

MARIA LUIZA DOS SANTOS

EFEITO DE ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDICOS SOBRE A GLICEMIA DE
RATOS.

Tese submetida ao Instituto de
Biologia, da Universidade Esta-
dual de Campinas, para obten-
ção do grau de Mestre em Biolo-
gia, na área de Fisiologia.

CAMPINAS - S.P.

1982

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

"...Viver é chegar pela primeira
vez a cada instante..."

Aos meus pais
Dedico.

AGRADECIMENTOS

- Ao Departamento de Fisiologia e Biofísica, que possibilitou a realização deste trabalho.
- Ao Professor Doutor ANTONIO CARLOS BOSCHERO, pela orientação nestes últimos 4 anos.
- Aos amigos e mestres,
Dalva Maria Rossi Tavares,
Maria Elisabete Cesar de Monaco,
Fábio Lang da Silveira,
Marcelo Paes de Mello e
Maira Helena Lambert, pelos ensinamentos, incentivo, sem o qual seria impossível chegar até aqui.
- Aos Doutores,
Alexandre Pinto Corrado
Armando de Aguiar Pupo,
Carlos Henrique de Mesquita,
Gilberto D'Assunção Fernandes,
Iracélia Torres de Toledo e Souza,
Júlio Kieffer,
Marcia Ortiz Monteiro, e a todos os colegas e funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica, pela colaboração prestada para a execução dos experimentos.
- À Srta. Maria Elidia dos Santos, pelos serviços datilográficos.
- Ao Daniel Gustavo Faundes Hardy e Esmeralda Zanchetta Borghi, pela execução dos gráficos.
- Ao CAPES, Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, através do Plano Institucional de Capacitação de Docentes (PICD), pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1. Tratamento Crônico - Gentamicina	10
2.2. Tratamento Crônico - Tobramicina	12
2.3. Tratamento Agudo - Gentamicina	13
2.4. Dosagem de glicose e Ca^{++} séricos	14
2.5. Dosagem de insulina no soro	15
2.6. Soro "strip" (soro isento de insulina)	16
2.7. Soluções	17
2.8. Análise dos Resultados	18
3. RESULTADOS	19
3.1. Efeito do tratamento crônico com gentamicina e tobramicina sobre o ganho de peso de ratos controles e tratados	19
3.2. Efeito do tratamento crônico com gentamicina ou tobramicina sobre a glicemia de jejum	19
3.3. Efeito de uma sobrecarga de glicose (IVGTT) sobre a glicemia de ratos tratados com a gentamicina ou tobramicina e insulinemia de ratos tratados com tobramicina	23
3.4. Efeito do Teste de Tolerância à insulina sobre a glicemia de ratos tratados com gentamicina ou tobramicina	30
3.5. Efeito da infusão contínua de glicose, glicose mais gentamicina e glicose, gentamicina mais gluconato de Ca^{++} , sobre a glicemia de ratos normais ou adrenalectomizados	30
4. DISCUSSÃO	36
4.1. Efeito do tratamento crônico com gentamicina ou tobramicina	37
4.2. Efeito da administração aguda de gentamicina ..	40

5. RESUMO E CONCLUSÕES	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

I. INTRODUÇÃO

O mecanismo de secreção de insulina tem sido melhor compreendido a partir do desenvolvimento por YALOW e BERSON (1960) de um método para dosagem de insulina por meio do radioimunoensaio (RIE). Além deste método, preparações "in vitro" de pâncreas total (GRODSKI e BENNETT, 1963 e CURRY, BENNETT e GRODSKI, 1968) ou de ilhotas isoladas por microdissecção (HELIERSTRÖM, 1964) ou por colagenase (MOSKALEWSKY, 1965 e LACY e KOSTIANOWSKY, 1967) e incubadas em condições estática (MALAISSE, MALAISSE-LAGAE e KING, 1968), dinâmica (LACY, WALKER e FINK, 1972) ou ainda, mantidas em cultura (LAMBERT, JUNOD, STANFFACHER, JEANRENAUD e RENOLD, 1969) em muito contribuíram para o melhor entendimento do referido mecanismo. Recentemente, ampla revisão a respeito das vantagens e limitações das técnicas que usam pâncreas endócrino "in vitro" foram feitas por HEDESKOV (1980).

A secreção de insulina pode ser desencadeada por inúmeras substâncias tais como carboidratos (glicose , manose, N-acetilglicosamina, inosina, gliceraldeído, diidroxiacetona, glicosamina), aminoácidos (arginina, leucina, lisina, fenilalanina) ácidos graxos e outras, sendo a glicose, o estímulo fisiológico de preferência para muitas espécies animais. Existem ainda compostos capazes de aumentar a resposta secretória induzida pelas substâncias acima citadas , mas que *per se* não conseguem estimular a secreção de insulina. Dentre estas, as mais estudadas são as metilxantinas e

o próprio 3', 5' - AMP cíclico (TURTLE, LITTLETON e KIPNIS, 1967; MAC DANIEL, WEAWER, ROTH, FINK, SWANSON e LACI, 1977 e CERASI; EFENDIC, THORNQUIST e LUFT, 1979).

Recentemente, MALAISSE (1978) ordenou os eventos fisiológicos mais importantes na célula beta que culmina com a secreção de insulina. Inicialmente, i; a glicose deve ser reconhecida pela célula, provavelmente pelo sistema enzimático responsável pela glicólise; ii; ser metabolizada, gerando alterações no estado redox da célula beta; o que induz; iii; alteração das permeabilidades ao K^+ e Ca^{2+} na membrana, e conseqüentemente; iiiii; e o acúmulo intracelular de Ca^{2+} e finalmente ; iiiiii; a ativação por este íon do sistema efetor, composto pela membrana celular, microtúbulos e microfilamentos, responsável pela extrusão dos grânulos que contêm insulina.

GRODSKI, LANDAHL, CURRY e LAMBERT (1970) observaram uma resposta bifásica na secreção de insulina quando induzida pela glicose. Com intuito de explicar a procedência desse fenômeno, RANDLE e HALES (1972) propuseram um modelo de dois compartimentos para a insulina estocada na célula beta. Um, localizado próximo à membrana com tamanho reduzido, que seria liberado rapidamente, enquanto que o outro, mais interno, com grandes dimensões e de mobilização mais lenta.

LACY (1970), sugere que os grânulos de insulina alinhados ao longo dos microtúbulos poderiam ser responsáveis pela primeira fase de secreção enquanto que, a segunda fase seria conseqüência da liberação mais tardia de

grânulos livres no citoplasma. MALAISSE, VAN OBBERGHEN, DE VIS, SOMERS, RAVAZZOLA (1974) por outro lado, sugerem que a primeira fase seria consequência da liberação dos grânulos contidos na rede de microfilamentos, localizada na periferia da célula, enquanto que os grânulos alinhados ao longo dos microtúbulos seriam responsáveis pela segunda fase. Mais recentemente, WOLLHEIM, KIKUCHI, RENOLD, SHARP (1978) , KIKUCHI, WOLLHEIM. CUENDET, RENOLD e SHARP (1978) e KIKUCHI, WOLLHEIM, SIEGEL, RENOLD e SHARP (1979), reuniram evidências de que o padrão bifásico da resposta secretória seria reflexo de uma alteração da concentração citosólica de cálcio. Segundo estes autores, a primeira fase da liberação seria mais influenciada por cálcio, já existente no interior da célula, o qual seria mobilizado pela glicose de duas maneiras distintas. Uma pela redução do efluxo de cálcio e outra pela liberação deste cátion de compartimentos intracelulares. A segunda fase da secreção dependeria também do Ca^{2+} intracelular, mas seria complementada por uma quantidade importante de Ca^{++} proveniente do meio extracelular.

Como a primeira fase de secreção é efêmera, fica patente a necessidade da concorrência de Ca^{2+} extracelular para a liberação de quantidades significativas de insulina. A propósito, ficou bem estabelecido que a liberação de insulina induzida pela glicose (e também por outros secretagogos) requer a presença de cálcio extracelular (GRODSKY e BENNETT, 1966; MILNER e HALES, 1967; CURRY *et alii* 1968; LAMBERT *et alii* 1969; HELLMAN, 1978 e SOMERS , DEVIS e MALAISSE, 1979 e outros). HELLMAN (1976) e DEVIS ,

SOMERS e MALAISSE (1977) observaram que um incremento rápido na concentração do cálcio no meio nutritivo, estimulou a secreção de insulina, mesmo na ausência de glicose, o que confirmou definitivamente a dependência deste íon no meio extracelular.

Em estudos realizados com ilhotas isoladas e incubadas com $^{45}\text{Ca}^{2+}$, na presença de diversas concentrações de glicose, MALAISSE-LAGAE e MALAISSE (1971) observaram um aumento da incorporação do isótopo, evidenciando-se uma nítida relação sigmoideal entre a captação de ^{45}Ca concentrações crescentes de glicose, semelhante ao padrão bifásico registrado da secreção de insulina diante de diferentes concentrações de glicose. WOLLHEIM, KIKUCHI, RENOLD e SHARP (1978) observaram que o aumento da concentração de glicose no meio nutritivo estimulou significativamente o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas ilhotas isoladas logo após a sua aplicação sendo estes resultados também observados por HELLMAN, SEHLIN e TALJEDAL (1971); NABER, McDANIEL e LACY (1977) e FRANKEL, KROMHOUT, IMAGAWA, LANDAHL e GRODSKY, (1978).

Se por um lado é cristalina a participação do cálcio extracelular na secreção de insulina, não se conhece todos os pormenores da participação da glicose (ou de seus metabolitos) na indução do acúmulo intracelular deste cátion na célula beta. Segundo um modelo esquemático compilado por DELATTRE (1981) tendo como base os trabalhos de HENQUIN (1979), ATWATER, DAWSON, RIBALET e ROJAS (1979), MALAISSE, SENER, HERCHUELZ e HULTON (1979) e HERCHUELZ, THONNART, CARPINELLI, SENNER e MALAISSE (1980), a glicose sendo metabo

lizada aumentaria a concentração intracelular de NAD(P)H^+ , H^+ e ATP. O primeiro atuaria aumentando a atividade ionoforética do cálcio a nível da membrana e o segundo reduziria o contratransporte de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ bem como o transporte ionoforético do K^+ pela membrana. A redução da saída do K^+ despolariza a membrana podendo ocorrer a abertura de canais de cálcio voltagem-dependentes. Assim, vários componentes concorreriam para o acúmulo intracelular de cálcio tanto pela redução do efluxo como pelo aumento do influxo do referido cátion. O ATP forneceria a energia necessária para o processo secretório.

Com respeito à ação dos potencializadores da secreção, por exemplo do AMPc, parece que a mesma ocorre devido à capacidade destas substâncias em remanejar Ca^{2+} de compartimentos intracelulares. (WOLLHEIM, SHARP, 1981).

Sabe-se que o cálcio desempenha um papel importante, não só na secreção de insulina como também em inúmeros outros parâmetros fisiológicos (desnecessário enumerá-los a esta altura). De qualquer forma, estas múltiplas funções do cálcio, principalmente referentes ao sistema circulatório, geraram interesse a respeito dos antagonistas de Ca^{2+} , que resultou no desenvolvimento de vários novos agentes farmacológicos atualmente em uso clínico (RAHWAN, 1979). Tais antagonistas podem agir de duas maneiras: impedindo a entrada de cálcio extracelular e/ou interferindo na mobilização do Ca^{2+} de diferentes organelas intracelulares.

