladas, como modelo para estudo dos processos de secreção de insulina, elimina grande parte dos inconvenientes gerados pelas influências do tecido acinoso, sangue e sistema nervoso. Existem, atualmente, duas técnicas para isolamento de ilhotas de Langerhans. HELLERSTRÖM (1964⁹⁷) desenvolveu a técnica de isolamento por microdissecção de ilhotas de diferentes mamíferos. Uma segunda técnica, e por nós empregada, foi descrita por MOSKALEWSKI (1965²²³) para o pâncreas de cobaia e particularizada para o rato por KOSTIANOVSKY & LACY (1966¹⁴⁸) e LACY & KOSTIANOVSKY (1967¹⁵²), segundo a qual as ilhotas são separadas do tecido acinoso pela ação da enzima proteolítica collagenase.

LERNMARK (1971¹⁶⁷) relatou a importância de alguns detalhes técnicos na preparação de ilhotas pela collagenase. Destacou a necessidade de um manuseio cuidadoso das ilhotas, adequada oxigenação, a necessidade de se evitar baixas temperaturas e as influências do pH e da osmolaridade.

No processo de isolamento das ilhotas empregamos de 6 a 10 mg (1560 a 2600 U) de collagenase para cada pâncreas, durante 15 ± 1 min de incubação. Devemos, no entanto, salientar que a enzima que empregamos fora preparada comercialmente há cerca de 10 anos e que, portanto, a sua atividade, possivelmente, seja menor que o indicado. Essa quantidade de enzima está bastante aquém da utilizada por VANCE *et alii* (1968²⁷¹), de

17,5 a 25 mg/pâncreas, embora o tempo da incubação por eles efetivada fosse de apenas 6 a 12 min. É também inferior à quantidade empregada por HAHN *et alii* (1976⁹¹), que constataram que ilhotas de rato, isoladas por collagenase (5 mg / 100 mg de pâncreas, durante 15 min), quando estimuladas por glucose 10,0 ou 20,0 mM, secretaram quantidades de insulina idênticas às produzidas por ilhotas obtidas através de microdissecção. Os mesmos autores obtiveram uma curva sigmóide quando correlacionaram concentrações de glucose extracelular e secreção de insulina, além de não notarem diferença na capacidade secretora entre ilhotas de pâncreas submetidos a 5 ou 15 min de ação collagenolítica. Entretanto, essas indicações não significam, necessariamente, uma ausência absoluta de efeitos deletérios da collagenase comercial, uma vez que WOLTERS & KONIJNENDIJK (1980²⁸³), comparando as secreções entre ilhotas isoladas com o uso de collagenase purificada (10 mg/pâncreas) ou collagenase comercial (3000 U/pâncreas), após 11 a 17 min de incubação, verificaram que os valores de secreção basal obtidos com essa última foram relativamente mais elevados (30 a 50 %), sendo indicadores de possível dano sobre as ilhotas (LERNMARK, 1971¹⁶⁷). A validade do uso que fizemos de ilhotas isoladas é, no entanto, consubstanciada nos inúmeros trabalhos realizados com o emprego dessa preparação, e cujos resultados são comparáveis aos obtidos *in vivo* ou com preparações *in vitro* que utilizam pâncreas isolados, fragmentos de pâncreas ou ilhotas microdissecadas.

Uma grande variabilidade na secreção de insulina pode decorrer de (a) ações nocivas da collagenase (HAHN *et alii*, 1976⁹¹) e enzimas contaminantes contidas nas preparações comerciais daquela protease (HAHN *et alii*, 1976⁹¹; WOLTERS & KONIJNENDIJK, 1980²⁸³), bem como de fatores tóxicos, como o encontra

4296/BC

do por MOSKALEWSKI, SOCHAŃSKA & WIWATOWSKI (1974²²⁴) em algumas preparações de colagenase; (b) diferenças nas dimensões das ilhotas coletadas (WOLTERS & KONIJNENDIJK, 1980²⁸³) e (c) diferenças no conteúdo de insulina (STEINKE, PATEL & AMMON, 1972²⁶⁴). Evidenciou-se, em colagenase comercial, atividades fosfolipásica, tripsínica e de outras proteases (WOLTERS & KONIJNENDIJK, 1980²⁸³). Estes autores verificaram, também, que mesmo ilhotas de rato, de massas idênticas, apresentam grande variabilidade na secreção de insulina, e consideram que o melhor parâmetro para se correlacionar a secreção seja a superfície externa da ilhota. Finalmente, concluíram que, embora uma manipulação inadequada possa provocar grandes variações na secreção, o mais provável é que ela seja conseqüência de uma verdadeira heterogeneidade das ilhotas. Esta conclusão concorda com a observação de uma grande variabilidade na resposta individual de ilhotas de rato à glucose, feita por BEIGELMAN *et alii* (1976²²).

LACY, YOUNG & FINK (1968¹⁵⁴) demonstraram a viabilidade do uso de preparações de ilhotas isoladas de pâncreas de rato pela ação da colagenase, para a investigação dos efeitos de determinados agentes sobre a secreção de insulina. Os mesmos autores não detectaram qualquer destruição da insulina secretada durante os 90 min de incubação, tempo este igual ao que utilizamos nos experimentos. Por sua vez, VANCE *et alii* (1968²⁷¹) observaram apenas uma pequena degradação da insulina secretada, prevenível pelo Trasilol.

Uma segunda evidência de que o sistema que empregamos era funcionante foi obtida incubando-se ilhotas em meios contendo 16,7 mM de glucose, com ou sem teofilina (1,4 mM). Nessas condições, as secreções obtidas foram de 271 ± 64 (n = 6)

e 770 ± 79 ($n = 9$), respectivamente (resultados não mostrados). A secreção obtida em meio contendo 16,7 mM de glucose situa-se na faixa de valores encontrados na literatura, para sistemas de ilhotas de rato, isoladas por colagenase e incubadas a 37°C durante 90 min, ou seja, de 182 ± 12 μU /ilhota (MALAISSE *et alii*, 1976a¹⁹⁶) a $371 \pm 29,1$ μU /ilhota (MALAISSE *et alii*, 1976b¹⁹⁷). Igualmente, o efeito da teofilina como potencializador da secreção de insulina, provocada por concentrações elevadas de glucose, é bem conhecido, tanto *in vivo* (TURTLE, LITTLETON & KIPNIS, 1967²⁷⁰) quanto em preparações isoladas (MALAISSE, MALAISSE-LAGAE & MAYHEW, 1967¹⁸⁶). Os resultados que obtivemos estão particularmente em concordância com aqueles encontrados por MONTAGUE & TAYLOR (1969²²¹), usando ilhotas de rato incubadas em condições estáticas, e por SOMERS *et alii* (1976a²⁶⁰). Estes, empregando pâncreas isolado de rato e perfundido por um meio contendo 13,9 mM de glucose, constataram uma elevação de aproximadamente 150 % na secreção de insulina, após a inclusão de 1,4 mM de teofilina. A evidência conclusiva da viabilidade funcional da preparação que utilizamos já foi relatada no item 4.1.4.

4.3. AÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDICOS SISOMICINA E GENTAMICINA SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA E INCORPORAÇÃO DE CÁLCIO (^{45}Ca).

O antibiótico gentamicina é um complexo isolado da *Micromonospora purpurea* e que, por cromatografia de coluna, pode ser separado em três componentes ativos que são as gentiomicinas C_1 , C_{1a} e C_2 (GLASBY, 1976⁷⁵). Utilizamo-lo por ser um dos representantes típicos do grupo dos aminoglicosídicos

-aminociclitólicos. O outro antibiótico, a sisomicina, foi utilizado devido à sua estreita semelhança estrutural com a gentamicina, à família da qual pertence, sendo um derivado deídrico da gentiomicina C_{1a} (GLASBY, 1976⁷⁵). A sisomicina é de introdução mais recente na quimioterapia e tem sido largamente empregada no tratamento de infecções provocadas por bactérias Gran-negativas.

4.3.1. INIBIÇÃO DA SECREÇÃO DE INSULINA

Verificamos que a sisomicina e a gentamicina inibiram, de maneira dose-dependente, a secreção de insulina por ilhotas isoladas de rato e incubadas em meio com 16,7 mM de glucose (Figs. 12 e 13). Esse efeito foi qualitativamente idêntico ao obtido por diversos pesquisadores, que utilizaram variados antagonistas do cálcio: LAMBERT & HENQUIN (1974¹⁶⁰) e HENQUIN & LAMBERT (1975¹¹⁴) com o Co^{2+} ; MALAISSE *et alii* (1976e²⁰³) empregando o Mg^{2+} ; MALAISSE *et alii* (1976a¹⁹⁶) com o D600; MALAISSE *et alii* (1976b¹⁹⁷) usando o R33711; MALAISSE (1977¹⁷⁸) com o suloctidil; MALAISSE & BOSCHERO (1977¹⁸³) utilizando a nifedipina e MALAISSE *et alii* (1977²⁰⁰) usando o verapamil. Todos os pesquisadores citados empregaram o mesmo sistema experimental — ilhotas isoladas de rato e incubadas em condições estáticas. Em adição, DEVIS *et alii* (1975⁵³) e SOMERS *et alii* (1976a²⁶⁰), perfundindo pâncreas isolado de rato, obtiveram, com o uso de verapamil, efeitos inibitórios semelhantes aos anteriormente citados.

A concentração mínima requerida de sisomicina ou gentamicina, para a observação do efeito inibitório sobre a secreção estimulada por glucose 16,7 mM, foi de 10^{-5} M, sendo

a DE_{50} da ordem de 5×10^{-5} M (Figs. 12 e 13). Esse valor é nitidamente superior aos resultados relatados pelos pesquisadores anteriormente mencionados e que usaram outros antagonistas do cálcio, em preparações de ilhotas isoladas. Evidenciamos, assim, uma menor potência da sisomicina e da gentamicina sobre a secreção de insulina estimulada por glucose, *in vitro*, comparada com a potência daqueles antagonistas anteriormente citados. Coincidentemente, as concentrações terapêuticas da gentamicina e sisomicina, no soro, são da ordem de 10^{-5} M (RODRIGUES *et alii*, 1975²⁴⁴; MARKS *et alii*, 1978²¹²; REYMAN *et alii*, 1979²⁴³; SANDE & MANDELL, 1980²⁴⁷).

A inclinação da curva dose-resposta à sisomicina (representada em coordenadas semilogarítmicas) indica que ocorre uma inibição fracional de 30 a 50%, para cada aumento de 10 vezes na concentração dessa droga (Fig. 12). Semelhante verificação foi feita com os antagonistas do Ca^{2+} : D600 (MALAISSE *et alii*, 1976a¹⁹⁶), R33711 (MALAISSE *et alii*, 1976b¹⁹⁷), suloctidil (MALAISSE, 1977¹⁷⁸) e nifedipina (MALAISSE & BOSCHERO, 1977¹⁸³).

Por outro lado, verificamos que as curvas dose-resposta aos dois antibióticos são praticamente sobreponíveis e que a secreção, em presença de 10^{-3} M da droga, não foi significativamente diferente dos níveis basais (na ausência de glucose) (Figs. 12 e 13). Essa similaridade de efeitos não se constituiu em surpresa, considerando-se a acentuada semelhança estrutural entre os antibióticos, e permitiu-nos a utilização de ambos na seqüência dos experimentos.

Resultados comparáveis aos que obtivemos foram encontrados, *in vivo*, por SANTOS *et alii* (1981²⁴⁹). Estes observaram uma redução significativa da secreção de insulina em ratos submetidos a IVGTT, após tratamento agudo ou crônico com

gentamicina ou tobramicina, respectivamente. Esses autores não excluem, contudo, a possibilidade de uma ação dos antibióticos a nível da inervação autonômica do pâncreas.

A ação dos dois antibióticos utilizados, sobre a secreção de insulina, é coerente com os efeitos verificados em outros tecidos excitáveis. Assim, VITAL BRAZIL & PRADO-FRANCESCHI (1969b²⁷⁶) e DRETCHEN *et alii* (1972⁵⁹), trabalhando com preparações neuromusculares isoladas de vertebrados, constataram que a gentamicina provoca uma significativa redução da liberação de acetilcolina na placa motora, conduzindo a um bloqueio mioneural. Efeito bloqueador neuromuscular provocado pela gentamicina também foi observado por VITAL BRAZIL & PRADO-FRANCESCHI, (1969a²⁷⁵), ADAMS *et alii* (1976⁸) e ALBIERO *et alii* (1978⁹), estes últimos observando o mesmo efeito também com a sisomicina. Inibição sobre músculo liso, exercida pela gentamicina, foi demonstrada por ADAMS, GOODMAN & WEISS (1974⁷) e GOODMAN & ADAMS (1976⁷⁸), todos empregando musculatura arterial isolada de mamíferos e por PIMENTA DE MORAIS, CORRADO & SUAREZ-KURTZ (1978²³⁵), que utilizaram íleo isolado de cobaia. Efeitos cardiodepressores foram verificados em mamíferos, tanto *in vivo* (ADAMS, 1975a¹, b²), quanto *in vitro* (ADAMS, 1975c³; ADAMS & DURRETT, 1978⁶), constatando-se, sempre, uma redução na resposta contrátil do miocárdio exposto à gentamicina.

Por outro lado, uma ação ganglioplégica, provocada por outros antibióticos aminoglicosídicos, foi observada por CORRADO (1958³⁹) e ALKADHI & McISAAC (1978¹⁰) com a estreptomina; CORRADO & RAMOS (1958⁴⁰) e WRIGHT & COLLIER (1977²⁸⁴) usando a neomicina e por CORRADO & RAMOS (1960⁴¹) empregando a canamicina.

4.3.2. REVERSÃO DO EFEITO INIBITÓRIO, PELO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO EXTRACELULAR DE Ca^{2+}

Uma vez constatada a ação inibitória de antibióticos aminoglicosídicos sobre a secreção de insulina *in vitro*, buscamos determinar em que etapa(s) do processo secretório estariam eles atuando.

Conforme já disposto na Introdução, o processo de secreção de insulina, estimulado por glucose, se inicia com o reconhecimento do secretagogo, seguindo-se o aumento da concentração citosólica do cálcio e, finalmente, a ativação do sistema efetor, o que leva à migração das vesículas e extrusão do seu conteúdo.

Desde o trabalho pioneiro de GRODSKY & BENNETT (1966⁸⁶), um número considerável de pesquisadores tem comprovado a importância fundamental do Ca^{2+} no processo secretório de insulina (CURRY, BENNETT & GRODSKY, 1968c⁴⁶; HALES & MILNER, 1968⁹²; MALAISSE, BRISSON & MALAISSE-LAGAE, 1970¹⁸⁹; MALAISSE, 1972¹⁷³; PIPELEERS, MARICHAL & MALAISSE, 1973²³⁶; HELLMAN, 1975⁹⁹; SOMERS *et alii*, 1976a²⁶⁰, b²⁶¹; HELLMAN, 1977¹⁰¹; HENQUIN, 1978b¹¹⁰; KIKUCHI *et alii*, 1979¹⁴⁶). Em concordância com essa comprovação, tem-se obtido indicações de que vários agentes que afetam a secreção de insulina produzem grandes efeitos sobre o manuseio de Ca^{2+} pela célula beta (BRISSON & MALAISSE, 1973³¹; MALAISSE, PIPELEERS & MAHY, 1973¹⁹²), ao passo que uma ação protetora exercida por níveis elevados de Ca^{2+} tem sido observada em experimentos que utilizam antagonistas inorgânicos (HENQUIN & LAMBERT, 1975¹¹⁴) ou orgânicos de Ca^{2+} (DEVIS *et alii*, 1975⁵³; MALAISSE *et alii*, 1976a¹⁹⁶; MALAISSE, 1979¹⁷⁹). So-

que o efeito inibitório desses antagonistas se acentua com a redução dos níveis de Ca^{2+} extracelular.

Em outro sentido, numerosos relatos descrevem o papel do Ca^{2+} nas ações dos antibióticos aminoglicosídicos sobre tecidos excitáveis.

Fundamentados nas razões expostas, procuramos: (a) determinar o efeito do aumento da concentração extracelular do Ca^{2+} sobre a secreção de insulina inibida pela sisomicina e (b) avaliar o efeito da sisomicina sobre a incorporação de Ca^{2+} por ilhotas isoladas.

Em ilhotas estimuladas por 16,7 mM de glucose, verificamos que o aumento da concentração de Ca^{2+} do meio de incubação, de 1,0 para 2,0 ou 4,0 mM, reverteu completamente o efeito inibitório causado por 10^{-5} M de sisomicina. Em idêntica preparação, 4,0 mM de Ca^{2+} reverteram parcialmente a inibição provocada por 10^{-3} M do mesmo antibiótico (Fig. 15). Essa ação do Ca^{2+} a nível das células beta é similar à observada em outros tecidos excitáveis. VITAL BRAZIL & PRADO-FRANCESCHI (1969a²⁷⁵, b²⁷⁶) verificaram que o aumento da concentração extracelular de Ca^{2+} antagoniza o efeito bloqueador provocado pela gentamicina sobre a junção neuromuscular. Efeito semelhante foi obtido por ADAMS *et alii* (1976⁸). Utilizando preparações *in vivo* (ADAMS, 1975a¹) e *in vitro* (ADAMS, 1975c³), este pesquisador observou que o aumento da concentração de Ca^{2+} antagoniza o efeito depressor da gentamicina sobre o sistema cardiovascular e, especificamente, sobre o miocárdio. A ação protetora exercida pelo Ca^{2+} tem sido descrita, também, para outros antibióticos aminoglicosídicos, a nível de: (a) músculo esquelético (VITAL BRAZIL & CORRADO, 1957²⁷⁴; CORRADO & RAMOS, 1958⁴⁰; CORRADO, RAMOS & DE ESCOBAR, 1959⁴²; ELMQVIST & JOSEFSSON, 1962⁶⁴; VITAL BRAZIL &

PRADO-FRANCESCHI, 1969b²⁷⁶; PITTINGER, ERYASA & ADAMSON, 1970²³⁸; DUNKLEY, SANGHVI & GOLDSTEIN, 1973⁶¹; ADAMS *et alii*, 1976⁸); (b) músculo cardíaco (SWAIN, KIPLINGER & BRODY, 1956²⁶⁷; ADAMS, 1975a¹, b²) e (c) gânglios autonômicos (CORRADO, 1958³⁹; CORRADO & RAMOS, 1960⁴¹; ALKADHI & McISAAC, 1978¹⁰).

4.3.3. INIBIÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE CÁLCIO (⁴⁵Ca)

Para uma verificação mais direta do envolvimento do Ca^{2+} na ação inibitória dos antibióticos aminoglicosídicos sobre a secreção de insulina, avaliamos a interferência da sisomicina sobre a incorporação desse cátion, por ilhotas isoladas, através do emprego do ⁴⁵Ca como traçador. Pela figura 18, verifica-se que a incorporação de Ca^{2+} foi grandemente aumentada em presença de glucose e inibida pela sisomicina 10^{-3} M, tanto em presença quanto na ausência de glucose. Essa ação inibitória do antibiótico está em paralelo com o efeito por ele provocado sobre a secreção de insulina (Fig. 12) e é compatível com as observações feitas em condições idênticas, com o emprego de reconhecidos antagonistas do Ca^{2+} , tais como o Co^{2+} (HENQUIN & LAMBERT, 1975¹¹⁴), D600 (MALAISSE *et alii*, 1976a¹⁹⁶), R33711 (MALAISSE *et alii*, 1976b¹⁹⁷), nifedipina (MALAISSE & BOSCHERO, 1977¹⁸³), suloctidil (MALAISSE, 1977¹⁷⁸) e verapamil (MALAISSE *et alii*, 1977²⁰⁰). Todos os antagonistas orgânicos do Ca^{2+} , dentre os que acabamos de citar, apresentam a propriedade, em comum, de provocar uma redução mais intensa da sua captação na ausência de glucose, em comparação com o valor obtido com 16,7 mM do secretagogo. Como se pode verificar pela figura 18, a sisomicina também apresenta essa propriedade, uma vez que, enquanto em presença de 16,7 mM de glucose ocorreu uma

inibição de $27,7 \pm 6,0 \%$ na incorporação de Ca^{2+} , na sua ausência esse valor se elevou para $53,3 \pm 4,4 \%$. Observa-se, entretanto, que a redução absoluta foi praticamente a mesma ($2,68$ e $2,31$ pmol/ilhota por 90 min, respectivamente) em ambas as situações. Esses dados não favorecem a idéia de uma possível ação inibitória da sisomicina a nível dos canais *tardios* de cálcio, *voltagem-dependentes*, bloqueáveis pelo Co^{2+} (DONATSCH *et alii*, 1977⁵⁶), os quais estariam inativos na ausência de glucose.

Inibição da incorporação de cálcio (^{45}Ca), provocada por antibióticos aminoglicosídicos, tem sido constatada, também, em outros tecidos excitáveis. Assim, esse efeito foi observado em musculatura lisa vascular com o emprego de: neomicina (WEISS, GOODMAN & ADAMS, 1973²⁷⁷ e GOODMAN, WEISS & ADAMS, 1974⁷⁹); gentamicina, canamicina e estreptomicina (ADAMS, GOODMAN & WEISS, 1974⁷) e canamicina, neomicina e gentamicina (GOODMAN & ADAMS, 1976⁷⁸). Em musculatura intestinal, um efeito inibitório da estreptomicina sobre a captação de ^{45}Ca foi observado por PIMENTA DE MORAIS, CORRADO & SUAREZ-KURTZ (1978²³⁵), enquanto que WRIGHT & COLLIER (1977²⁸⁴) verificaram o mesmo efeito em gânglio autonômico isolado.

Utilizando fibras musculares de *Callinectes danae*, que apresentam um característico aumento da condutância ao Ca^{2+} durante a despolarização, SUAREZ-KURTZ (1974²⁶⁵) obteve resultados indicadores de que a neomicina e estreptomicina deprimem a condutância membranar ao Ca^{2+} . Uma interpretação consonante com essa é dada por ADAMS & DURRETT (1978⁶) para explicar o efeito cardiodepressor da gentamicina. Segundo esses autores, a gentamicina atuaria no sistema de transporte de Ca^{2+} pelos canais *lentos* do sarcoplasma ou na disponibilidade de Ca^{2+} para trans

locação por esses canais, ou em ambos.

Os resultados por nós obtidos não excluem a possibilidade dos antibióticos empregados interferirem também no transporte de outros íons pela membrana plasmática da célula beta. Nesse particular, DIECKE, WESTECKER & VOGT (1971⁵⁵), utilizando fibras nervosas mielinizadas, verificaram que estreptomicina diminui a corrente de sódio, possivelmente reduzindo a disponibilidade de seus canais durante a excitação. Por sua vez, PICCININI *et alii* (1973²³⁴), utilizando um modelo de membrana, verificaram que gentamicina, neomicina, aminosidina, canamicina e estreptomicina inibem, de maneira dose-dependente, a transferência de sódio, potássio, magnésio e cálcio, efetuada pela cefalina.

Outrossim, a possibilidade de que a redução na incorporação de cálcio e, conseqüentemente, a redução na secreção de insulina sejam devidas a uma atividade quelante dos aminoglicosídicos (CORRADO, 1963, *apud* PITTINGER & ADAMSON, 1972²³⁷) parece pouco provável, diante dos resultados obtidos por ELMQVIST & JOSEFSSON (1962⁶⁴) e SUAREZ-KURTZ (1974²⁶⁵). Esses autores não constatarem qualquer redução significativa nos níveis de cálcio ionizado em soluções contendo neomicina em concentrações da ordem de 10^{-3} e 10^{-2} M.

4.3.4. RELAÇÃO ENTRE ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDICOS E CANAIS DE CÁLCIO "VOLTAGEM-DEPENDENTES"

Considerando-se (a) que o estímulo secretório de insulina, exercido pelo aumento da concentração extracelular de K^+ , se deve ao seu efeito despolarizante (MILNER & HALES, 1967c²¹⁹; GOMEZ & CURRY, 1973⁷⁷; ATWATER, RIBALET & ROJAS, 1978¹⁸), que conduz a um aumento da incorporação de Ca^{2+} (MALAISSE-LAGAE & MALAISSE, 1971²¹⁰; HENQUIN & LAMBERT, 1974¹¹³; HELLMAN, SEHLIN & TÄLJEDAL, 1978¹⁰⁵; HERCHUELZ *et alii*, 1980a¹²¹) através da abertura de canais de Ca^{2+} *voltagem-dependentes*, e considerando-se, ainda (b) que esses efeitos não foram inibidos pela gentamicina ($10^{-4}M$) (Fig. 16), julgamos que essas constatações também não favorecem a idéia de uma possível ação inibitória dos antibióticos aminoglicosídicos a nível dos canais de Ca^{2+} *voltagem-dependentes*.

Essa idéia é, indiretamente, apoiada pela constatação feita por HENQUIN & LAMBERT (1975¹¹⁴), em ilhotas isoladas, de que o Co^{2+} , bloqueador do canal de Ca^{2+} *voltagem-dependente* (DONATSCH *et alii*, 1977⁵⁶), suprimiu completamente a secreção de insulina estimulada por 24 mM de K^+ .

A inobservância, em nosso trabalho, de qualquer efeito inibitório da gentamicina sobre a secreção eliciada por alta concentração extracelular de K^+ , conflita com a observação de ações inibitórias provocadas por antibióticos aminoglicosídicos em musculatura lisa vascular sob efeito despolarizante daquele cátion (GOODMAN, WEISS & ADAMS, 1974⁷⁹; ADAMS, GOODMAN & WEISS, 1974⁷; ADAMS & GOODMAN, 1975⁵; GOODMAN & ADAMS, 1976⁷⁸). É possível, contudo, que isto decorra das diferenças existentes na maneira de como uma e outra estrutura dispõe do Ca^{2+} na sua

atividade fisiológica.