Estas substâncias, não necessariamente, apresentam estrutura semelhante sendo incluídas entre elas ,

anestésicos locais, verapamil, D-600, nifedipine, diltiazem, suloctidil, R33711, antibióticos aminoglicosídicos e mesmo alguns cátions como lantânio cobalto e magnésio.

Quanto à ação destes antagonistas de Ca^{2+} sobre a secreção de insulina, uma série de trabalhos tem sido publicada nos últimos anos. Uma breve revisão a esse respeito será fornecida a seguir.

DEVIS, SOMERS, VAN OBBERGHEN, MALAISSE (1975) e MALAISSE, DEVIS, PIPPERLERS e SOMERS (1976) observaram que o verapamil e o D-600 inibiram de maneira dose-dependente a secreção de insulina em pâncreas perfundido. Tal inibição foi inversamente proporcional à concentração de Ca^{2+} no meio de incubação o que levou estes autores a relacionarem a ação inibitória do verapamil a uma inibição do transporte de Ca^{2+} a nível de membrana. A reversibilidade desses efeitos do verapamil também foi obtida com o uso de teofilina, substância que favorece o remanejamento de Ca^{2+} de organelas intracelulares (SOMERS, DEVIS, VAN OBBERGHEN e MALAISSE, 1976a).

Outros antagonistas de cálcio tais como diltiazem, suloctidil, D-600, nifedipine e R33711 foram eficientes em reduzir a secreção de insulina de modo semelhante ao verapamil, apenas variando em termos de potência de inibição. Assim, as D_E 50 (K_i aparente) para a inibição da secreção por estes antagonistas foi de 10.0, 1.0, 0.60, 0.10 e 0.01 μM respectivamente (YAMAGUCHI, AKIMOTO, NAKAJIMA e KIYOMOTO, 1977), (MALAISSE, 1977), (MALAISSE e BOSCHERO, 1977), (MALAISSE, SENER, DEVIS e SOMERS, 1976).

Quanto aos antagonistas inorgânicos, MALAISSE

DEVIS, HERCHUELZ, SENER e SOMERS (1976) registraram uma inibição dose-dependente pelo Mg^{2+} sobre a secreção de insulina induzida pela glicose. Resultados semelhantes foram obtidos por HENQUIN e LAMBERT (1975) usando ccbalto. Nestes dois trabalhos, o aumento progressivo da concentração de Ca^{2+} no líquido nutritivo, reverteu de maneira dose-dependente a ação competitiva destes dois cátions com o Ca^{2+} por sítios da membrana celular. Nesta altura, um registro deve ser feito quanto a ação de Ba^{2+} sobre a secreção de insulina. Dentre os cátions testados a este respeito, o Ba^{2+} foi o único capaz de substituir o Ca^{2+} , estimulando a secreção de insulina mesmo na ausência de glicose (SOMERS, *et alii*, 1976b).

Como vimos, a ação dos antagonistas orgânicos e/ou inorgânicos de Ca^{2+} sobre a secreção de insulina "in vitro" está bem documentada. Quanto a sua ação "in vivo", os resultados são mais escassos e as vezes conflitantes, portanto, de difícil interpretação.

Em todo caso, mesmo "in vivo" observou-se que a secreção de insulina estava inibida em estados de hipocalcemia sendo a mesma normalizada quando induzia-se o aumento dos níveis séricos desse cátion através da administração de borogluconato de Ca^{2+} (LITTLEDIKE, WITZEL e WIPP, 1968; WITZEL, LITTLEDIKE, 1973), de gluconolactobionato de Ca^{2+} (LISH, BOLZANO, PATSH e SAILER, 1973), de vitamina D_2 ou ainda pelo uso de teofilina, que sabidamente mobiliza o Ca^{2+} dos compartimentos intracelulares (GEDIK, ZILELI, 1977).

Quanto a ação dos antagonistas de cálcio sobre a secreção de insulina "in vivo", o verapamil inibe a se

creção somente quando frente à sobrecarga de glicose moderada (GIUGLIANO, GENTILE, VERZA, PASSARIELLO, GIANNETTI e VARRICCHIO, 1981). Por outro lado, usando diltiazem, YAMAGUCHI *et alii* (1979) não observaram alterações dos níveis basais de insulina nem mesmo diante de uma sobrecarga de glicose. DE MARINIS e BARBARINO (1980), através de administração crônica de verapamil a pacientes com insulinoma, conseguiram restabelecer a normoglicemia nestes indivíduos. Devemos contudo, salientar que o uso destes antagonistas certamente influenciam os padrões hemodinâmicos no tecido pancreático, o que poderia indiretamente alterar a resposta secretória.

Como referimos anteriormente, os antibióticos aminoglicosídicos também atuam como antagonistas de Ca^{2+} .

Estes antibióticos são representados pelas famílias da estreptomicina (estreptomicina, diidroestreptomicina), canamicina (canamicina, tobramicina, amicacina), gentamicina (gentamicina, sisomicina, metilmicina) e da neomicina (neomicina, paromomicina) além de outros como aminosidina, soframicina, etc.

Muitos estudos tem sido realizados para observar o comportamento dessas substâncias. A estreptomicina, neomicina e tobramicina, podem interferir com a atividade miocárdica, induzir bloqueio da transmissão sináptica e transmissão em gânglios autonômicos (SWAIN, KIPLINGER e BRODY, 1956; PITTINGER e ADAMSON, 1972; WELLES, EMERSON, GIBSON, NICKANDER, OWEN e ANDERSON, 1973) e a administração de grandes doses por via intrapleural ou intraperitoneal, podem provocar depressão respiratória (CORRADO, 1963).

"In vitro", o bloqueio da transmissão sináptica neuromuscular induzido por estes antibióticos (VITAL - BRASIL, PRADO-FRANCESCHI, 1969a e 1969b) bem como a inibição da contração de músculo liso (PIMENTA DE MORAES, CORRADO, SUAREZ-KURTZ, 1978) foi antagonizado por aumento de Ca^{2+} no meio de perfusão. Sugeriu-se que existe uma competição entre estes antibióticos e íons Ca^{++} por receptores específicos a nível de membrana celular (PITTINGER e ADAMSON, 1972 e LODHI, WEINER e SCHACHT, 1976).

Recentemente, em nosso laboratório, estudos "in vitro" com ilhotas isoladas de Langerhans, indicaram que os antibióticos aminoglicosídicos inibem de maneira dose dependente a secreção de insulina induzida por glicose (BOSCHERO, DELATTRE e SANTOS, 1981). Observou-se também que a incorporação de $^{45}Ca^{2+}$ foi diminuída na presença destes antibióticos e que o aumento da concentração de cálcio no meio extracelular reverteu a ação inibitória sobre a secreção de insulina (DELATTRE, SANTOS e BOSCHERO, 1982).

Com base em todas estas evidências, decidimos verificar as possíveis interferências destes antibióticos aminoglicosídicos sobre a glicemia de ratos normais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 65 ratos machos, albinos *Wistar*, com 3 a 4 meses de idade, pesando entre 200 a 350 gramas, mantidos antes e durante o período experimental com ração balanceada e água *ad libitum* suplementada com o complexo vitamínico Vitagold*.

Os animais foram distribuídos em grupos de acordo com a Tabela I.

2.1. TRATAMENTO CRÔNICO - GENTAMICINA

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais (A, B, C e D) que receberam respectivamente, durante 15 dias, por via intramuscular, doses de salina, 5.0, 10.0 e 50.0 mg de gentamicina** por Kg de peso/dia. As doses foram divididas em duas aplicações e ministradas a cada 12 horas.

Todos os animais tiveram o peso e a glicosúria medidos diariamente. Foram feitos controles de glicemia de jejum, no dia imediatamente anterior ao início do tratamento e no 15º dia do período experimental. Foram realizados testes de tolerância à glicose endovenoso (IVGTT) no 15º dia e no 17º os animais foram submetidos a um teste de tolerância à insulina (ITT).

* Laboratório Tortuga, São Paulo, SP.

** Laboratório Shering - RJ.

Tratamento	Antibiótico	Grupos experimentais
Crônico	Gentamicina	A - Controle (salina) (7) B - 5,0 mg/kg de peso/dia (7) C - 10,0 mg/kg de peso/dia (7) D - 50,0 mg/kg de peso/dia (7)
	Tobramicina	A - Controle (salina) (4) B - 50,0 mg/kg de peso/dia (4) C - 100,0 mg/kg de peso/dia (4) D - 200,0 mg/kg de peso/dia (4)
Agudo	Gentamicina	A - Glicose (50,0 mg/kg/min) (4) B - Glicose + Gentamicina (2,0 mg/kg/min) (4)
	Gentamicina (animais adrenalectomizados)	A - Glicose (50,0 mg/kg/min) (5) B - Glicose + Gentamicina (2,0 mg/kg/min) (4) C - Glicose + Gentamicina + Gluconato de Ca ²⁺ (0,063 mg/kg/min) (4)

TABELA I - Distribuição dos animais em grupos, segundo o antibiótico e tipo de tratamento recebido. Em parênteses estão representados o número de animais utilizados em cada grupo.

O IVGTT foi realizado com os ratos em jejum, administrando-se 1 grama de glicose* por Kg. de peso, dissolvida em 0,5 ml de solução fisiológica, por via endovenosa.

O ITT também foi realizado com os animais em jejum, administrando-se 1.0 U de insulina** por Kg de peso, por via intraperitoneal, dissolvida em 0,5 ml de solução fisiológica. As amostras de sangue foram coletadas da veia caudal aos zero, 15, 30 e 60 minutos após a sobrecarga de glicose e aos zero, 15, 30, 45 e 60 minutos após a administração de insulina, respectivamente. Durante o período de coleta todas as amostras foram conservadas a 4°C. A seguir procedeu-se à centrifugação das amostras sendo uma parte do soro usado para a dosagem de glicose e o restante das alíquotas sendo armazenadas para a posterior dosagem de insulina.

2.2. TRATAMENTO CRÔNICO - TOBRAMICINA

Os ratos distribuídos em quatro grupos (A, B, C e D), receberam durante 30 dias, por via intramuscular, doses diárias de zero, 50.0, 100.0 e 200.0 mg de tobramicina*** por Kg de peso. O grupo controle recebeu solução fisiológica, nas mesmas condições. Todos os animais ti

* Dextrose -Chimie Test Produtos Químicos Ltda - Indaiatuba, SP.

** Insulina Porcina - Eli Lilly Lab. (Indianapolis, Ind. USA).

*** Tobramicina sulfato - cedida gentilmente pelo Dr. A. P. Corrado - FMUSP - Ribeirão Preto, SP.

veram peso e glicosúria medidos diariamente.

No 15º e 30º dia do período experimental realizou-se IVGTT e no 33º dia os animais foram submetidos ao ITT, sendo as amostras de sangue coletadas e processadas de maneira idêntica aos grupos tratados com gentamicina.

2.3. TRATAMENTO AGUDO-GENTAMICINA

Ratos normais, após jejum de 12 horas, foram anestesiados com INOVAL* em dose de 1,0 ml/Kg de peso e submetidos à cirurgia para canulação da artéria carótida e veia jugular, para a coleta de amostras de sangue e infusão de substâncias respectivamente, segundo a técnica de POPOVIC e POPOVIC (1960).