Estudando os efeitos do aumento extracelular de K^+ , KUZUYA, KAJINUMA & IDE (1974¹⁵⁰) obtiveram dados conflitantes com as observações de HELLMAN, SEHLIN & TÄLJEDAL (1978¹⁰⁵) e HERCHUELZ *et alii* (1980a¹²¹). Aqueles autores verificaram que a secreção de insulina, causada pelo aumento da concentração do K^+ extracelular, ocorreu antes daquela provocada pelo aumento do Ca^{2+} no meio, o que os levou a sugerir que o estímulo secretório não seria consequência de um aumento do influxo de Ca^{2+} , mas sim, de uma mobilização desse cátion a partir de compartimentos intracelulares. Nesse sentido, então, a inobservância, no nosso trabalho, de qualquer efeito da gentamicina sobre a secreção provocada por aumento de K^+ extracelular, indicaria, apenas, que esse antibiótico não interferiu na referida mobilização interna de Ca^{2+} .

Uma evidência indireta, também contrária à idéia de atuação desses antibióticos sobre os canais de Ca^{2+} *voltagem*-dependentes, reside na nossa constatação de que eles não interferiram na atividade secretória provocada pela combinação de Ba^{2+} e teofilina (Fig. 17). Considere-se que a entrada do Ba^{2+} na célula beta, provavelmente, ocorre através de um canal de Ca^{2+} *voltagem*-dependente, bloqueável pelo verapamil (SOMERS *et alii*, 1976b²⁶¹), e que teofilina, na ausência de Ba^{2+} , não provoca secreção (SOMERS *et alii*, 1976b²⁶¹).

Fica, assim, a possibilidade de uma ação desses antibióticos a nível do sistema ionoforético nativo da membrana celular, à semelhança do proposto por MALAISSE, DEVIS & SOMERS (1977¹⁹³) para explicar os efeitos provocados pelo verapamil em membranas artificiais.

Uma explicação alternativa para os efeitos dos antagonistas orgânicos do Ca^{2+} foi elaborada por CHURCH & ZSOTÉR (1980³⁵), a partir de dados sobre o efeito dessas drogas na captação e efluxo de ^{45}Ca , em coração e vasos sanguíneos de coelho. Eles sugerem que esses antagonistas atuam por outros mecanismos, que não através da inibição do fluxo transmembranar de Ca^{2+} , e sim, provavelmente, sobre a liberação e ligação do Ca^{2+} por reservatórios intracelulares. Na verdade, essa hipótese não fora descartada por DEVIS *et alii* (1975⁵³), quando analisaram os efeitos provocados pelo verapamil em ilhotas de Langerhans isoladas.

Finalmente, a verificação de que gentamicina (10^{-3}M) também inibiu significativamente a secreção de insulina, na ausência de glucose (Fig. 14), quando os canais de Ca^{2+} *voltagem-dependentes* estariam inativos, é mais uma evidência de que os antibióticos utilizados não atuam sobre esses canais.

4.3.5. CORRELAÇÃO ENTRE SECREÇÃO DE INSULINA E INCORPORAÇÃO DE CÁLCIO (^{45}Ca)

Uma característica correlação entre secreção de insulina e incorporação de Ca^{2+} foi obtida (Fig. 19), notando-se que a atividade secretória conserva-se em níveis basais até que tenha ocorrido uma incorporação superior a 50 % (em relação ao referencial, no caso, os valores verificados com 16,7 mM de glucose), a partir da qual a secreção aumenta progressivamente com a quantidade de Ca^{2+} incorporado. Esse resultado concorda amplamente com o obtido por MALAISSE-LAGAE & MALAISSE (1971)²¹⁰, MALAISSE (1972¹⁷³), MALAISSE *et alii* (1972¹⁹⁵), HENQUIN & LAMBERT

(1975¹¹⁴), MALAISSE *et alii* (1976a¹⁹⁶, e²⁰³) e MALAISSE *et alii* (1979c²⁰⁷).

4.3.6. INIBIÇÃO SECRETÓRIA EM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DE GLUCOSE

Visando determinar se o efeito inibitório dos antibióticos utilizados se manifestaria, também, em outras concentrações de glucose, foram feitas incubações em meio contendo quatro diferentes níveis daquele secretagogo, na ausência ou presença de 10^{-3} M de gentamicina.

Os resultados, apresentados na figura 14, evidenciam uma ação do antibiótico ao longo de toda a faixa de concentrações de glucose empregada, realçando, porém, uma inibição mais pronunciada da secreção de insulina nas concentrações mais elevadas da hexose. Essa verificação se harmoniza perfeitamente com os resultados dispostos na figura 19, onde se observa que, nas condições de elevada secreção de insulina, uma redução relativamente pequena da incorporação de cálcio pode inibir acentuadamente a atividade secretória, o oposto sendo observado nos níveis de menor secreção. Esses dados, em conjunto, são coerentes com a verificação de que a sisomicina (10^{-3} M) inibiu percentualmente mais a incorporação basal de cálcio, comparada à obtida com 16,7 mM de glucose (Fig. 18).

4.3.7. AUSÊNCIA DE EFEITO SOBRE A SECREÇÃO PROVOCA- DA POR Ba^{2+} E TEOFILINA

Tendo constatado a ação de antibióticos aminoglicosídicos sobre a secreção de insulina e sua interferência no processo de captação de Ca^{2+} , buscamos verificar possíveis efeitos dessas drogas sobre outras etapas envolvidas no processo de secreção de insulina. Assim sendo, abordamos o sistema efector, composto por microtúbulos e microfilamentos, em conexão com a membrana plasmática. Para esse fim, testamos a atividade dos antibióticos sobre a secreção de insulina provocada pela combinação de Ba^{2+} e teofilina (2,0 mM de cada um).

O efeito estimulatório do Ba^{2+} sobre a secreção de insulina foi, inicialmente, demonstrado por MILNER & HALES (1968²²⁰) e HALES & MILNER (1968⁹²), ocorrendo mesmo na ausência de glucose e Ca^{2+} , enquanto a teofilina, embora não estimule *per se* a secreção, potencializa grandemente o processo secretório estimulado por aquele cátion (SOMERS *et alii*, 1976b²⁶¹).

Constatamos que sisomicina e gentamicina (10^{-4} M) não provocaram alteração significativa da secreção de insulina estimulada pela associação de Ba^{2+} e teofilina (Fig. 17), indicando que o sistema efector não é afetado por esses antibióticos. Esse resultado difere do encontrado por SOMERS *et alii* (1976b²⁶¹) e SENER & MALAISSE (1979²⁵³) que, utilizando idêntica preparação, observaram drástica redução secretória, causada pelos antagonistas orgânicos do Ca^{2+} : verapamil e suloctidil. Essa diferença seria explicável pelas evidências de que o Ba^{2+} entra na célula beta através do canal de Ca^{2+} *voltagem - dependente* (SOMERS *et alii*, 1976b²⁶¹), sobre o qual atuariam o verapamil e o suloctidil. Por outro lado, o fato de não termos cons

tatado qualquer efeito inibitório provocado pela gentamicina ou sisomicina está em concordância com a idéia, já discutida, de que esses antibióticos não agiriam a nível do canal de Ca^{2+} voltagem-dependente.

4.4. EVIDÊNCIAS FAVORÁVEIS A UMA AUSÊNCIA DE AÇÃO DA SISOMICINA E DA GENTAMICINA SOBRE O RECONHECIMENTO DA GLUCOSE PELA CÉLULA BETA

Três evidências contrárias a uma possível interferência dos antibióticos estudados, sobre o processo de reconhecimento da glucose pela célula beta, emergiram dos experimentos realizados. Primeiramente, observamos que a gentamicina (10^{-3} M) inibiu significativamente (35 %, $p < 0,05$) a secreção de insulina, mesmo na ausência de glucose (Fig. 14). Fato idêntico foi observado por HENQUIN & LAMBERT (1975¹¹⁴), usando Co^{2+} , sendo interpretado como sugestivo da existência de um mecanismo regulador da secreção basal de insulina. Uma segunda evidência deriva da constatação de que a sisomicina (10^{-3} M) não inibiu totalmente o efeito estimulatório da glucose (16,7 mM) sobre a incorporação de Ca^{2+} (Fig. 18), quando é conhecido que esse efeito depende do metabolismo da glucose pela célula beta (MALAISSE-LAGAE & MALAISSE, 1971²¹⁰). Verificamos que, nessas condições, a incorporação passou de $2,02 \pm 0,192$ para $7,00 \pm 0,582$ pmol/ilhota por 90 min. Estes resultados são concordantes com os relatados por MALAISSE *et alii* (1976a¹⁹⁶, b¹⁹⁷, e²⁰³), MALAISSE (1977¹⁷⁸), MALAISSE & BOSCHERO (1977¹⁸³) e MALAISSE *et alii* (1977²⁰⁰), que empregaram antagonistas orgânicos e inorgânicos de Ca^{2+} .

Finalmente, pôde-se constatar que a presença de 10^{-3} M de gentamicina não impediu totalmente o efeito estimulatório da glucose sobre a secreção de insulina.

Essas evidências estão em acordo com observações recentes, efetuadas em nosso laboratório, quando se constatou, em ilhotas isoladas, que a tobramicina (10^{-3} M) não impediu o efeito inibitório da glucose (16,7 mM) sobre o efluxo do ^{45}Ca (dados não publicados). Esse efeito, possivelmente, depende do metabolismo da glucose pela célula beta (MALAISSE *et alii*, 1979a²⁰¹).

Com base nos experimentos executados, não podemos afastar a hipótese de uma ação intracelular dos antibióticos utilizados. Entretanto, esse tipo de ação, segundo WRIGHT & COLLIER (1977²⁸⁴), é improvável, por se tratarem os referidos antibióticos de bases orgânicas policatiônicas, altamente polares e pouco difusíveis. Evidências contrárias a esse tipo de ação foram obtidas por esses mesmos autores, ao constatarem que a ação da neomicina em gânglio autonômico e junção neuromuscular se processa prontamente e é rapidamente reversível.

4.5. IMPROVÁVEL AÇÃO DA SISOMICINA E GENTAMICINA SOBRE A INSULINOGENESE

Com base nos experimentos efetivados, não podemos descartar a possibilidade dos antibióticos usados afetarem a síntese de insulina. Entretanto, diante de resultados obtidos por vários autores, torna-se bastante inviável que uma possível redução da síntese justifique os efeitos inibitórios observados. Assim, tem-se constatado que ilhotas incubadas por 60

min , em meio contendo até 16,7 mM de glucose, secretam, no máximo, 5 % do seu conteúdo de insulina estocada (MALAISSE, MALAISSE-LAGAE & KING, 1968¹⁸⁸). Igualmente, verificou-se que a secreção de insulina, estimulada por 5,5 mM de glucose durante 2 h, foi normal, apesar de se ter bloqueado a síntese protéica com dinitrofenol (GRODSKY & BENNETT, 1963⁸⁵). Resultados comparáveis foram encontrados por SANDO, BORG & STEINER (1972²⁴⁸). Estes autores observaram que aproximadamente 90 % da insulina secretada durante 3 h, por ilhotas isoladas de rato, é derivada de estoques granulares pré-existent. Finalmente, HOWELL & TAYLOR (1967¹²⁸) concluem não haver secreção de insulina recém-sintetizada, em resposta à glucose, durante a primeira hora após a síntese.

RESUMO E CONCLUSÕES

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho, propôs-se estudar os possíveis efeitos inibitórios de antibióticos da família da gentamicina sobre a secreção de insulina, bem como elucidar os mecanismos envolvidos nessa inibição.

Numa etapa preliminar, validou-se um radioimunoensaio (RIE-PEG) para dosagem de insulina de rato secretada *in vitro*. Para esse fim, após titulação do anticorpo e determinação da sua constante de associação e capacidade ligante, foram executadas a *prova da diluição* e ensaios comparativos entre as insulinas murina, bovina e porcina, com o objetivo de verificar a identidade imunoquímica entre essas insulinas. Constatada a falta dessa identidade, ao se comparar insulina de rato com insulina de boi ou porco, optou-se pela execução e emprego, em cada RIE-PEG, de uma *curva de equivalência*, a fim de se ajustar os dados obtidos em curvas de insulina bovina.

Finalmente, foi determinada a precisão intra-ensaio de um RIE-PEG executado em condições de rotina.

Os resultados obtidos na validação do RIE-PEG permitiram concluir-se que:

As insulinas bovina e porcina não são referenciais adequados para radioimunoensaios de insulina murina.

O uso de uma *curva de equivalência*, para o ajuste de valores lidos em curva de insulina bovina, possibilita, ao menos, a obtenção de resultados qualitativamente corretos.

Uma dispersão relativamente elevada nas dosagens deve-se, ao menos em parte, à baixa especificidade (por insulina de rato) do anticorpo utilizado.

Uma vez validado o RIE-PEG, passou-se a estudar os efeitos dos antibióticos sisomicina e gentamicina sobre a secreção de insulina e incorporação de cálcio (^{45}Ca).

Para o estudo da secreção de insulina, utilizaram-se ilhotas isoladas de pâncreas de rato, pela técnica da colagenase, e incubadas em KREBS (90 min, 37°C) em condições estáticas.

A medida da incorporação de cálcio foi feita em idêntica preparação experimental, adicionando-se ^{45}Ca ao KREBS e incubando-se a 37°C por 90 min.