As cânulas utilizadas foram feitas com tubos de polietileno, de 1 mm e 1,2 mm de diâmetro, para carótida e jugular, respectivamente. Antes da cirurgia, as cânulas foram colocadas em solução germicida** e depois lavadas com água destilada e preenchidas com solução fisiológica, sendo ocluídas numa das extremidades.

Trinta minutos após a cirurgia, os animais receberam solução contendo glicose (50,0 mg/kg de peso/min) ou glicose mais gentamicina (2,0 mg/kg de peso/min) sob infusão contínua, durante 30 minutos, utilizando-se seringa

* Inoval - Jansen (Johnson & Johnson) cedida gentilmente pelo Deptº de Anestesiologia - HC-UNICAMP, Campinas, SP

** CRI - Concentrated Rust Inhibiting Germicide.

de infusão *.

As amostras de sangue foram coletas aos zero, 5, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos após o início da infusão e utilizadas para a dosagem de glicose no soro.

Paralelamente, outros ratos, após anestesia com éter etílico, foram submetidos a adrenalectomia bilateral. Após três horas da cirurgia, os animais foram anestesiados com Inoval, recebendo sob infusão contínua durante 30 minutos, glicose, glicose mais gentamicina ou ainda glicose, gentamicina mais gluconato de Ca^{2+} (0,063 mg/kg de peso/min). A quantidade de cálcio utilizada permitiu elevar a concentração de cálcio sérico para valores entre 10 e 15 mg/100 ml. As amostras de sangue foram coletadas nos tempos idênticos aos descritos acima, para a dosagem de glicose e cálcio no soro. A adrenalectomia foi realizada para eliminar em parte a ação das catecolaminas durante o "stress" cirúrgico.

2.4. DOSAGEM DE GLICOSE E Ca^{2+} SÉRICOS

A dosagem de glicose foi realizada pela técnica da Ortotoluidina (Reagente 900-A, Doles Reagentes Químicos). Para a dosagem de cálcio usou-se a técnica da titulação por EDTA (Reagente para determinações de Cálcio - Labtest, Labtest Sistemas Diagnósticos - Ltda, MG).

* Injection Apparatus Palmer - England.

2.5. DOSAGEM DE INSULINA NO SORO

Em tubos de ensaio numerados, foram colocados 100 μ l de cada amostra de soro de rato para a dosagem de insulina. Para a curva de referência, colocu-se 100 μ l de solução padrão de insulina porcina nas seguintes concentrações, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 e 20.0 μ U de insulina por 100 μ l. Além desses tubos foram preparados os Brancos, que recebeu 200 l de tampão veronal e o zero insulina, que recebeu 100 μ l de tampão veronal.

Em seguida, em todos os tubos de ensaio (exceto nos Brancos), adicionou-se 100 μ l de anticorpo anti-insulina porcina*, diluídos em tampão veronal e misturados em agitador. Após três horas de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 100 μ l de 125 I-Insulina** (200 a 240 μ Ci) g, aproximadamente 1,2 μ U/100 μ l), diluídos em uma solução de tampão veronal. A mistura foi agitada e incubada por mais três horas à temperatura ambiente.

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 as especificações de DESBUQUOIS e AURBACH (1971).

Assim, decorridas as três horas de incubação após a adição da insulina marcada acrescentou-se aos tubos da curva de referência, 100 μ l de soro isento de insulina "strip" e 1,0 ml de solu

* GPAIS - Anticorpo anti-insulina ((Wright); cedida gentilmente pelos Drs. W.J. Malaisse e A. Herchuelz - Bélgica.

** 125 I-Insulina - New England Nuclear, Corp. (Boston, Mass.) IPEN-USP, cedida gentilmente pelo Dr. Julio Kieffer; Lab. de Carboidratos da FMUSP - cedida gentilmente pelo Dr. A. A. Pupo e insulina do nosso próprio laboratório.

ção de PEG a 20% (m/v) misturando-se em agitador e centrifugou-se a 800 g por 15 minutos em centrífuga não refrigerada. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade contida no precipitado lida em contador gama (GAMACORD - AMES, Co.).*

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 de referência, branco e zero insulina, foram sempre executados em duplicatas. Para os cálculos, a radiação (contagens por minuto - CPM) média dos brancos foi descontada de todos os tubos, com exceção do total. A radiação de cada ponto da curva das amostras foi referida percentualmente à radiação média do zero insulina, resultando na relação B/Bo**. A curva de referência foi traçada dispondo-se B/Bo versus concentração de insulina, ambos em escala logarítmica. Os valores foram expressos em μ U de insulina por 1 ml de soro.

2.6. 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 horas e centrifugando-se várias vezes até que o soro se apresentasse límpido. Armazenou-se em vidros a -20°C.

* Cedido gentilmente pelo Dr. Gilberto Assunção, HC-UNICAMP.

** Relação geralmente expressa em porcentagem, entre a radioatividade (cpm) do precipitado da amostra ou ponto da curva e a radioatividade do zero insulina.

*** Amend Drug Chemical, Irvington, Nj - USA.

**** Pharmacia Fine Chemical - Uppsala, Suécia.

REAGENTES UTILIZADOS

TAMPÃO VERONAL pH 8,6

Solução estoque:

Barbital sódico	29,428 g
Acetato sódico	19,428 g
H ₂ O destilada (q s p)	1000 ml

Solução para uso:

Estoque	50 ml
HCl a 0,1 N	50 ml
NaCl	7,650 g
H ₂ O destilada (q s p)	1000 ml

Todas as soluções no momento de uso, foram adicionadas 2% (m/v) de albumina bovina fração V (Sigma Chemical Co. , St. Louis, Mo.)

SOLUÇÃO DE PEG a 20%

PEG - 6000 *	20 g
Tampão Veronal	100 ml

Misturar durante 30 minutos, até dissolver totalmente. Acer tar o pH para 8,6 por adição de NaOH a 1 N. Sua temperatura foi reduzida para 4°C antes do uso.

* PEG - 6000 cedida gentilmente pela Atlas Indústrias Quími cas, SP.

2.8. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Cálculo do valor de K

O valor de K é calculado pela seguinte fórmula:

$$K = \frac{0,693}{t_{1/2}}$$

onde:

K = é a constante de desaparecimento da glicose

0,693 = $\ln 2$

$t_{1/2}$ = é o tempo necessário para desaparecer a metade da glicose sanguínea (LUNDBAEK, 1962).

Na avaliação da significância estatística usou-se o teste t de Student, admitindo-se níveis de significância de 5%. Todos os dados foram submetidos ao programa Média-For Del System 10, realizado no terminal de computador do próprio Departamento.

3. RESULTADOS

3.1. EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM GENTAMICINA E TOBRAMICINA SOBRE O GANHO DE PESO DE RATOS CONTROLES E TRATADOS.

A Figura I mostra o ganho de peso dos animais tratados com gentamicina durante 15 dias. Nos ratos do grupo controle e tratados com 5 mg/kg/dia do antibiótico, houve ganho de peso entre o início e o final do tratamento com valores de $239,0 \pm 8,6$ g e $274,3 \pm 10,3$ (p < 0,0025). Os animais tratados com 10 mg/kg/dia não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre o início e o fim do tratamento enquanto que os animais tratados com 50 mg/kg/dia perderam peso, com valores de $259,3 \pm 3,4$ e $234,6 \pm 5,5$ g (p < 0,001).

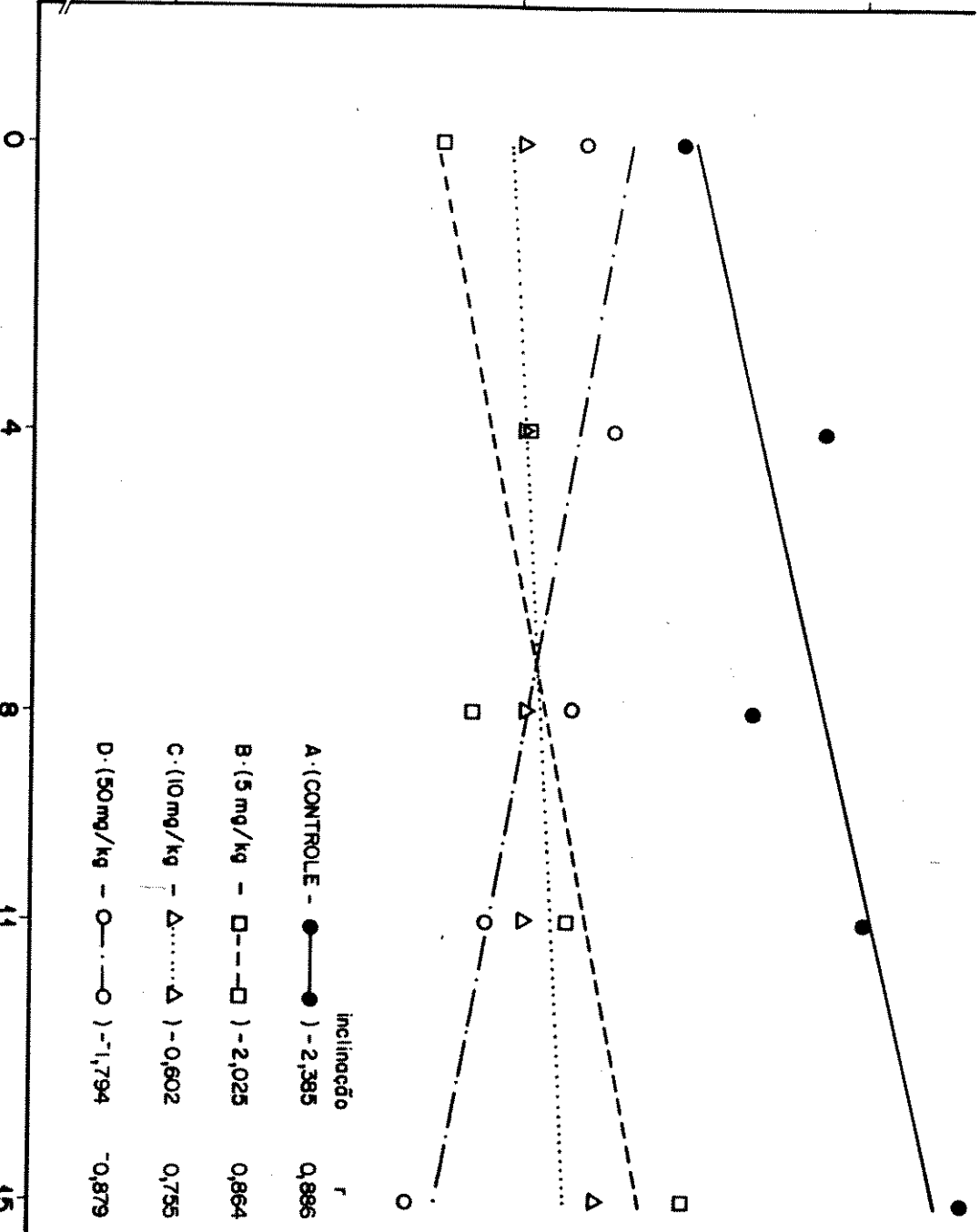
Quanto aos animais tratados com tobramicina (Figura II) observou-se ganho significativo de peso nos animais que receberam 50 mg/kg/dia, entre o início e o final do tratamento, com valores de $167,5 \pm 5,2$ e $239,9 \pm 3,4$ g (30 dias) (p < 0,001). Os animais tratados com 200 mg/kg/dia perderam peso, com valores de $160,3 \pm 5,6$ e $135,9 \pm 3,9$ g entre o início e o 89 dia de tratamento. (p < 0,001) e os controles e tratados com 100 mg/kg/dia não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

3.2. EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM GENTAMICINA OU TOBRAMICINA SOBRE A GLICEMIA DE JEJUM.

A Figura III mostra a evolução da glicemia de ratos tratados cronicamente com gentamicina. Observou-se que doses diárias de 5.0 e 50.0 mg/kg de peso/dia de gentami

GRAMAS

200 250 300



0 4 8 11 15

DIAS

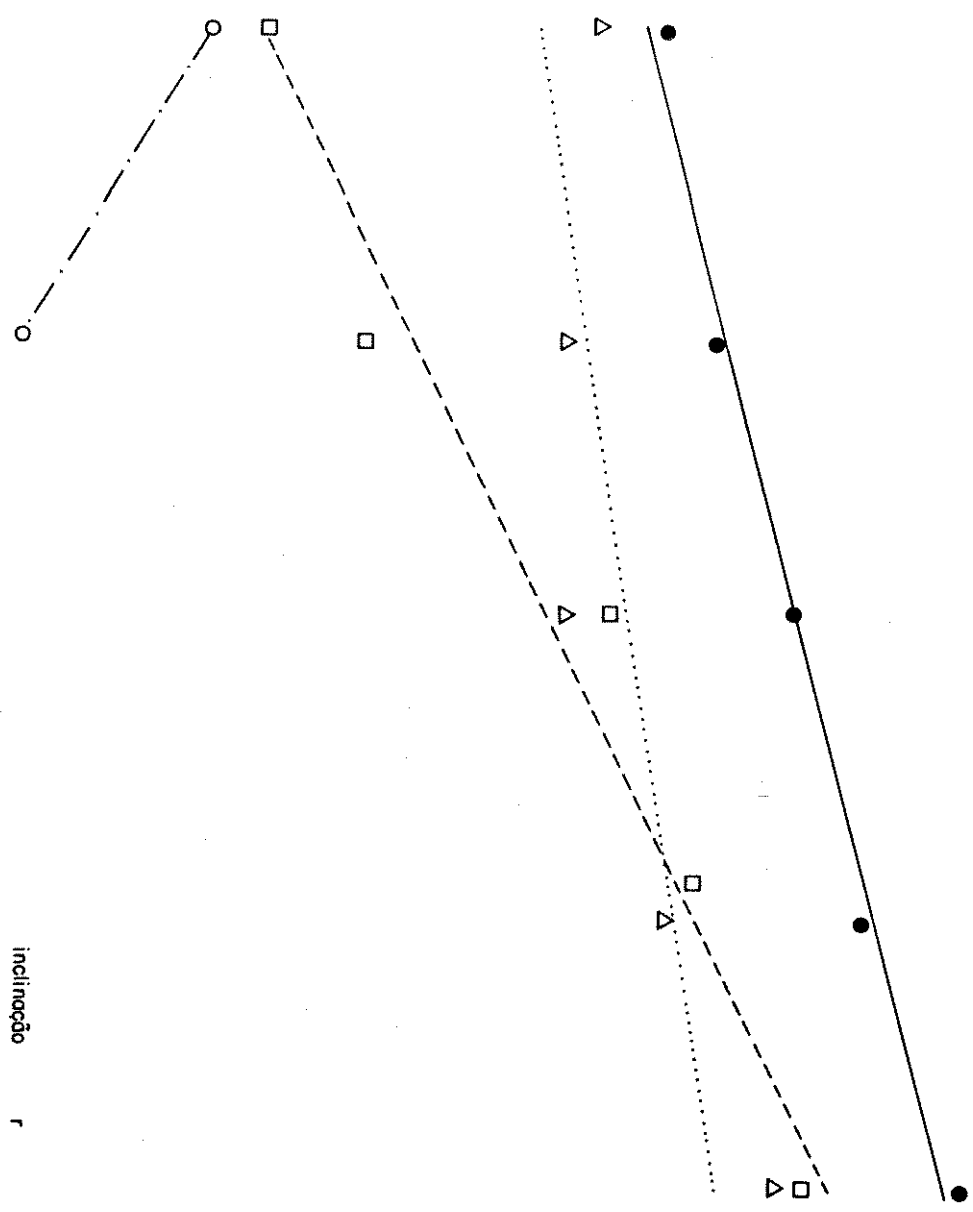
● - 2,395 0,996
□ - 2,025 0,864
△ - 0,602 0,755
○ - 1,794 -0,879

inclinação r

FIGURA I - Peso dos animais controles (A) e tratados (B,C e D) com Gentamicina durante 15 dias. As retas foram obtidas por regressão linear com base nos valores experimentais verificados no início, 8º e 15º do tratamento. (n = 7)

GRAMAS

250
200
150
100



Inclinação r

A (CONTROL - ● -) - 1,331 0,990

B (50 mg / kg - □ - - - □) - 2,507 0,983

C (100 m kg - Δ - ····· Δ) - 0,801 0,815

D (200 m kg - ○ - - - ○) - 1,288 -1,000

FIGURA II. Peso dos animais controles (A) e tratados (B, C e D) com Tobramicina durante 30 dias. As retas foram obtidas por regressão linear com base nos valores experimentais verificados no início, 15º e 30º do tratamento. (n = 4).

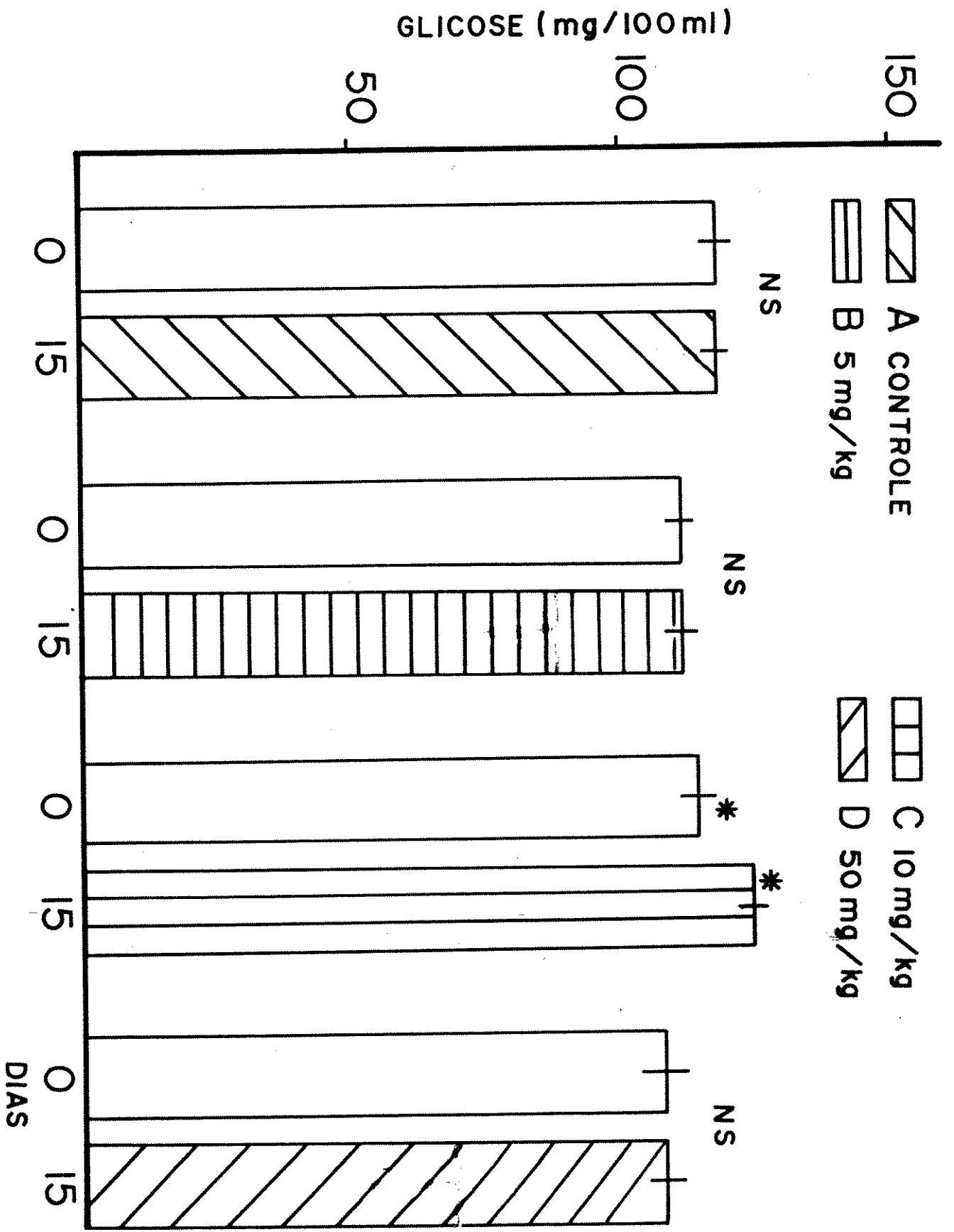


FIGURA III. Glicemia de jejum de ratos antes e após 15 dias de tratamento com Gentamicina. Os valores representam as mêcias \pm êrro padrão de 7 determinações. As colunas em branco representam os respectivos controles.

* ($p < 0,005$) em relação aos controles.

cina não alterou a glicemia de jejum ($p > 0,70$), enquanto aqueles que receberam doses de 10.0 mg/kg de peso/dia, mostraram diferenças estatisticamente significativas entre a glicemia analisada no início e após 15 dias do tratamento, com valores de $114,0 \pm 3,1$ ($n = 6$) e $124,0 \pm 2,6$ ($n = 6$) mg/%, respectivamente ($p < 0,005$).

Quanto aos ratos tratados com tobramicina, observou-se glicosúria e hematúria naqueles animais que receberam doses de 200,0 mg/kg de peso/dia do antibiótico. Os ratos deste grupo morreram a partir do 7º dia do tratamento. Entretanto, os valores de glicemia de jejum dos ratos deste grupo (medida no início e no 8º dia de tratamento) e daqueles tratados com 50,0 e 100,0 mg/kg de peso/dia (Figura IV) não evidenciaram alterações quando comparados com a glicemia no início do tratamento. ($p > 0,10$).

3.3. EFEITO DE UMA SOBRECARGA DE GLICOSE (IVGTT) SOBRE A GLICEMIA DE RATOS TRATADOS COM GENTAMICINA OU TOBRAMICINA E INSULINEMIA DE RATOS TRATADOS COM TOBRAMICINA.