Os antibióticos sisomicina e gentamicina, nas concentrações entre 10^{-6} e 10^{-3} M, inibiram, de maneira dose-dependente, a secreção de insulina provocada por glucose. O efeito inibitório da gentamicina manifestou-se em todas as concentrações utilizadas de glucose (entre 5,5 e 16,7 mM) e, inclusive, na ausência desse secretagogo.

O aumento da concentração extracelular de Ca^{2+} antagonizou o efeito inibitório da sisomicina sobre a secreção.

Sisomicina e gentamicina não reduziram a secreção provocada pela combinação de Ba^{2+} e teofilina.

Gentamicina não reduziu a secreção provocada por elevada concentração extracelular de K^{+} .

Sisomicina inibiu a incorporação de cálcio (^{45}Ca), tanto em presença quanto na ausência de glucose.

Os resultados permitiram concluir-se que:

Sisomicina e gentamicina inibem a secreção de in sulina através de uma competição com íons Ca^{2+} , provavelmente, a nível da membrana plasmática da célula beta, semelhantemente aos seus efeitos relatados para outras estruturas excitáveis.

É improvável que o efeito inibitório decorra de uma atuação dos antibióticos a nível dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes.

O processo de reconhecimento celular da glucose, aparentemente, não é afetado em grau significativo pelos antibióticos utilizados.

O efeito inibitório dos antibióticos estudados, sobre a secreção de insulina, não decorre de uma ação a nível do sistema efector.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, H.R. Cardiovascular depressant effects of neomycin and gentamicin in rhesus monkeys. *Brit. J. Pharmacol.*, 54:453-62, 1975a.
2. ———. Cardiovascular depressant effects of the neomycin-streptomycin group of antibiotics. *Amer. J. vet. Res.*, 36:103-8, 1975b.
3. ———. Direct myocardial depressant effects of gentamicin. *Europ. J. Pharmacol.*, 30:272-9, 1975c.
4. ———. Antibiotic-induced alterations of cardiovascular reactivity. *Fed. Proc.*, 35:1148-50, 1976.
5. ———. & GOODMAN, F.R. Differential inhibitory effect of neomycin on contractile responses of various canine arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 193:393-402, 1975.
6. ———. & DURRETT, L.R. Gentamicin blockade of slow Ca^{++} channels in atrial myocardium of guinea pigs. *J. clin. Invest.*, 62:241-7, 1978.
7. ———.; GOODMAN, F.R. & WEISS, G.B. Alteration of contractile function and calcium ion movements in vascular smooth muscle by gentamicin and other aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 5:640-6, 1974.
8. ———.; MATHEW, B.P.; TESKE, R.H. & MERCER, H.D. Neuro muscular blocking effects of aminoglycoside antibiotics on fast-and slow-contracting muscles of the cat. *Anesth. & Analg.*, 55:500-7, 1976.
9. ALBIERO, L.; BAMONTE, F.; ONGINI, E. & PARRAVICINI, L. Comparison of neuromuscular effects and acute toxicity of some aminoglycoside antibiotics. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 233:343-50, 1978.

10. ALKADHI, K.A. & McISAAC, R.J. Ganglion blocking effects of streptomycin. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 232:58-67, 1978.
11. ALTINKURT, O. & KANZIK, I. Inhibitory effects of streptomycin on bronchoconstrictor, hypotensive and inflammatory responses to bradykinin and histamine. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 246:277-85, 1980.
12. AMEND Jr., W.J.C.; STEINBERG, S.M.; LOWRIE, E.G.; LAZARUS, J.M.; SOELDNER, J.S.; HAMPERS, C.L. & MERRILL, J. P. The influence of serum calcium and parathyroid hormone upon glucose metabolism in uremia. *J. Lab. clin. Med.*, 86:435-44, 1975.
13. ASHCROFT, S.J.H.; BASSETT, J.M. & RANDLE, P.J. Insulin secretion mechanisms and glucose metabolism in isolated islets. *Diabetes*, 21 (Suppl. 2):538-45, 1972.
14. ———.; WEERASINGHE, L.C.C. & RANDLE, P.J. Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release. *Biochem. J.*, 132:223-31, 1973.
15. ———.; ———.; BASSETT, J.M. & RANDLE, P.J. The pentose cycle and insulin release in mouse pancreatic islets. *Biochem. J.*, 126:525-32, 1972.
16. ATKINS, T. & MATTY, A.J. Metabolic viability of freehand microdissected and collagenase-isolated islets of Langerhans. *J. Endocrin.*, 46:XVII-XVIII, 1970.
17. ATWATER, I. & BEIGELMAN, P.M. Dynamic characteristics of electrical activity in pancreatic β -cells I. Effects of calcium and magnesium removal. *J. Physiol.*, Paris, 72:769-86, 1976.
18. ———.; RIBALET, B. & ROJAS, E. Cyclic changes in potential and resistance of the β -cell membrane induced by glucose in islets of Langerhans from mouse. *J. Physiol.*, 278:117-39, 1978.

19. ATWATER, I.; DAWSON, C.M.; RIBALET, B. & ROJAS, E. Potassium permeability activated by intracellular calcium ion concentration in the pancreatic β -cell. *J. Physiol.*, 288:575-88, 1979.
20. BAHN, A.K. *Basic medical statistics*. New York, Grune & Stratton, 1972. p. 136-43.
21. BANSAL, S.; RIZVI, S.N.A.; RAO, M.B. & VAISHNAVA, H. Effect of hypocalcaemia on glucose tolerance, insulin release and free fatty acid levels in human subjects. *Post. Grad. med. J.*, 51:471-5, 1975.
22. BEIGELMAN, P.M.; THOMAS, L.J.; SHU, M.J. & BESSMAN, S. P. Insulin from individual isolated islets of Langerhans 2. Effect of glucose in varying concentrations. *J. Physiol.*, Paris, 72:721-8, 1976.
23. BENNETT, L.L.; CURRY, D.L. & GRODSKY, G.M. Calcium-magnesium antagonism in insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology*, 85:594-6, 1969.
24. BENZI, G.; ARRIGONI, E.; MANZO, L. & DE BERNARDI, M. Action of antibiotics on respiratory tract — VII: Aminosidin. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 194:233-7, 1971.
25. BERSON, S.A. & YALOW, R.S. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. *J. clin. Invest.*, 38:1996-2016, 1959.
26. ———. & ———. General methodology. In: YALOW, R. S. *Methods in radioimmunoassay of peptide hormones*. Amsterdam, North-Holland, 1976. p. 1-36.
27. BIRMINGHAM, M.K.; ELLIOTT, F.H. & VALÈRE, P.H.-L. The need for the presence of calcium for the stimulation *in vitro* of rat adrenal glands by adrenocorticotrophic hormone. *Endocrinology*, 53:687-9, 1953.

28. BLOOM, G.D.; HELLMAN, B.; SEHLIN, J. & TÄLJEDAL, I.-B. Glucose-stimulated and La^{3+} -nondisplaceable Ca^{++} pool in pancreatic islets. *Amer. J. Physiol.*, 232:E114-E118, 1977.
29. BOSCHERO, A.C.; DELATTRE, E. & SANTOS, M.L. Isolamento de ilhotas de Langerhans de rato. {Apresentado ao 12º Congresso Brasileiro de Fisiologia, Ribeirão Preto, 1980}.
30. ———.; KAWAZU, S.; DUNCAN, G. & MALAISSE, W.J. Effect of glucose on K^+ handling by pancreatic islets. *FEBS Letters*, 83:151-4, 1977.
31. BRISSON, G.R. & MALAISSE, W.J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XI. Effects of theophylline and epinephrine on ^{45}Ca efflux from perfused islets. *Metabolism*, 22:455-65, 1973.
32. ———.; MALAISSE-LAGAE, F. & MALAISSE, W.J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release VII. A proposed site of action for adenosine-3', 5'-cyclic monophosphate. *J. clin. Invest.*, 51:232-41, 1972.
33. CHARLES, M.A.; LAWECKI, J.; PICTET, R. & GRODSKY, G. M. Insulin secretion - Interrelationships of glucose, cyclic adenosine 3':5'-monophosphate, and calcium. *J. biol. Chem.*, 250:6134-40, 1975.
34. ———.; FANSKA, R.; SCHMID, F.G.; FORSHAM, P. H. & GRODSKY, G.M. Adenosine 3',5' - monophosphate in pancreatic islets : glucose-induced insulin release. *Science*, 179:569-71, 1973.
35. CHURCH, J. & ZSOTÉR, T.T. Calcium antagonistic drugs. Mechanism of action. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, 58 254-64, 1980.

36. COHEN, L.S.; WECHSLER, A.S.; MITCHELL, J.H. & GLICK, G.
Depression of cardiac function by streptomycin and other
antimicrobial agents. *Amer. J. Cardiol.*, 26:505-11, 1970.
37. COLL-GARCIA, E. & GILL, J.R. Insulin release by isolated
pancreatic islets of the mouse incubated *in vitro*.
Diabetologia, 5:61-6, 1969.
38. COORE, H.G. & RANDLE, P.J. Regulation of insulin secre-
tion studied with pieces of rabbit pancreas incubated
in vitro. *Biochem. J.*, 93:66-78, 1964.
39. CORRADO, A.P. Ganglioplegic action of streptomycin.
Arch. int. Pharmacodyn., 114:166-78, 1958.
40. _____. & RAMOS, A.O. Neomycin — its curariform and
ganglioplegic actions. *Rev. bras. Biol.*, 18:81-5, 1958.
41. _____. & _____. Some pharmacological aspects of
a new antibiotic — kanamycin. *Rev. bras. Biol.*, 20 :
43-50, 1960.
42. _____.; _____. & DE ESCOBAR, C.T. Neuro-muscular
blockade by neomycin potentiation by ether anesthesia
and d-tubocurarine and antagonism by calcium and
prostigmine. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 121:380-94, 1959.
43. _____.; PRADO, W.A. & PIMENTA DE MORAIS, I. Competitive
antagonism between calcium and aminoglycoside antibiotics
in skeletal and smooth muscles. In: ROCHA E SILVA, M.
& SUAREZ-KURTZ, G. *Concepts of membranes in regulation
and excitation*. New York, Raven Press, 1975. p. 201
-15.
44. CURRY, D.L.; BENNETT, L.L. & GRODSKY, G.M. Dynamics of
insulin secretion by the perfused rat pancreas.
Endocrinology, 83:572-84, 1968a.
45. _____.; _____. & _____. Multiphasic insulin se-
cretion by the isolated perfused rat pancreas.
Fed. Proc., 27:496, 1968b. (Abstract).

46. CURRY, D.L.; BENNETT, L.L. & GRODSKY, G.M. Requirement for calcium ion in insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Amer. J. Physiol.*, 214:174-8, 1968c.
47. DAVIS, B. & LAZARUS, N.R. An *in vitro* system for studying insulin release caused by secretory granules - plasma membrane interaction : definition of the system. *J. Physiol.*, 256:709-29, 1976.
48. _____ & _____. An *in vitro* system for studying insulin release: effects of glucose and glucose -6-phosphate. *J. Physiol.*, 271:273-88, 1977.
49. DELATTRE, E. & BOSCHERO, A.C. Secreção *in vitro* de insulina de rato - aspectos da validação do radioimunoensaio (RIE). {Apresentado ao 14º Congresso Latinoamericano de Ciências Fisiológicas, São Paulo, 1981.}
50. DESBUQUOIS, B. & AURBACH, G.D. Use of polyethylene-glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. *J. clin. Endocrin. Metabol.*, 33: 732-8, 1971.
51. DEVIS, G.; SOMERS, G. & MALAISSE, W.J. Stimulation of insulin release by calcium. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 67:525-9, 1975.
52. _____.; _____ & _____. Dynamics of calcium-induced insulin release. *Diabetologia*, 13:531-6, 1977.
53. _____.; _____.; VAN OBBERGHEN, E. & MALAISSE, W.J. Calcium antagonists and islet function I. Inhibition of insulin release by verapamil. *Diabetes*, 24:547-51, 1975.
54. _____.; VAN OBBERGHEN, E.; SOMERS, G.; MALAISSE-LAGAE, F.; ORCI, L. & MALAISSE, W.J. Dynamics of insulin release and microtubular-microfilamentous system II. Effect of vincristine. *Diabetologia*, 10:53-9, 1974.

55. DIECKE, F.P.J.; WESTECKER, M.E. & VOGT, R. The effect of streptomycin on sodium and potassium currents in myelinated nerve. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 193:5-13, 1971.
56. DONATSCH, P.; LOWE, D.A.; RICHARDSON, B.P. & TAYLOR, P. The functional significance of sodium channels in pancreatic beta-cell membranes. *J. Physiol.*, 267:357-76, 1977.
57. DORMER, R.L.; KERBEY, A.L.; McPHERSON, M.; MANLEY, S.; ASHCROFT, S.J.H.; SCHOFIELD, J.G. & RANDLE, P.J. The effect of nickel on secretory systems.-Studies on the release of amylase, insulin and growth hormone. *Biochem. J.*, 140:135-42, 1973.
58. DOUGLAS, W.W. Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Brit. J. Pharmacol.*, 34:451-74, 1968.
59. DRETCHEN, K.L.; GERGIS, S.D.; SOKOLL, M.D. & LONG, J. P. Effect of various antibiotics on neuromuscular transmission. *Europ. J. Pharmacol.*, 18:201-3, 1972.
60. ———.; SOKOLL, M.D.; GERGIS, S.D. & LONG, J.P. Relative effects of streptomycin on motor nerve terminal and endplate. *Europ. J. Pharmacol.*, 22:10-6, 1973.
61. DUNKLEY, B.; SANGHVI, I. & GOLDSTEIN, G. Characterization of neuromuscular block produced by streptomycin. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 201:213-23, 1973.
62. DŽOLJIĆ, M. & ATANACKOVIĆ, D. Action of streptomycin on guinea pig ileum peristalsis. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 156:279-84, 1965.
63. EKINS, R.P. The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. *Clin. Chim. Acta*, 5: 453-9, 1960.