No 15º dia de tratamento com gentamicina ou tobramicina, os animais foram submetidos ao IVGTT (1.0 g de glicose/kg de peso). Não observou-se nenhuma alteração nas respostas à esta sobrecarga nos ratos tratados com 5.0, 10.0 e 50.0 mg/kg de peso/dia de gentamicina (Figura V), quando comparados com os animais do grupos controle ($p < 0,50$). Quanto aos ratos tratados com tobramicina, houve diferenças estatisticamente significantes após 15 minu-

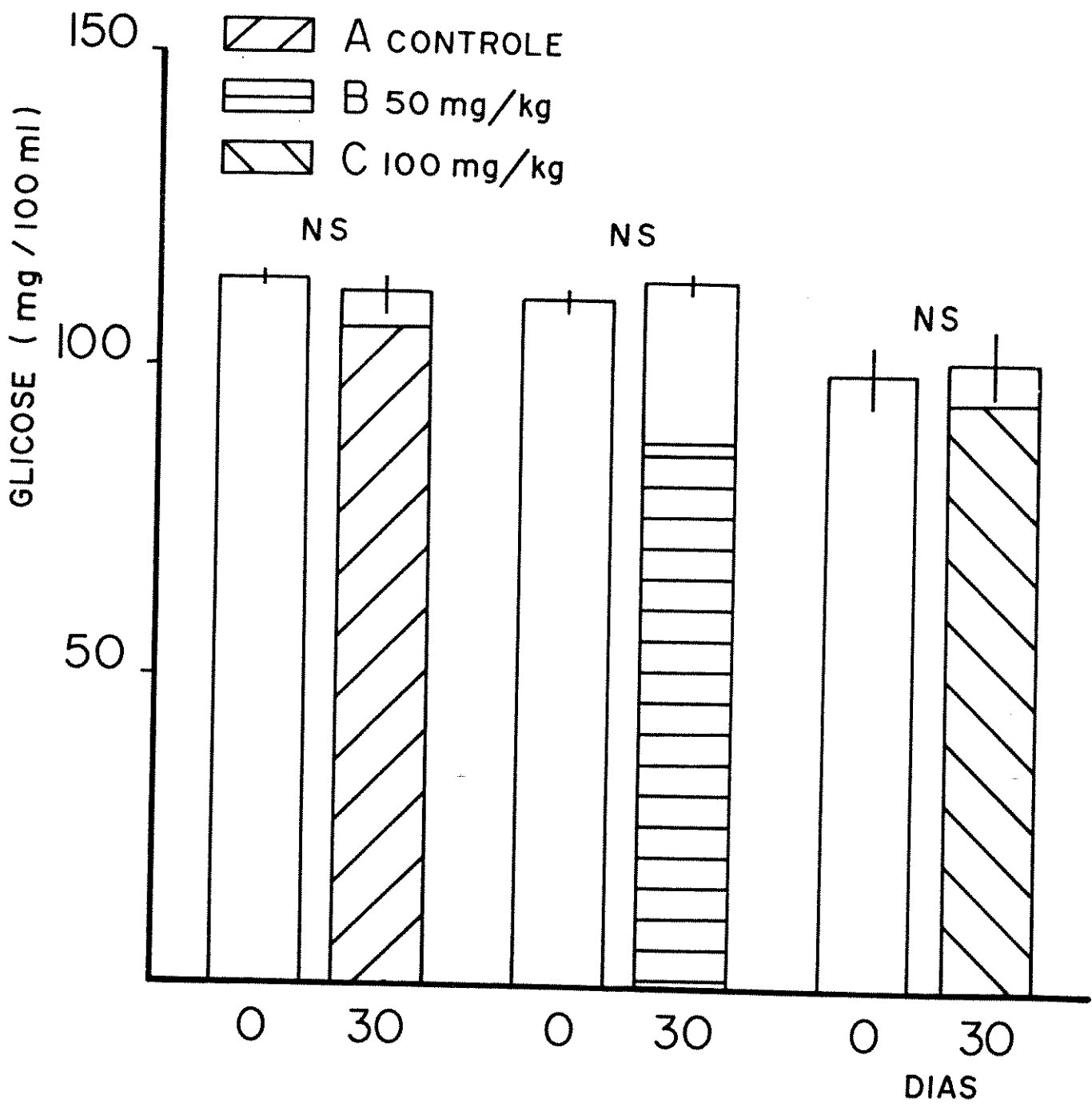


FIGURA IV. Glicemia de jejum de ratos antes e após 30 dias de tratamento com Tobramicina. Os valores representam as médias \pm erro padrão de 4 determinações.

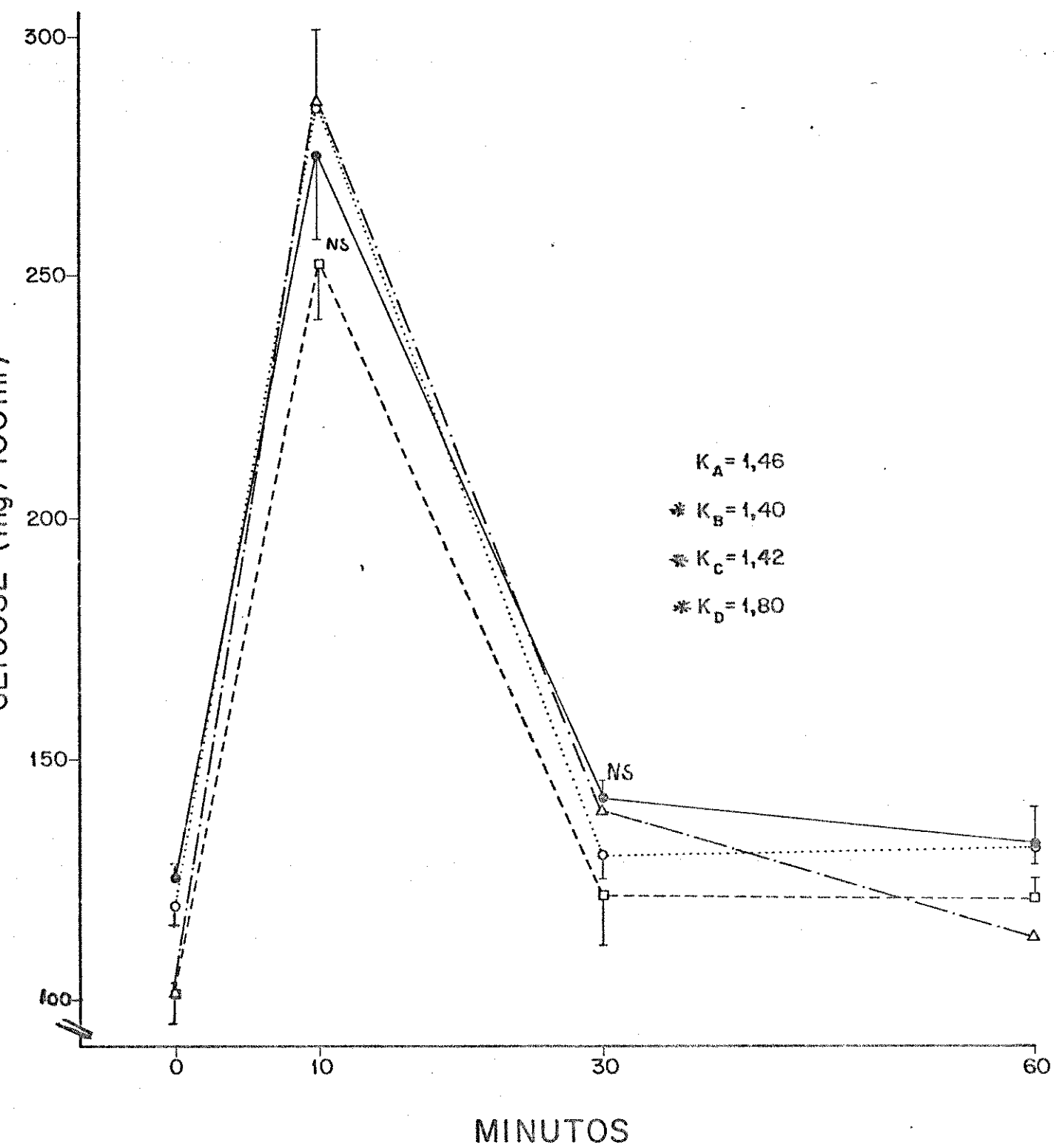


FIGURA V. Efeito da Gentamicina sobre a glicemia dos animais submetidos ao IVGTT realizado no 15º dia do tratamento. Grupo A (controle ●—●) grupo B (5mg/kg ◻ - - - ◻) grupo C (10 mg/kg ◦.....◦) grupo D (50 mg/kg (Δ —. —. —. Δ). Os pontos representam as médias ± erro padrão de 7 determinações. Os valores de K representam a diminuição da taxa de açúcar sanguíneo em porcentagem por minuto. (LUNDBAEK, 1962).

* ($p > 0,50$) em relação ao controle.

tos da administração de glicose, entre o grupo controle e os tratados com 50.0, 100.0 e 200.0 mg/kg de peso/dia, como mostra a Figura VI. Nos animais do grupo de 200 mg/kg de tobramicina, o IVGTT foi realizado no 89 dia de tratamento. Esta Figura mostra ainda, os valores de K para as curvas de glicemia obtidas durante o IVGTT.

A análise da insulinemia dos animais durante o IVGTT (Figura VII) revelou um retardo na secreção de insulina nos ratos tratados com tobramicina em relação aos controles. Os valores observados após 15 minutos da administração da glicose, foram $69,6 \pm 4,8$ ($n = 4$) e $43,2 \pm 5,0$ ($n = 7$) $\mu\text{U/ml}$ e aos 60 minutos, de $42,0 \pm 7,2$ ($n = 4$) e $25,0 \pm 3,9$ ($n = 10$) $\mu\text{U/ml}$, para os ratos dos grupos controles e tratados com 100.0 mg/kg de peso/dia, respectivamente ($p < 0,005$ aos 15 e $p < 0,01$ aos 60 minutos).