64. ELMQVIST, D. & JOSEFSSON, J.-O. The nature of the neuro muscular block produced by neomycine. *Acta physiol. Scand.*, 54:105-10, 1962.
65. FELDMAN, J.M. Species variation in the islets of Langerhans. *Diabetologia*, 16:1-4, 1979.
66. ———.; QUICKEL Jr., K.E. & LEOVITZ, H.E. Potentiation of insulin secretion *in vitro* by serotonin antagonists. *Diabetes*, 21:779-88, 1972.
67. FLECKENSTEIN, A. Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers and vascular smooth muscle. *Annu. Rev. pharmacol. Toxicol.*, 17:149-66, 1977.
68. FRANKEL, B.J.; KROMHOUT, J.A.; IMAGAWA, W.; LANDAHL, H.D. & GRODSKY, G.M. Glucose-stimulated ^{45}Ca uptake in isolated rat islets. *Diabetes*, 27:365-9, 1978.
69. FUJIMOTO, W.Y. & ENSINCK, J.W. Somatostatin inhibition of insulin and glucagon secretion in rat islet culture: Reversal by ionophore A23187. *Endocrinology*, 98: 259-62, 1976.
70. FUJITA, T.; SAKAGAMI, Y.; TOMITA, T.; OKAMOTO, Y. & OKU, H. Insulin secretion after oral calcium load. *Endocrin. Jap.*, 25:645-8, 1978.
71. GAGLIARDINO, J.J. & MARTIN, J.M. Studies on the mechanism of insulin release. *Metabolism*, 15:1068-75, 1966.
72. GEDIK, O. & ZILELI, M.S. Effects of hypocalcemia and theophylline on glucose tolerance and insulin release in human beings. *Diabetes*, 26:813-9, 1977.
73. ———.; AKALIN, S. & KORAY, Z. Effect of acute hypercalcaemia on glucose tolerance and insulin release in human beings. *Acta endocr.*, Copenhagen, 94:196-200, 1980.

74. GERŐ, L.; BARANYI, É.; STECZEK, K.; PETRÁNYI Jr., Gy. & TAMÁS Jr., Gy. Potentiation of glibenclamide-induced insulin release by calcium infusion. *Diabetologia*, 13: 351-4, 1977.
75. GLASBY, J.S. *Encyclopaedia of antibiotics*. London, Wiley, 1976. p. 177-9.
76. GOLDMAN, J.; BALDWIN, D.; PUGH, W. & RUBENSTEIN, A. H. Equilibrium binding assay and kinetic characterization of insulin antibodies. *Diabetes*, 27:653-60, 1978.
77. GOMEZ, M. & CURRY, D.L. Potassium stimulation of insulin release by the perfused rat pancreas. *Endocrinology*, 92:1126-34, 1973.
78. GOODMAN, F.R. & ADAMS, H.R. Contractile function and ^{45}Ca movements in vascular smooth muscle of nonhuman primates: effects of aminoglycoside antibiotics. *Gen. Pharmacol.*, 7:227-32, 1976.
79. ———.; WEISS, G.B. & ADAMS, H.R. Alterations by neomycin of ^{45}Ca movements and contractile responses in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 188: 472-80, 1974.
80. GREEN, I.C. & TAYLOR, K.W. Effects of pregnancy in the rat on the size and insulin secretory response of the islets of Langerhans. *J. Endocrin.*, 54:317-25, 1972.
81. GREENWOOD, F.C.; HUNTER, W.M. & GLOVER, J.S. The preparation of ^{131}I -labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, 89:114-23, 1963.
82. GRIFFEY, M.A.; CONAWAY, H.H. & WHITNEY, J.E. Insulin secretion induced by Na^+ deprivation. *Endocrinology*, 95:1469-72, 1974.
83. GRILL, V. & CERASI, E. Stimulation by D-glucose of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate accumulation and insulin release in isolated pancreatic islets of the rat. *J. biol. Chem.*, 249:4196-201, 1974.

84. GRODSKY, G.M. Insulin and the pancreas. *Vitam. & Horm.*
- *Advanc. Res. Appl.*, 28:37-101, 1970.
85. ———. & BENNETT, L.L. Insulin secretion from the
isolated pancreas in absence of insulinogenesis: Effect
of glucose. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 114:769-71, 1963.
86. ———. & ———. Cation requirements for insulin
secretion in the isolated perfused pancreas. *Diabetes*,
15:910-3, 1966.
87. ———.; ———.; SMITH, D.F. & SCHMID, F.G. Effe-
ct of pulse administration of glucose or glucagon on in-
sulin secretion *in vitro*. *Metabolism*, 16:222-33, 1967.
88. ———.; BATTS, A.A.; BENNETT, L.L.; VCELLA, C.; McWILLIAMS,
N.B. & SMITH, D.F. Effects of carbohydrates on secret-
ion of insulin from isolated rat pancreas. *Amer. J.*
Physiol., 205:638-44, 1963.
89. GYLFE, E. & HELLMAN, B. Calcium and pancreatic β -cell
function - 2. Mobilisation of glucose-sensitive ^{45}Ca from
perfused islets rich in β -cells. *Biochim. biophys.*
Acta, 538:249-57, 1978.
90. ———.; BUITRAGO, A.; BERGGREN, P.-O.; HAMMARSTROM, K.
& HELLMAN, B. Glucose inhibition of ^{45}Ca efflux from
pancreatic islets. *Amer. J. Physiol.*, 235:E191 - E196,
1978.
91. HAHN, H.-J.; ZIEGLER, M.; JAHR, H.; BUTTER, R.; KOHNERT,
K.D. Investigations on isolated islets of Langerhans
in vitro XIII. Experiments concerning the preparation
conditions with collagenase. *Endokrinologie*, 67:67-78.
1976.
92. HALES, C.N. & MILNER, R.D.G. Cations and the secretion of
insulin from rabbit pancreas *in vitro*. *J. Physiol.*,
199:177-87, 1968.

93. HALES, C.N.; CAMPBELL, A.K.; LUZIO, J.P. & SIDDLE, K.
Calcium as a mediator of hormone action. *Biochem. Soc. Trans.*, 5:866-71, 1977.
94. 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.
95. HARTER, H.R.; SANTIAGO, J.V.; RUTHERFORD, W.E.; SLATOPOLSKY, E. & KLAHR, S. The relative roles of calcium, phosphorus, and parathyroid hormone in glucose-and tolbutamide-mediated insulin release. *J. clin. Invest.*, 58:359-67, 1976.
96. HEDESKOV, C.J. Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiol. Rev.*, 60:442-509, 1980.
97. HELLERSTRÖM, C. A method for the microdissection of intact pancreatic islets of mammals. *Acta endocr. Copenhagen*, 45:122-32, 1964.
98. HELLMAN, B. Methodological approaches to studies on the pancreatic islets. *Diabetologia*, 6:110-20, 1970.
99. _____. The significance of calcium for glucose stimulation of insulin release. *Endocrinology*, 97:392-8, 1975.
100. _____. Stimulation of insulin release after raising extracellular calcium. *FEBS Letters*, 63:125-8, 1976.
101. _____. Calcium and pancreatic β -cell function I. Stimulatory effects of pentobarbital on insulin release. *Biochim. biophys. Acta*, 497:766-74, 1977.
102. _____. & GYLFE, E. Calcium and pancreatic β -cell function: glucose stimulation of uptake of lanthanum-displaceable ^{45}Ca from low or normal calcium-containing media. *Horm. metabol. Res.*, 10:29-31, 1978.

103. HELLMAN, B.; SEHLIN, J. & TÄLJEDAL, I.-B. Effects of glucose on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by pancreatic islets as studied with the lanthanum method. *J. Physiol.*, 254: 639-56, 1976a.
104. _____.; _____ & _____. Calcium and secretion: distinction between two pools of glucose-sensitive calcium in pancreatic islets. *Science*, 194: 1421-3, 1976 b.
105. _____.; _____ & _____. Effects of Na^+ , K^+ and Mg^{2+} on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by pancreatic islets. *Pflüg. Arch.*, 378:93-7, 1978.
106. _____.; LERNMARK, Å.; SEHLIN, J. & TÄLJEDAL, I.-B. The pancreatic β -cell recognition of insulin secretagogues. V. Binding and stimulatory action of phlorizin. *Molec. Pharmacol.*, 8:759-69, 1972.
107. _____.; LENZEN, S.; SEHLIN, J. & TÄLJEDAL, I.-B. Effects of various modifiers of insulin release on the lanthanum-nondisplaceable $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by isolated pancreatic islets. *Diabetologia*, 13:49-53, 1977.
108. _____.; IDAHL, L.-Å.; LENZEN, S.; SEHLIN, J. & TÄLJEDAL, I.-B. Further studies on the relationship between insulin release and lanthanum-nondisplaceable $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by pancreatic islets: effects of fructose and starvation. *Endocrinology*, 102:1856-63, 1978.
109. HENQUIN, J.-C. D-glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islet cells. *Nature*, 271:271-3, 1978a.
110. _____. Relative importance of extracellular and intracellular calcium for the two phases of glucose-stimulated insulin release : studies with theophylline. *Endocrinology*, 102:723-30, 1978b.
111. _____. The stimulus secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXVII. Effect of glucose on K^+ fluxes in isolated islets. *Pflüg. Arch.*, 373:237-42, 1978c.

112. HENQUIN, J.-C. Opposite effects of intracellular Ca^{2+} and glucose on K^+ permeability of pancreatic islet cells. *Nature*, 280:66-8, 1979.
113. ———. & LAMBERT, A.E. Cationic environment and dynamics of insulin secretion—II. Effect of a high concentration of potassium. *Diabetes*, 23:933-42, 1974.
114. ———. & ———. Cobalt inhibition of insulin secretion and calcium uptake by isolated rat islets. *Amer. J. Physiol.*, 228:1669-77, 1975.
115. HERCHUELZ, A. & MALAISSE, W.J. The dual action of glucose on calcium movements in the B-cell : cause or consequence of insulin release? *Diabetologia*, 13 : 401, 1977. (Abstract).
116. ———. & ———. Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets : dissociation between calcium and insulin release. *J. Physiol.*, 283:409-24, 1978.
117. ———. & ———. Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: two calcium movements' dissociated response to glucose. *Amer. J. Physiol.*, 238:E87-E95, 1980a.
118. ———. & ———. Regulation of calcium fluxes in rat pancreatic islets : dissimilar effects of glucose and of sodium ion accumulation. *J. Physiol.*, 302:263-80, 1980b.
119. ———.; COUTURIER, E. & MALAISSE, W.J. Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets : glucose - induced calcium-calcium exchange. *Amer. J. Physiol.*, 238:E96-E103, 1980.
120. ———.; LEBRUN, P. & MALAISSE, W.J. Calcium fluxes in the process of glucose-induced insulin release. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 246:173-4, 1980.

121. HERCHUELZ, A.; THONNART, N.; SENER, A. & MALAISSE, W.J.
Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: The
role of membrane depolarization. *Endocrinology*, 107:
491-7, 1980a.
122. ———.; ———.; CARPINELLI, A.; SENER, A. & MALAISSE,
W.J. Regulation of calcium fluxes in rat pancreatic
islets: The role of K^+ conductance. *J. Pharmacol. Exp.*
Ther., 215:213-20, 1980b.
123. HERMAN, L.; SATO, T. & HALES, C.N. The electron micro-
scopic localization of cations to pancreatic islets of
Langerhans and their possible role in insulin release.
J. Ultrastruct. Res., 42:298-311, 1973.
124. HIMORI, N.; ONO, H. & TAIRA, N. Dual effects of a new
coronary vasodilator, diltiazem, on the contractile
force of the blood-perfused papillary muscle of the
dog. *Jap. J. Pharmacol.*, 25:350-2, 1975.
125. HOKKANEN, E. The aggravating effect of some antibiotics
on the neuromuscular blockade in myasthenia gravis.
Acta neurol. scand., 40:346-52, 1964.
126. HOLLANDE, E.; GIRON, B.J.; REYT, F. & DUTRILLAUX, M. -C.
Insulin secretion by human pancreas cultured for one
year. *J. Physiol.*, Paris, 72:815-32, 1976.
127. HOWELL, S.L. Intracellular localization of calcium in
pancreatic B-cells. *Biochem. Soc. Trans.*, 5: 875-9,
1977.
128. ———. & TAYLOR, K.W. The secretion of newly syn-
thesized insulin *in vitro*. *Biochem. J.*, 102: 922-7,
1967.
129. ———. & ———. Potassium ions and the secretion
of insulin by islets of Langerhans incubated *in vitro*.
Biochem. J., 108:17-24, 1968.

130. HOWELL, S.L. & TYHURST, M. ⁴⁵Calcium localization in islets of Langerhans, a study by electron-microscopic autorradiography. *J. cell. Sci.*, 21:415-22, 1976a.
131. ———. & ———. Barium accumulation in rat pancreatic B cells. *J. cell. Sci.*, 22:455-65, 1976b.
132. HUMBEL, R.E.; BOSSHARD, H.R. & ZAHN, H. Chemistry of insulin. In: STEINER, D.F. & FREINKEL, N. eds. *Handbook of Physiology, Endocrinology*. Washington. D.C., Amer. Physiol. Soc., 1972. Sect. 7, v. I, p. 219-35.
133. HUNTER, W.M. & GREENWOOD, F.C. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*, 194:495-6, 1962.
134. HUTTER, O.F. & KOSTIAL, K. Effect of magnesium and calcium ions on the release of acetylcholine. *J. Physiol.*, 124:234-41, 1954.
135. IDAHL, L.-Å. A micro perfusion device for pancreatic islets allowing concomitant recordings of intermediate metabolites and insulin release. *Analyt. Biochem.*, 50:386-98, 1972.
136. ———. Dynamics of pancreatic β -cell responses to glucose. *Diabetologia*, 9:403-12, 1973.
137. ———.; LERNMARK, Å.; SEHLIN, J. & TÄLJEDAL, I.-B. The dynamics of insulin release from mouse pancreatic islet cells in suspension. *Pflüg. Arch.*, 366: 185-8, 1976.
138. ISHIBASHI, F.; SATO, T.; ONARI, K.; TSUBOTA, M. & KAWATE, R. Close interrelationships among glucose oxidation, glucose-induced ⁴⁵Ca uptake and insulin release of presumed pancreatic β -cell mass. *Horm. metabol. Res.*, 12:89-94, 1980.

139. IVERSEN, J. Secretion of glucagon from the isolated, perfused canine pancreas. *J. clin. Invest.*, 50: 2123-36, 1971.
140. ———. & HERMANSEN, K. Calcium, glucose and glucagon release. *Diabetologia*, 13:297-303, 1977.
141. KARAM, J.H. & GRODSKY, G.M. Insulin content of pancreas after sodium fluoroacetate-induced hyperglycemia. *Proc. soc. exp. Biol.*, 109:451-4, 1962.
142. ———.; GRASSO, S.G.; WEGIENKA, L.C.; GRODSKY, G.M. & FORSHAM, P.H. Effect of selected hexoses, of epinephrine and of glucagon on insulin secretion in man. *Diabetes*, 15:571-8, 1966.
143. KEEN, H.; SELLS, R. & JARRETT, R.J. A method for the study of the metabolism of isolated mammalian islets of Langerhans and some preliminary results. *Diabetologia*, 1:28-32. 1965.
144. KIKUCHI, M.; RABINOVITCH, A.; BLACKARD, W.G. & RENOLD, A.E. Perifusion of pancreas fragments. A system for the study of dynamic aspects of insulin secretion. *Diabetes*, 23:550-9, 1974.
145. ———.; WOLLHEIM, C.B.; CUENDET, G.S.; RENOLD, A.E. & SHARP, G.W.G. Studies on the dual effects of glucose on $^{45}\text{Ca}^{++}$ efflux from isolated rat islets. *Endocrinology*, 102:1339-49, 1978.
146. ———.; ———.; SIEGEL, E.G.; RENOLD, A.E. & SHARP, G.W.G. Biphasic insulin release in rat islets of Langerhans and the role of intracellular Ca^{++} stores. *Endocrinology*, 105:1013-9, 1979.
147. KILO, C.; LONG Jr., C.L.; BAILEY, R.M.; KOCH, M.B. & RECANT, L. Studies to determine whether glucose must be metabolized to induce insulin release. *J. clin. Invest.*, 41:1372-3, 1962.

148. KOSTIANOVSKY, M. & LACY, P.E. A method for the isolation of intact islets of Langerhans from the mammalian pancreas. *Fed. Proc.*, 25:377, 1966. (Abstract).
149. ———.; McDANIEL, M.L.; STILL, M.F.; CODILLA, R.C. & LACY, P.E. Monolayer cell culture of adult rat islets of Langerhans. *Diabetologia*, 10:337-44, 1974.
150. KUZUYA, T.; KAJINUMA, H. & IDE, T. Effect of intrapancreatic injection of potassium and calcium on insulin and glucagon secretion in dogs. *Diabetes*, 23: 55-60, 1974.
151. LACY, P.E. Beta cell secretion — from the standpoint of a pathobiologist. *Diabetes*, 19:895-905, 1970.
152. ———. & KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, 16:35-9, 1967.
153. ———. & MALAISSE, W.J. Microtubules and beta cell secretion. *Recent Progr. Hormone Res.*, 29:199-228, 1973.
154. ———.; YOUNG, D.A. & FINK, C.J. Studies on insulin secretion *in vitro* from isolated islets of the rat pancreas. *Endocrinology*, 83:1155-61, 1968.
155. ———.; WALKER, M.M. & FINK, C.J. Perifusion of isolated rat islets *in vitro*—Participation of the microtubular system in the biphasic release of insulin. *Diabetes*, 21:987-98, 1972.
156. ———.; KLEIN, N.J. & FINK, C.J. Effect of cytochalasin B on the biphasic release of insulin in perifused rat islets. *Endocrinology*, 92:1458-68, 1973.
157. ———.; FINKE, E.H. & CODILLA, R.C. Cinemicrographic studies on β granule movement in monolayer culture of islet cells. *Lab. Invest.*, 33:570-6, 1975.

158. LACY, P.E.; HOWELL, S.L.; YOUNG, D.A. & FINK, C.J. New hypothesis of insulin secretion. *Nature*, 219:1177-9, 1968.
159. LAMBERT, A.E. The regulation of insulin secretion. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 75:97-159, 1976.
160. ———. & HENQUIN, J.-C. The use of a divalent metal, cobalt (Co^{++}), to study the role of calcium (Ca^{++}) in immunoreactive insulin (IRI) secretion. *Diabetes*, 23 (Suppl. 1):337, 1974. (Abstract).
161. ———.; ———. & MALVAUX, P. Cationic environment and dynamics of insulin secretion. I. Effect of low concentrations of sodium. *Endocrinology*, 95:1069-77, 1974.
162. ———.; JUNOD, A.; STAUFFACHER, W.; JEANRENAUD, B. & RENOLD, A.E. Organ culture of fetal rat pancreas I. Insulin release induced by caffeine and by sugars and some derivatives. *Biochim. biophys. Acta (Amst)*, 184:529-39, 1969.
163. LAZARUS, N.R.; DAVIS, B. & O'CONNOR, K.J. An approach to a molecular understanding of exocytotic insulin release. *J. Physiol., Paris*, 72:787-94, 1976.
164. LEADERS, F.; PITTINGER, C.B. & LONG, J.P. Some pharmacological properties of selected antibiotics. *Antibiotic. & Chemother.*, 10:503-7, 1960.
165. LEE, C. & DE SILVA, A.J.C. Acute and subchronic neuromuscular blocking characteristics of streptomycin: a comparison with neomycin. *Brit. J. Anaesth.*, 51:431-4, 1979.
166. LENZEN, S. Insulin secretion by isolated perfused rat and mouse pancreas. *Amer. J. Physiol.*, 236: E391-E400, 1979.

167. LERNMARK, Å. Isolated mouse islets as a model for studying insulin release. *Acta diabet. lat.*, 8:649-79, 1971.
168. LEVINE, R. Mechanisms of insulin secretion. *New Engl. J. Med.*, 283:522-6, 1970.
169. LITTLEDIKE, E.T.; WITZEL, D.A. & WHIPP, S.C. Insulin : evidence for inhibition of release in spontaneous hypocalcemia. *Proc. soc. exp. Biol.*, 129:135-9, 1968.
170. LODHI, S.; WEINER, N.D. & SCHACHT, J. Interactions of neomycin with monomolecular films of polyphosphoinositides and other lipids. *Biochim. biophys. Acta*, 557: 1-8, 1979.
171. LOWE, D.A.; RICHARDSON, N.P.; TAYLOR, P. & DONATSCH, P. Increasing intracellular sodium triggers calcium release from bound pools. *Nature*, 260:337-8, 1976.
172. LUNDQUIST, I.; FANSKA, R. & GRODSKY, G. M. Interaction of calcium and glucose on glucagon secretion. *Endocrinology*, 99:1304-12, 1976.
173. MALAISSE, W.J. Role of calcium in insulin secretion. *Israel J. med. Sci.*, 8:244-51; 1972.
174. ———. Insulin secretion : multifactorial regulation for a single process of release. *Diabetologia*, 9:167-73, 1973.
175. ———. Role of cations. In: BORN, G.V.R. *et alii*, eds. *Handbook of Experimental Pharmacology*. New Series. Berlin, Springer-Verlag, 1975. Cap.5, v.32 pt. 2, p. 145-55.
176. ———. Effects of cyclic AMP on B-cell function. In: DUMONT, J.E. & BROWN, B.L. eds. *Eukaryotic cell function and growth*. New York, Plenum, 1976a. p. 633-8.

177. MALAISSE, W.J. Role of microtubules in hormone biosynthesis. In: INTERNATIONAL CONGRESS of ENDOCRINOLOGY, 5., Hamburg, 1976. *Proceedings*. Amsterdam, Excerpta Medica, 1976b. v. 2, p. 61-3. (Series 403 - Endocrinology).
178. _____. Calcium-antagonists and islet function. X. Effect of suloctidil. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 228:339-44, 1977.
179. _____. Protective effect of calcium against the verapamil-induced inhibition of ionophore-mediated calcium translocation. *Experientia*, 35:1578-9, 1979.
180. _____. & MALAISSE-LAGAE, F. Stimulation of insulin secretion by noncarbohydrate metabolites. *J. Lab. clin. Med.*, 72:438-48, 1968.
181. _____. & _____. A possible role for calcium in the stimulus-secretion coupling for glucose-induced insulin secretion. *Acta diabet. lat.*, 7 (Suppl. 1):264-75, 1970.
182. _____. & PIPELEERS, D.G. The role of cations in insulin synthesis and release. In: CONGRESS of the INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 8., Brussels, 1973. *Proceedings*. Amsterdam, Excerpta Médica, 1973. p. 95-103. (Series 312 - Diabetes).
183. _____. & BOSCHERO, A.C. Calcium antagonists and islet function XI. Effect of nifedipine. *Hormone Res.*, 8: 203-9, 1977.
184. _____. & ORCI, L. The role of the cytoskeleton in pancreatic B-cell function. *Meth. Ach. exp. Pathol.*, 9:112-36, 1979.
185. _____. & _____. Single and chain release of insulin secretory granules is related to anionic transport at exocytotic sites. *Diabetes*, 29:943-4, 1980.

186. MALAISSE, W.J.; MALAISSE-LAGAE, F. & MAYHEW, D. A possible role for the adenylcyclase system in insulin secretion. *J. clin. Invest.*, 46:1724-34, 1967.
187. _____.; _____.& WRIGHT, P.H. A new method for the measurement *in vitro* of pancreatic insulin secretion. *Endocrinology*, 80:99-108, 1967.
188. _____.; _____.& KING, S. Quantitative and qualitative aspects of islet function in the rat. *J. Lab.clin. Med.*, 71:56-64, 1968.
189. _____.; BRISSON, G. & MALAISSE-LAGAE, F. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release I. Interaction of epinephrine and alkaline earth cations. *J. Lab. clin. Med.*, 76:895-902, 1970.
190. _____.; HAGER, D.L. & ORCI, L. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release IX. The participation of the beta cell web. *Diabetes*, 21 (Suppl. 2):594-604, 1972.
191. _____.; BRISSON, G.R. & BAIRD, L.E. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. X. Effect of glucose on ^{45}Ca efflux from perifused islets. *Amer. J. Physiol.*, 224:389-94, 1973.
192. _____.; PIPELEERS, D.G. & MAHY, M. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release XII. Effects of diazoxide and gliclazide upon ^{45}Ca calcium efflux from perifused islets. *Diabetologia*, 9: 1-5, 1973.
193. _____.; DEVIS, G. & SOMERS, G. Inhibition by verapamil of ionophore-mediated calcium translocation. *Experientia*, 33:1035-6. 1977.
194. _____.; MALAISSE-LAGAE, F.; WALKER, M.O. & LACY, P.E. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release V. The participation of a microtubular-microfilamentous system. *Diabetes*, 20: 257-65, 1971.