Aos 30 dias do tratamento com tobramicina, foi realizado um segundo teste de tolerância à glicose (Figura VIII). Após 15 minutos da administração da glicose observou-se diferenças estatisticamente significativas entre a glicemia dos ratos do grupo controle e os ratos tratados com 100 mg/kg de peso/dia com valores de glicemia $197,6 \pm 10,7$ e $155,5 \pm 4,0$ mg/100 ml respectivamente ($p < 0,002$). Aos 30 minutos houve diferenças significativas entre a glicemia dos animais tratados com 50.0 e 100.0 mg/kg de peso/dia em relação aos animais controles ($147,5 \pm 5,5$; $164,4 \pm 8,1$ e $124,0 \pm 5,3$ mg/100 ml para controle, 50 e 100 mg de tobramicina, respectivamente). ($p < 0,005$) e aos 60 minutos, a diferença foi significativa en

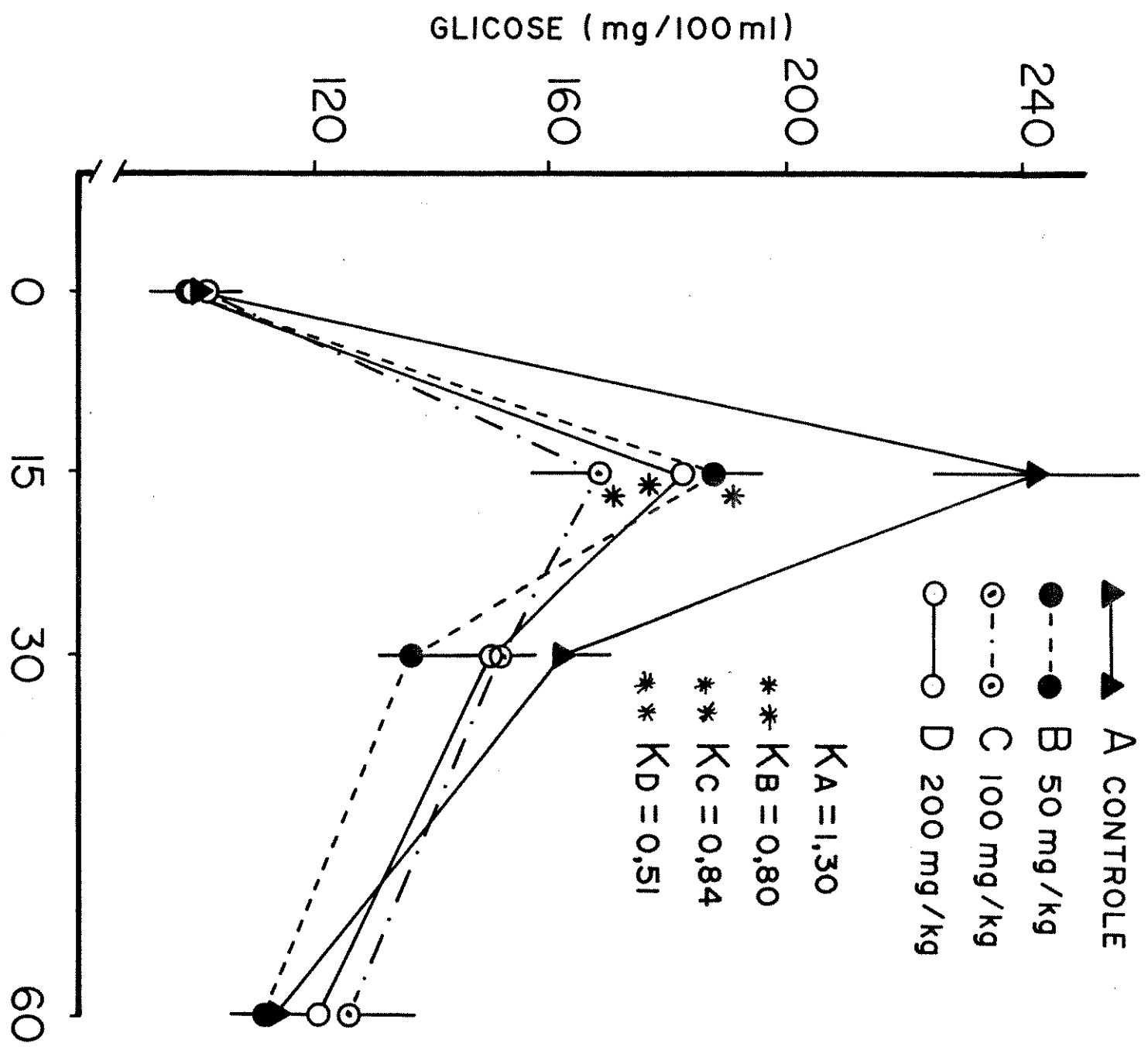


FIGURA VI. Efeito da Tobramicina sobre a glicemia de ratos submetidos ao IVGTT no 15º dia de tratamento. Os valores representam as médias \pm erro padrão de 4 determinações.

* ($p < 0,05$)

** ($p > 0,05$) em relação ao controle.

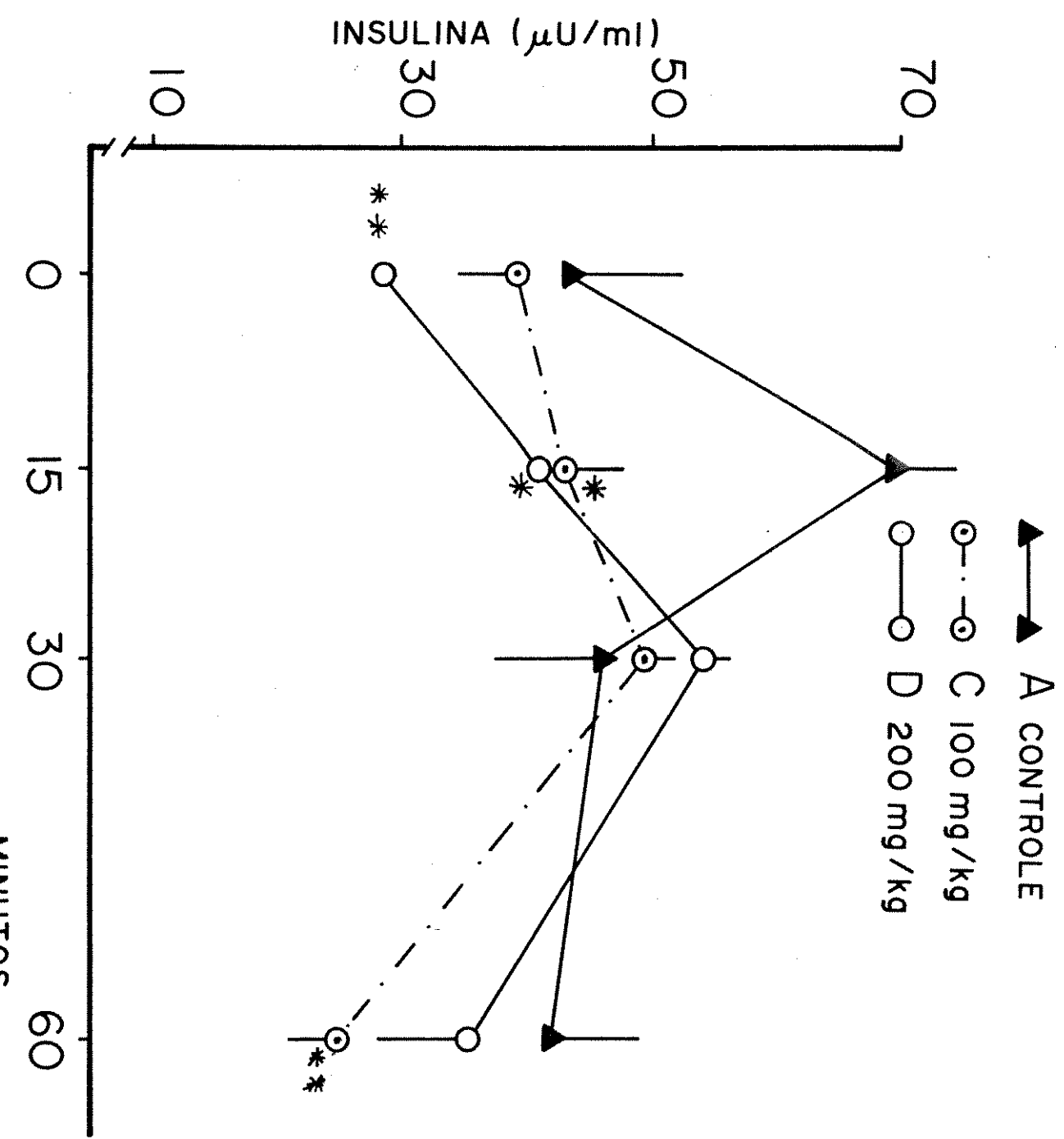


FIGURA VII. Efeito da Tobramicina sobre a insulinemia de ratos durante o IVGTT realizado no 15º dia do tratamento. Os valores representam a média \pm erro padrão de 4 determinações.

* ($p < 0,05$) e

** ($p > 0,001$) em relação aos controles.

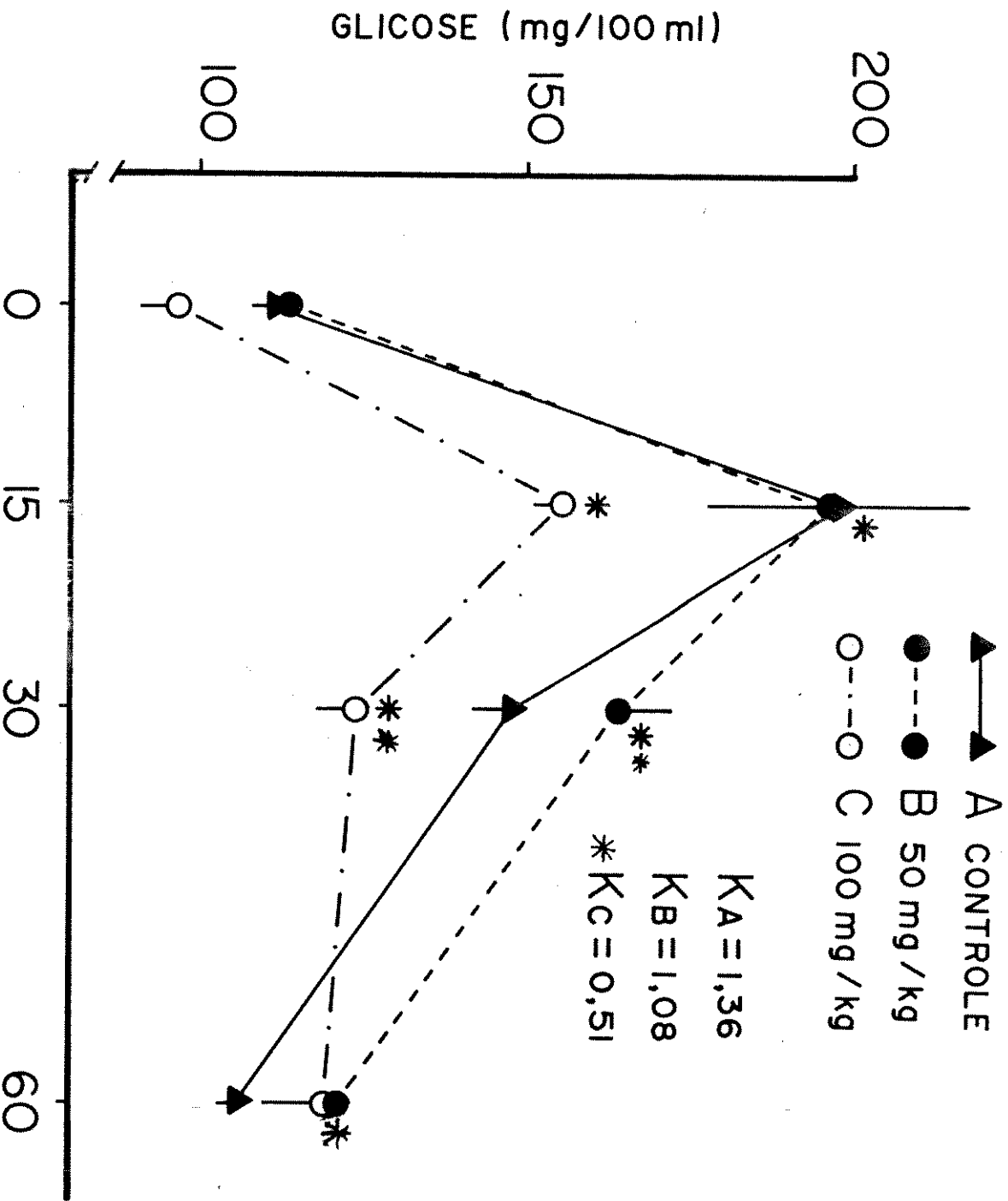


FIGURA VIII. Efeito da Tobramicina sobre a glicemia dos animais submetidos ao IVGTT realizado no 30º dia do tratamento. Os valores representam a média \pm erro padrão de 4 determinações.