195. MALAISSE, W.J.; MAHY, M.; BRISSON, G.R. & MALAISSE-LAGAE, F. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release VIII. Combined effects of glucose and sulfonylureas. *Europ. J. clin. Invest.*, 2:85-90, 1972.
196. ———.; DEVIS, G.; PIPELEERS, D.G. & SOMERS, G. Calcium-antagonists and islet function. IV. Effect of D600. *Diabetologia*, 12:77-81, 1976a.
197. ———.; SENER, A.; DEVIS, G. & SOMERS, G. Calcium-antagonists and islet function V. Effect of R33711. *Horm. metabol. Res.*, 8:434-8, 1976b.
198. ———.; ———.; KOSER, M. & HERCHUELZ, A. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release -Metabolism of α - and β -D-glucose in isolated islets. *J. biol. Chem.*, 251:5936-43, 1976c.
199. ———.; ———.; LEVY, J. & HERCHUELZ, A. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXII. Qualitative and quantitative aspects of glycolysis in isolated islets. *Acta diabet. lat.*, 13:202-15, 1976d.
200. ———.; HERCHUELZ, A.; LEVY, J. & SENER, A. Calcium antagonists and islet function — III The possible site of action of verapamil. *Biochem. Pharmacol.*, 26:735-40, 1977.
201. ———.; SENER, A.; HERCHUELZ, A. & HUTTON, J.C. Insulin release: The fuel hypothesis. *Metabolism*, 28:373-86, 1979a.
202. ———.; VAN OBBERGHEN, E.; DEVIS, G.; SOMERS, G. & RAVAZZOLA, M. Dynamics of insulin release and microtubular-microfilamentous system. V. A model for the phasic release of insulin. *Europ. J. clin. Invest.*, 4:313-8, 1974.
203. ———.; DEVIS, G.; HERCHUELZ, A.; SENER, A. & SOMERS, G. Calcium antagonists and islet function VIII. The effect of magnesium. *Diabete & Metabol.*, Paris, 2:1-4, 1976e.

204. MALAISSE, W.J.; HUTTON, J.C.; CARPINELLI, A.R.; HERCHUELZ, A. & SENER, A. The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release. Metabolism and cationic effects of leucine. *Diabetes*, 29:431-7, 1980.
205. ———.; ———.; 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*, 16:331-41, 1979b.
206. ———.; ———.; SENER, A.; LEVY, J.; HERCHUELZ, A.; DEVIS, G. & SOMERS, G. Calcium antagonists and islet function: VII. Effect of calcium deprivation. *J. Membrane Biol.*, 38:193-208, 1978a.
207. ———.; 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.
208. ———.; SENER, A.; HERCHUELZ, A.; HUTTON, J.C.; DEVIS, G.; SOMERS, G.; BLONDEL, B.; MALAISSE-LAGAE, F. & ORCI, L. Sequential events in the process of glucose-induced insulin release. In: CONGRESS of the INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 9., New Delhi, 1976. *Proceedings*. Amsterdam, Excerpta Médica, 1976f. p. 95-102 (Series 413. Diabetes.).
209. ———.; HERCHUELZ, A.; DEVIS, G.; SOMERS, G.; BOSCHERO, A.C.; HUTTON, J.C.; KAWAZU, S.; SENER, A.; ATWATER, I.J.; DUNCAN, G.; RIBALET, B. & ROJAS, E. Regulation of calcium fluxes and their regulatory roles in pancreatic islets. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 307:562-82, 1978b.
210. MALAISSE-LAGAE, F. & MALAISSE, W.J. Stimulus - secretion coupling of glucose-induced insulin release III. Uptake of ⁴⁵calcium by isolated islets of Langerhans. *Endocrinology*, 88:72-80, 1971.

211. MALAISSE-LAGAE, F.; GREIDER, M.H.; MALAISSE, W.J. & LACY, P.E. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release IV. The effect of vincristine and deuterium oxide on the microtubular system of the pancreatic beta cell. *J. cell. Biol.*, 49:530-5, 1971.
212. MARKS, M.I.; VOSE, A.; HAMMERBERG, S. & DUGAL, R. Clinical-pharmacological studies of sisomicin in ill children. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 13:753-8, 1978.
213. MATSCHINSKY, F.M.; ELLERMAN, J.E.; KRZANOWSKI, J.; KOTLER-BRAJTBURG, J.; LANDGRAF, R. & FERTEL, R. The dual function of glucose in islets of Langerhans. *J. biol. Chem.*, 246:1007-11, 1971.
214. MEISSNER, H.P. Electrical characteristics of the beta-cells in pancreatic islets. *J. Physiol.*, Paris, 72: 757-67, 1976.
215. ———. & ATWATER, I.J. The kinetics of electrical activity of beta cells in response to a "square wave" stimulation with glucose or glibenclamide. *Horm. metabol. Res.*, 8:11-6, 1976.
216. MIDGLEY Jr., A.R.; NISWENDER, G.D.; & REBAR, R.W. Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, specificity). *Acta endocr.*, Copenhagen, 63 (Suppl. 142):163-84, 1969.
217. MILNER, R.D.G. & HALES, C.N. The role of calcium and magnesium in insulin secretion from rabbit pancreas studied *in vitro*. *Diabetologia*, 3:47-9, 1967a.
218. ———. & ———. The sodium pump and insulin secretion. *Biochim. biophys. Acta*, 135:375-7, 1967b.
219. ———. & ———. The stimulation by potassium of insulin secretion from rabbit pancreas *in vitro*. *Biochem. J.*, 105:28p, 1967c.

220. MILNER, R.D.G. & HALES, C.N. Cations and the secretion of insulin. *Biochim. biophys. Acta*, 150:165-7, 1968.
221. MONTAGUE, W. & TAYLOR, K.W. Islet-cell metabolism during insulin release. *Biochem. J.*, 115:257-62, 1969.
222. MORRIS, B.J. Specific radioactivity of radioimmunoassay tracer determined by self-displacement: a re-evaluation. *Clin. Chim. Acta*, 73:213-6, 1976.
223. MOSKALEWSKI, S. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen. Comparat. Endocrinol.*, 5:342-53, 1965.
224. ———.; SOCHAŃSKA, K.R. & WIWATOWSKI, T. The presence of a factor toxic to pancreatic beta cells in some collagenase preparations. *Bull. Acad. Polonaise Sci.*, 22:127-30, 1974.
225. NABATA, H. Effects of Ca^{2+} antagonistic coronary vasodilators on myocardial contractility and membrane potentials. *Jap. J. Pharmacol.*, 27:239-49, 1977.
226. NABER, S.P.; McDANIEL, M.L. & LACY, P.E. The effect of glucose on the acute uptake and efflux of calcium-45 in isolated rat islets. *Endocrinology*, 101: 686-93, 1977.
227. NAGAO, T.; IKEO, T. & SATO, M. Influence of calcium ions on response to diltiazem in coronary arteries. *Jap. J. Pharmacol.*, 27:330-2, 1977.
228. ORCI, L. & UNGER, R.H. Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells. *Lancet*, 2:1243-4, 1975.
229. ———.; GABBAY, K.H. & MALAISSE, W.J. Pancreatic beta-cell web: Its possible role in insulin secretion. *Science*, 175:1128-30, 1972.

230. OSTLUND, R.E. Contractile proteins and pancreatic beta - cell secretion. *Diabetes*, 26:245-52, 1977.
231. PACE, C.S. & MATSCHINSKY, F.M. Cytochalasin B : its action on glucose-induced electrical and metabolic responses in rat pancreatic islets. *Biochim. biophys. Acta*, 354: 188-93, 1974.
232. _____.; _____.; LACY, P.E.; CONANT, S. Electrophysiological evidence for the autoregulation of β -cell secretion by insulin. *Biochim. biophys. Acta*, 497 : 408-14, 1977.
233. PAYET, M.D.; BKAILY, G.; SCHANNE, O.F. & RUIZ-CERETTI, E. Influence of streptomycin on spontaneous activity of clusters of cultured cardiac cells from neonatal rats. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, 58:433-5, 1980.
234. PICCININI, F.; FAVALLI, L.; CHIARI, M.C. & CORRADO, A. P. Interferência induzida por antibióticos aminoglicosídicos-aminociclitólicos no transporte iônico em modelos de membrana. *Ciência e Cult.*, 25 (Supl.) : 493, 1973. (Abstract).
235. PIMENTA DE MORAIS, I.; CORRADO, A.P. & SUAREZ-KURTZ, G. Competitive antagonism between calcium and aminoglycoside antibiotics on guinea-pig intestinal smooth muscle. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 231:317-27, 1978.
236. PIPELEERS, D.G.; MARICHAL, M. & MALAISSE, W.J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XV. Participation of cations in the recognition of glucose by the β -cell. *Endocrinology*, 93:1012-8 , 1973.
237. PITTINGER, C. & ADAMSON, R. Antibiotic blockade of neuromuscular function. *Annu. Rev. Pharmacol.*, 12: 169-84, 1972.
238. _____.; ERYASA, Y. & ADAMSON, R. Antibiotic - induced paralysis. *Anesth. Analg.*, 49:487-501, 1970.

239. POZZA, G.; GALANSINO, G.; HOFFELD, H. & FOÀ, P.P. Stimulation of insulin output by monosaccharides and monosaccharide derivatives. *Amer. J. Physiol.*, 192: 497-500, 1958.
240. PRADO, W.A.; CORRADO, A.P. & MARSEILLAN, R.F. Competitive antagonism between calcium and antibiotics at the neuromuscular junction. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 231:297-307, 1978.
241. PRIDGEN, J.E. Respiratory arrest thought to be due to intraperitoneal neomycin. *Surgery*, 40:571-4, 1956.
242. RANDLE, P.J. & HALES, C.N. Insulin release mechanisms. In: STEINER, D.F. & FREINKEL, N., eds. *Handbook of Physiology. Endocrinology*. Washington, D.C., Amer. Physiol. Soc., 1972. Sect. 7, v. 1, p. 219-35.
243. REYMANN, M.T.; BRADAC, J.A.; COBBS, C.G. & DISMUKES, W.E. Correlation of aminoglycoside dosages with serum concentrations during therapy of serious Gram-negative bacillary disease. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 16:353-61, 1979.
244. RODRIGUEZ, V.; BODEY, G.P.; VALDIVIESO, M. & FELD, R. Clinical pharmacology of sisomicin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7:38-41, 1975.
245. ROTH, J. Peptide hormone binding to receptors: A review of direct studies *in vitro*. *Metabolism*, 22:1059-73, 1973.
246. RUBIN, R.P. The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones. *Pharmacol. Rev.*, 22:389-428, 1970.
247. SANDE, M.A. & MANDELL, G.L. Antimicrobial Agents - The aminoglycosides. In: GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. *The pharmacological basis of therapeutics*. New York, Macmillan, 1980. p. 1162-79.

248. SANDO, H.; BORG, J. & STEINER, D.F. Studies on the secretion of newly synthesized proinsulin and insulin from isolated rat islets of Langerhans. *J. clin. Invest.*, 51:1476-85, 1972.
249. SANTOS, M.L.; DELATTRE, E.; MONTEIRO, M.O. & BOSCHERO, A. C. Efeito de antibióticos aminoglicosídicos sobre a glicemia e insulinemia de ratos. {Apresentado ao 14º Congresso Latinoamericano de Ciências Fisiológicas, São Paulo, 1981}.
250. SCATCHARD, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 51 : 660-72, 1949.
251. SCHIBECI, A. & SCHACHT, J. Action of neomycin on the metabolism of polyphosphoinositides in the guinea pig kidney. *Biochem. Pharmacol.*, 26:1769-74, 1977.
252. SEHLIN, J. & TALJEDAL, I.-B. Glucose-induced decrease in Rb^{+} permeability in pancreatic β cells. *Nature*, 253:635-6, 1975.
253. SENER, A. & MALAISSE, W.J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release-Metabolic events in islet stimulated by non-metabolizable secretagogues. *Europ. J. Biochem.*, 98:141-7, 1979.
254. ———.; LEVY, J. & MALAISSE, W.J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release - Does glycolysis control calcium transport in the B-cell? *Biochem. J.*, 156:521-5, 1976.
255. SIEGEL, S. *Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento*. São Paulo, McGraw-Hill, 1975. p. 131-44.
256. SIEGEL, E.G.; WOLLHEIM, C.B.; SHARP, G.W.G.; HERBERG, L. & RENOLD, A.E. Defective calcium handling and insulin release in islets from diabetic chinese hamsters. *Biochem. J.*, 180:233-6, 1979.

257. SKELLEY, D.S. BROWN, L.P. & BESCH, P.K.. Radioimmunoassay. *Clin. Chem.*, 19:146-86, 1973.
258. SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. 6. ed. IOWA, IOWA State University Press, 1971. p. 91-119.
259. SOMERS, G.; DEVIS, G. & MALAISSE, W.J. Calcium antagonists and islet function. IX. Is extracellular calcium required for insulin release? *Acta diabet. lat.*, 16: 9-18, 1979.
260. _____.; _____.; VAN OBBERGHEN, E. & MALAISSE, W. J. Calcium antagonists and islet function. II. Interaction of theophylline and verapamil. *Endocrinology*, 99:114-24, 1976a.
261. _____.; _____.; _____ & _____. Calcium-antagonists and islet function VI. Effect of barium. *Pflüg. Arch.*, 365:21-8, 1976b.
262. _____.; SENER, A.; DEVIS, G. & MALAISSE, W. J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release XLV. The anion-osmotic hypothesis for exocytosis. *Pflüg. Arch.*, 388:249-53, 1980.
263. STANDARDIZATION of RADIOIMMUNOASSAY PROCEDURES - Report of an international atomic energy agency panel. *Int. J. appl. Radiat. Isotopes*, 25:145-60, 1974.
264. STEINKE, J.; PATEL, T.N. & AMMON, H. P. T. Relationship between glucose-and tolbutamide-induced insulin release and insulin content in single pancreatic rat islets. *Metabolism*, 21:465-70, 1972.
265. SUAREZ-KURTZ, G. Inhibition of membrane calcium activation by neomycin and streptomycin in crab muscle fibers. *Pflüg. Arch.*, 349:337-49, 1974.
266. SUSSMAN, K.E.; VAUGHAN, G.D. & TIMMER, R.F. An *in vitro* method for studying insulin secretion in the perfused isolated rat pancreas. *Metabolism*, 15:466-76, 1966.