* ($p < 0,02$) e

** ($p > 0,005$) em relação aos controles

tre os animais controles e os que receberam 50.0 mg/kg de peso/dia ($105,4 \pm 1,8$ e $121,0 \pm 1,5$ mg/100 ml). ($p < 0,02$).

3.4. EFEITO DO TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA SOBRE A GLICEMIA DE RATOS TRATADOS COM GENTAMICINA E TOBRAMICINA.

No 17º (ratos tratados com gentamicina) e no 33º dia (ratos tratados com tobramicina) foram realizados testes de tolerância à insulina (1 U/kg de peso, IP). Pelas Figuras IX e X nota-se que após a administração da insulina houve uma acentuada hipoglicemia tanto nos ratos tratados com gentamicina quanto naqueles com tobramicina com relação aos controles. Amostras de sangue coletadas aos 10, 30 e 60 minutos após a injeção da infusão, dos ratos tratados com gentamicina (com exceção do grupo de 5 mg/kg aos 30 min) revelaram diferenças estatisticamente significativas ($106,7 \pm 8,6$; $74,3 \pm 4,3$; $72,2 \pm 9,1$ e $84,8 \pm 6,6$ mg/100 ml aos 10 min; $83,6 \pm 8,3$; $67,9 \pm 3,4$; $40,6 \pm 3,9$ e $59,6 \pm 4,7$ mg/100 ml aos 30 min e $93,3 \pm 4,1$; $45,5 \pm 3,7$; $55,7 \pm 5,9$ e $51,1 \pm 3,7$ mg/100 ml aos 60 min, para controles, 5, 10 e 50 mg de gentamicina). ($p < 0,05$) em relação aos tempos correspondentes da curva glicêmica dos ratos controles. Quanto aos tratados com 50 e 100 mg de tobramicina (com exceção da glicemia 15 minutos após a injeção de insulina nos ratos tratados com 50 mg) todos os outros pontos também revelaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação aos grupos controles. Após 60 minutos da administração de insulina, somente os animais do grupo controle apresentaram valores de glicemia idênticos aqueles observados antes da realização do refe-

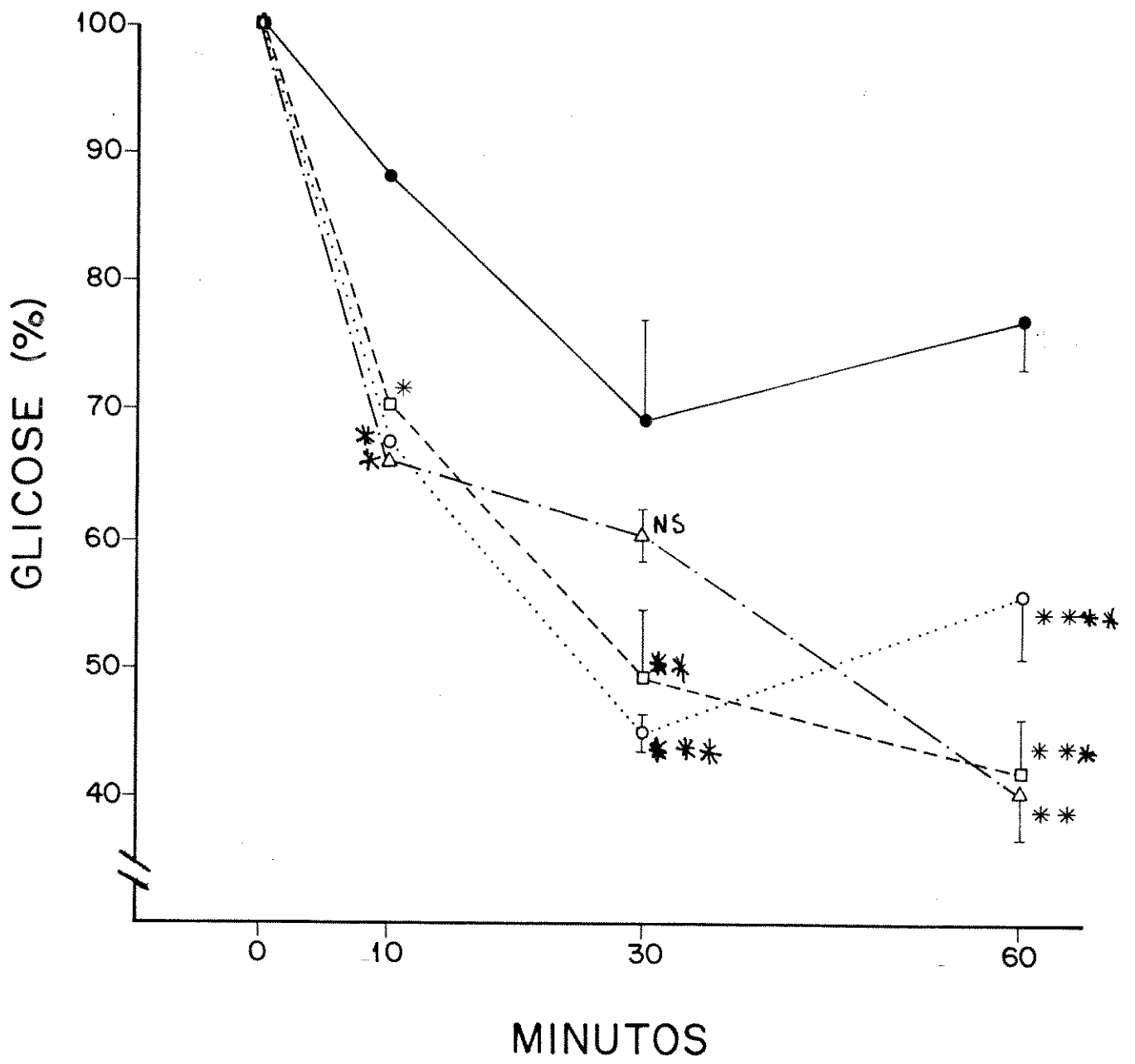


FIGURA IX. Teste de Tolerância à insulina (1U/Kg de peso, I. P.) realizado em ratos controles e tratados com Gentamicina durante 17 dias. Grupo A (controle ●—●) Grupo B (5 mg/kg ▲—▲) Grupo C (10 mg/kg ○.....○) Grupo D (50 mg/Kg ▣---▣) As médias e os respectivos erros padrões foram transformados em porcentagens, considerando-se os valores da glicemia inicial como 100% (n = 7).

* (p < 0,01)

** (p < 0,05)

*** (p < 0,001)

**** (p < 0,005) em relação aos controles.

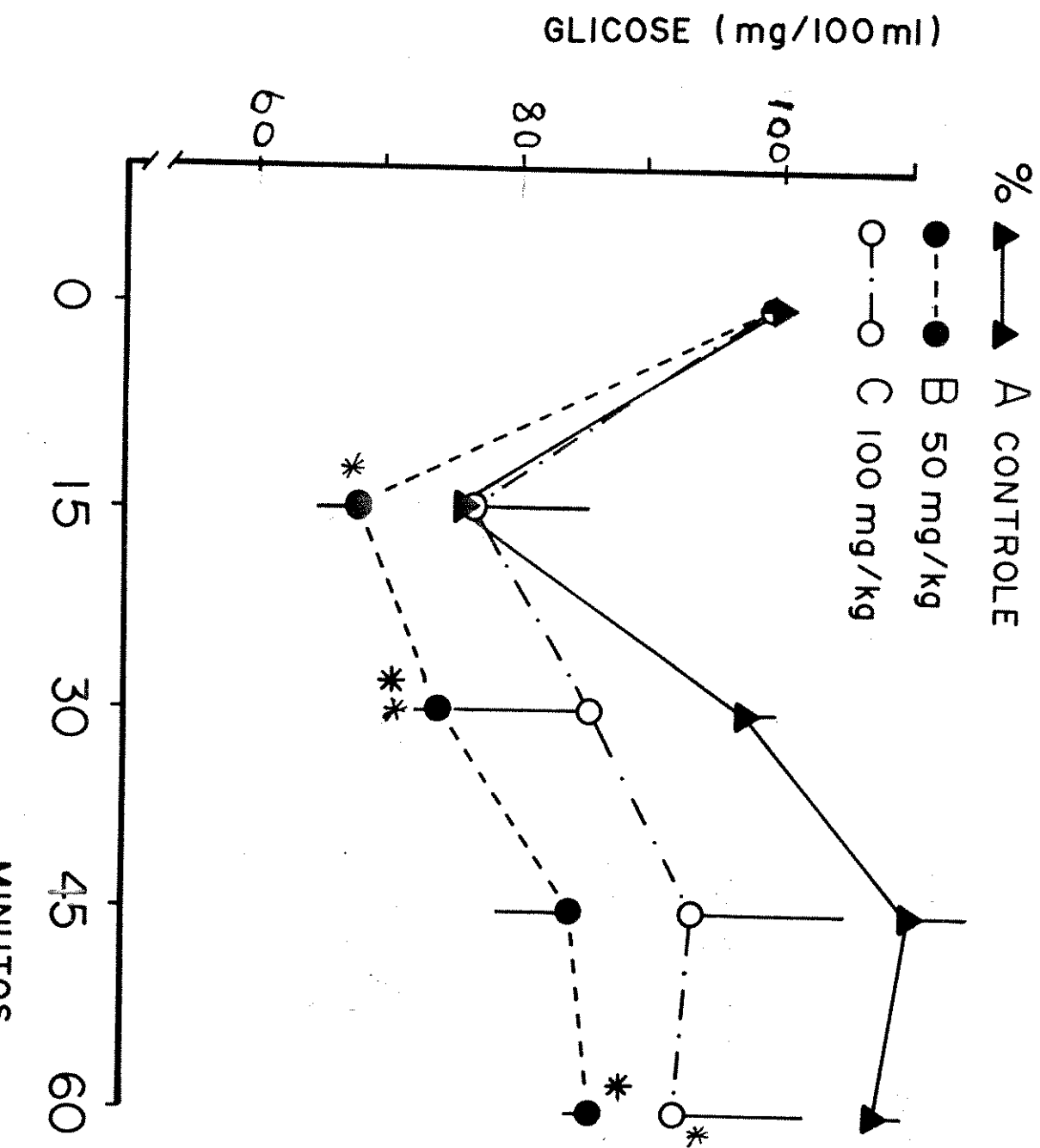


FIGURA X. Teste de Tolerância à insulina (IU/Kg de peso, I. P.) realizado em ratos controles e tratados com Tobramicina durante 33 dias. As médias e os erros padrões foram transformados em porcentagens, considerando-se os valores da glicemia inicial como 100% (n = 4).

* (p < 0,05) e

** (p < 0,02) em relação aos controles.

rido teste.

3.5. EFEITO DA INFUSÃO CONTÍNUA DE GLICOSE, GLICOSE MAIS GENTAMICINA E GLICOSE, GENTAMICINA MAIS GLUCONATO DE CÁLCIO, SOBRE A GLICEMIA DE RATOS NORMAIS OU ADRENALECTOMIZADOS.