267. SWAIN, H.H.; KIPLINGER, G.F. & BRODY, T.M. Actions of certain antibiotics on the isolated dog heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 117:151-9, 1956.
268. TAYLOR, K.W.; HOWELL, S.L.; MONTAGUE, W. & EDWARDS, J. C. Immunoassay of insulin and glucagon. *Clin. Chim. Acta*, 22:71-6, 1968.
269. TOLEDO E SOUZA, I.T. *Aplicação do método do radioimunoensaio na dosagem da insulina no plasma humano*. São Paulo, 1972, 51p. Tese (Mestre em Ciências) - Universidade de São Paulo - USP.
270. TURTLE, J.R.; LITTLETON, G.K. & KIPNIS, D.M. Stimulation of insulin secretion by theophylline. *Nature*, 213: 727-8, 1967.
271. VANCE, J.E.; BUCHANAN, K.D.; CHALLONER, D.R. & WILLIAMS, R.H. Effect of glucose concentration on insulin and glucagon release from isolated islets of Langerhans of the rat. *Diabetes*, 17:187-93, 1968.
272. VAN OBBERGHEN, E.; SOMERS, G.; DEVIS, G.; RAVAZZOLA, M.; MALAISSE-LAGAE, F.; ORCI, L. & MALAISSE, W.J. Dynamics of insulin release and microtubular-microfilamentous system. VII. Do microfilaments provide the motive force for the translocation and extrusion of beta granules? *Diabetes*, 24:892-901, 1975.
273. VECCHIO, D. & GONET, A.F. Culture d'organe de pancreas foetal de rat: I. Effects du glucose, d'autres composants du milieu de culture, et d'un sulfamide hypoglycemiant. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 25:103-22, 1967.
274. VITAL BRAZIL, O. & CORRADO, A.P. The curariform action of streptomycin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 120:452-9, 1957.
275. ————. & PRADO-FRANCESCHI, J. The neuromuscular blocking action of gentamicin. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 179:65-77, 1969a.

276. VITAL BRAZIL, O. & PRADO-FRANCESCHI, J. The nature of neuromuscular block produced by neomycin and gentamicin. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 179:78-85, 1969b.
277. WEISS, G.B.; GOODMAN, F.R. & ADAMS, H.R. Alteration by neomycin of ^{45}Ca distribution and of contractile responses in rabbit aortic smooth muscle. *Fed. Proc.*, 22: 767, 1973. (Abstract).
278. WILLIAMS, J.A. Effects of Ca^{++} and Mg^{++} on secretion *in vitro* by mouse thyroid glands. *Endocrinology*, 90: 1459-63, 1972.
279. WITZEL, D.A. & LITTLEDIKE, E.T. Suppression of insulin secretion during induced hypocalcemia. *Endocrinology*, 93:761-6, 1973.
280. WOLF, G.L. & WIGTON, R.S. Vasodilatation induced by streptomycin in the perfused canine kidney. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 194:285-9, 1971.
281. WOLLHEIM, C.B.; KIKUCHI, M.; RENOLD, A.E. & SHARP, G.W.G. The roles of intracellular and extracellular Ca^{++} in glucose-stimulated biphasic insulin release by rat islets. *J. clin. Invest.*, 62:451-8, 1978.
282. ———.; BLONDEL, B.; TRUEHEART, P.A.; RENOLD, A.E.; & SHARP, G.W.G. Calcium-induced insulin release in monolayer culture of the endocrine pancreas - Studies with ionophore A23187. *J. biol. Chem.*, 250:1354-60, 1975.
283. WOLTERS, G.H.J. & KONIJNENDIJK, W. Relationship between insulin secretion, insulin content and dry weight of single rat pancreatic islets. *Acta endocr.*, 94: 365-70, 1980.
284. WRIGHT, J.M. & COLLIER, B. The effects of neomycin upon transmitter release and action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 200:576-87, 1977.

285. YALOW, R.S. & BERSON, S.A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. clin. Invest.*, 39:1157-75, 1960.
286. YASUDA, K.; HURUKAWA, Y.; OKUYAMA, M.; KIKUCHI, M. & YOSHINAGA, K. Glucose tolerance and insulin secretion in patients with parathyroid disorders - Effect of serum calcium on insulin release. *New Engl. J. Med.*, 292: 501-4, 1975.
287. ZAWALICH, W.S. & MATSCHINSKY, F.M. Sequential analysis of the releasing and fuel function of glucose in isolated perifused pancreatic islets. *Endocrinology*, 100:1-8, 1977.
288. ———.; ROGNSTAD, R.; PAGLIARA, A.S. & MATSCHINSKY, F.M. A comparison of the utilization rates and hormone-releasing actions of glucose, mannose, and fructose in isolated pancreatic islets. *J. biol. Chem.*, 252:8519-23, 1977.

APÊNDICE

TABELA I. Secreção de insulina por ilhotas de Langerhans isoladas de rato e incubadas, por 90 min a 37°C, em diferentes concentrações de glucose.

GLUCOSE (mM)	INSULINA SECRETADA (μ U/ilhota por 90 min) ^a	N
-	48 $\pm$ 3,3	41
2,8	55 $\pm$ 11,0	15
5,5	82 $\pm$ 7,8 ^b	33
11,1	201 $\pm$ 13,2 ^b	26
16,7	309 $\pm$ 9,3 ^b	72
27,7	367 $\pm$ 17,9 ^b	24

^a Média $\pm$ erro padrão de N determinações, após normalização dos resultados.

^b Indica $p < 0,001$ ou menos, com relação à secreção basal (ausência de glucose).

TABELA II. Efeito de diferentes concentrações de sisomicina sobre a secreção de insulina, por ilhotas isoladas de rato e incubadas em presença de 16,7 mM de glucose, durante 90 min.

SISOMICINA (M)	INSULINA SECRETADA (μ U/ilhota por 90 min)	% de INIBIÇÃO	N
-	305 $\pm$ 14,3	-	29
10^{-6}	305 $\pm$ 24,7	-	10
10^{-5}	185 $\pm$ 29,1 ^a	39,3	10
10^{-4}	128 $\pm$ 39,3 ^a	58,0	9
10^{-3}	66 $\pm$ 7,1 ^a	78,4	16

Os valores de insulina secretada são média $\pm$ erro padrão.

a vs. controle (sem sisomicina) $p < 0,005$ ou menos.

TABELA III. Efeito de diferentes concentrações de gentamicina sobre a secreção de insulina, por ilhotas isoladas de rato e incubadas por 90 min, em presença de 16,7 mM de glucose.

GENTAMICINA (M)	INSULINA SECRETADA (μ U/ilhota por 90 min)	% DE INIBIÇÃO	N
-	312 $\pm$ 27,9	-	11
10^{-6}	331 $\pm$ 37,9 ^a	-	11
10^{-5}	236 $\pm$ 31,9 ^b	24,4	11
10^{-4}	122 $\pm$ 20,0 ^b	60,9	12
10^{-3}	51 $\pm$ 6,3 ^b	83,7	11

Os valores são média $\pm$ erro padrão de N determinações, após normalização dos resultados (cf. ítem 2.9.).

a vs. controle (sem gentamicina) $p > 0,60$.

b vs. controle (sem gentamicina) $p < 0,05$ ou menos.

TABELA IV. Efeito de 10^{-3} M de gentamicina sobre a secreção de insulina, por ilhotas de Langerhans isoladas de rato, estimulada por glucose em diversas concentrações.

GLUCOSE (mM)	GENTAMICINA (M)	INSULINA SECRETADA (μ U/ilhota por 90 min)	N	P
-	-	65 $\pm$ 9,1	5	
-	10^{-3}	42 $\pm$ 2,5	7	< 0,05
5,5	-	75 $\pm$ 10,9	10	
5,5	10^{-3}	42 $\pm$ 6,5	8	< 0,01
11,1	-	189 $\pm$ 17,4	10	
11,1	10^{-3}	57 $\pm$ 5,2	10	< 0,001
16,7	-	312 $\pm$ 28,3	5	
16,7	10^{-3}	95 $\pm$ 7,9	6	< 0,001

Os valores de insulina secretada são média $\pm$ erro padrão de N determinações, após normalização dos resultados.

P expressa a significância do efeito da gentamicina, em uma dada concentração de glucose.

TABELA V. Efeito do aumento da concentração de cálcio sobre a inibição, pela sisomicina, da secreção de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas de rato, incubadas em meio contendo 16,7 mM de glucose (90 min a 37°C).

LINHA	N	Ca ²⁺ (mM)	SISOMICINA (M)	INSULINA SECRETADA (μ U/ilhota por 90 min)	P
1	20	1,0	-	289 $\pm$ 17,2	
2	10	1,0	10 ⁻⁵	185 $\pm$ 29,1	vs.1 < 0,0025
3	10	2,0	10 ⁻⁵	329 $\pm$ 17,1	vs.1 > 0,10 vs.2 < 0,001
4	10	4,0	10 ⁻⁵	338 $\pm$ 23,3	vs.1 > 0,10 vs.2 < 0,001
5	10	1,0	10 ⁻³	69 $\pm$ 19,3	
6	10	4,0	10 ⁻³	224 $\pm$ 22,0	vs.1 < 0,05 vs.4 < 0,0025 vs.5 < 0,001

Os valores de insulina secretada são média $\pm$ erro padrão de N determinações.

Os valores de P expressam a significância da diferença entre as condições experimentais indicadas pelos números das linhas.

TABELA VI. Efeito do aumento da concentração de potássio sobre a inibição, pela gentamicina, da secreção de insulina por ilhotas incubadas durante 90 min a 37°C, em meio contendo 16,7 mM de glucose.

LINHA	K ⁺ (mM)	GENTAMICINA (M)	INSULINA SECRETADA (μ U/ilhota por 90 min) ^a	P
1	5,0	-	331 $\pm$ 12,9 (13)	
2	5,0	10 ⁻⁴	122 $\pm$ 20,0 (12)	vs.1 < 0,001
3	20,0	-	485 $\pm$ 38,8 (13)	vs.1 < 0,0025
4	20,0	10 ⁻⁴	501 $\pm$ 39,4 (13)	vs.1 < 0,001 vs.2 < 0,001 vs.3 > 0,70

^a Média $\pm$ erro padrão do n° de determinações indicado entre parênteses.

P indica a significância da diferença entre as condições experimentais indicadas pelos números das linhas.

TABELA VII, Efeito de antibióticos aminoglicosídicos sobre a secreção de insulina, provocada pela combinação de bário e teofilina, por ilhotas de Langerhans isoladas de rato. A incubação foi feita em Krebs desprovido de cálcio, por 90 min a 37°C.

LINHA	BaCl ₂ + TEOFILINA (mM de cada um)	ANTIBIÓTICO (10 ⁻⁴ M)	INSULINA SECRETADA (μU/ilhota por 90 min) ^a	P
1	-	-	9 ± 1,0 (10)	
2	2,0	-	236 ± 25,0 (10)	
3	2,0	Sisomicina	221 ± 21,0 (10)	>0,60
4	-	-	33 ± 1,6 (14)	
5	2,0	-	113 ± 12,3 (13)	
6	2,0	Gentamicina	114 ± 11,4 (14)	>0,95

^a Média ± erro padrão do número de determinações indicado entre parênteses.

Os valores de P expressam a significância da diferença entre as condições experimentais indicadas pelos números das linhas.

TABELA VIII. Efeito da sisomicina sobre a incorporação de cálcio por ilhotas de Langerhans isoladas de rato, incubadas por 90 min a 37°C, em presença ou ausência de glucose.

LINHA	GLUCOSE (mM)	SISOMICINA (M)	CÁLCIO INCORPORADO (pmol/ilhota por 90 min) ^a	P
1	-	-	4,47 ± 0,294 (10)	
2	16,7	-	9,68 ± 0,540 (9)	vs.1 < 0,001
3	16,7	10 ⁻³	7,00 ± 0,582 (9)	vs.2 < 0,005
4	-	-	4,33 ± 0,227 (9)	
5	-	10 ⁻³	2,02 ± 0,192 (8)	vs.4 < 0,001
6	16,7	-	7,40 ± 0,384 (10)	vs.4 < 0,001
7	16,7	10 ⁻⁴	6,95 ± 0,333 (10)	vs.6 > 0,15

^a Média ± erro padrão de n determinações (indicado entre parênteses).

Os valores de P expressam a significância da diferença entre as condições experimentais indicadas pelos números das linhas.

A concentração de cálcio total no meio foi 1,0 mM.