Em outra série de experimentos, ratos normais foram submetidos a uma sobrecarga de glicose (50.0 mg/kg de peso/min, durante 30 minutos) sob infusão contínua acompanhada ou não de gentamicina (2.0 mg/kg de peso/min) (Figura XI). Os valores de K calculados foram de 3,01 e 0,73 para os controles (somente glicose), infundidos com gentamicina, respectivamente ($p < 0,05$). Figura XI.

A Figura XII mostra a evolução da glicemia de ratos previamente adrenalectomizados e tratados com glicose, glicose mais gentamicina e glicose mais gentamicina mais gluconato de cálcio (0,063 mg/kg de peso/min). Os valores de K das curvas de IVGTT apresentadas pelos animais controles, tratados com gentamicina e com gentamicina mais gluconato de cálcio, atingiram respectivamente, 3,1; 1,96 e 3,01 sendo as diferenças estatisticamente significativas somente entre o grupo controle e tratados com gentamicina ($p < 0,05$). Os valores de cálcio medidos durante a infusão de 8,8; 12,9; 14,9 e 15,0 mg/100 ml para os tempos zero, 10, 30 e 60 min respectivamente.

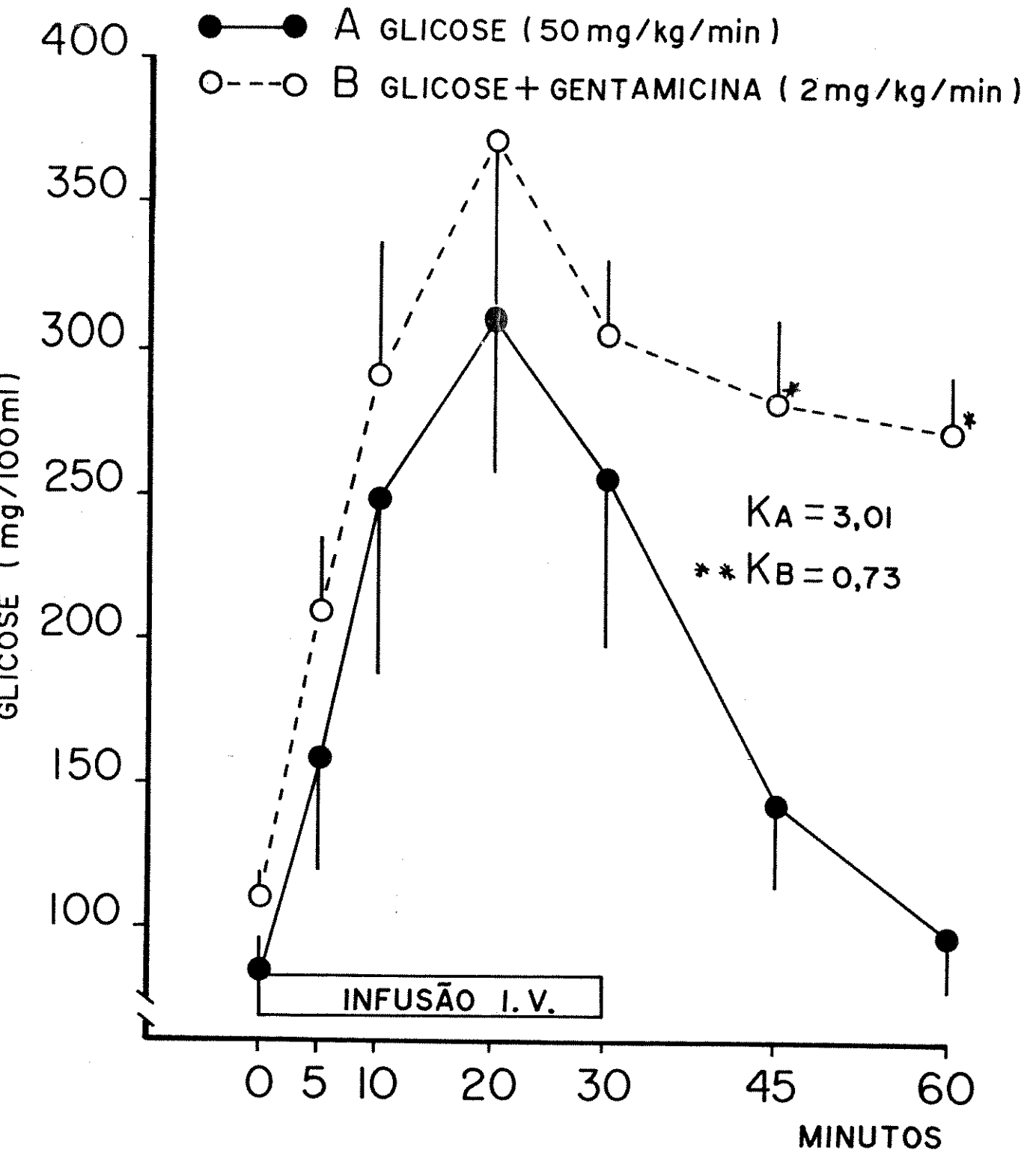
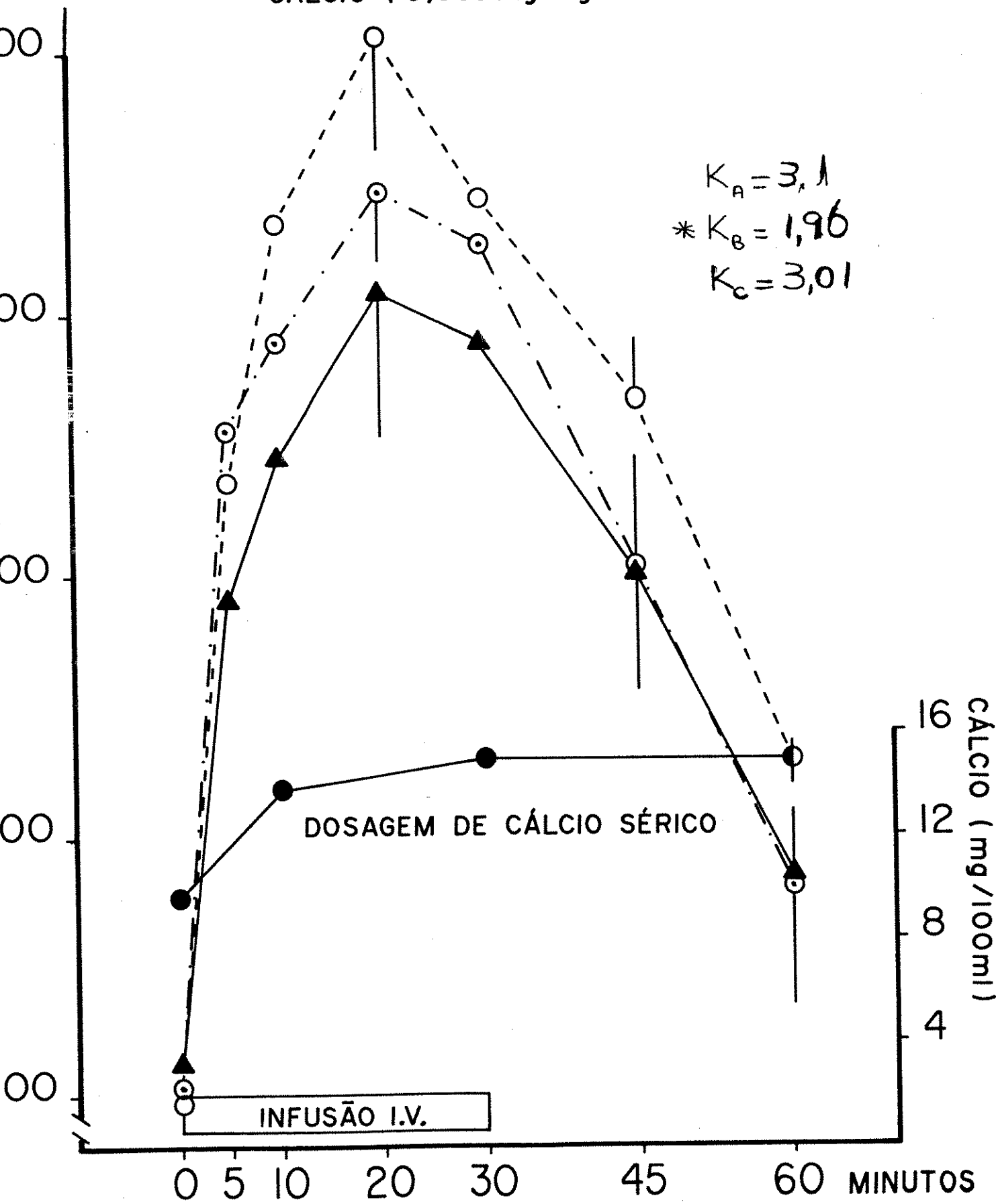


FIGURA XI. Efeito da Gentamicina sobre a evolução da glicemia de ratos anestesiados e infundidos com glicose (50 mg/Kg/min), associado ou não com Gentamicina (2 mg/Kg/min) por 30 minutos. Os valores representam as médias \pm erro padrão de 4 determinações.

* ($p < 0,02$) e

** ($p < 0,05$) em relação aos controles.

- ▲—▲ A CONTROLE (GLICOSE) 50 mg/kg/min
- B GLICOSE + GENTAMICINA (2 mg/kg/min)
- C GLICOSE + GENTAMICINA + GLUCONATO DE CÁLCIO (0,063 mg/kg/min)



CÁLCIO (mg/100ml)

MINUTOS

FIGURA XII. Efeito da Gentamicina sobre a evolução da glicemia de ratos anestesiados (previamente adrenalectomizados) e infundidos com glicose (50 mg/Kg / min), glicose mais Gentamicina (2 mg/kg/min) e ainda glicose + Gentamicina + gluconato de Ca^{++} (0,063 mg/Kg/min) durante 30 minutos. Os valores representam as médias \pm erro padrão de 4 determinações. A Figura mostra também a dosagem de cálcio, durante a infusão no grupo C.

* ($p < 0,05$) em relação aos controles.

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo analisar as possíveis influências dos antibióticos aminoglicosídicos sobre a glicemia de ratos. Tal proposição baseou-se no fato de que, através de antagonismo com íons Ca^{2+} , alguns desses antibióticos inibem a transmissão neuromuscular (VITAL-BRAZIL e PRADO-FRANCESCHI, 1969a e b; PITTINGER e ADAMSON, 1972; ALBIERO, BAMONTE, ONGINI e PARRAVICINI, 1978) ; a contração dos músculos lisos (PIMENTA-DE-MORAIS *et alii*, 1978) e esqueléticos (SUAREZ-KURTZ, 1974); vários parâmetros cardiovasculares (PAYET, BKAILY, SCHANNE e CERETI, 1980) bem como, a secreção de insulina por ilhotas isoladas e incubadas "in vitro" (DELATTRE, 1981; BOSCHERO, DELATTRE e SANTOS, 1981; DELATTRE, SANTOS e BOSCHERO, 1982). Sugeriu-se também, que as ações nefrotóxicas e ototóxicas produzidas "in vivo" por estes antibióticos estejam ligados ao referido antagonismo ao Ca^{2+} (HSU, KURTZ, EASTERLING e WELLER (1974); FAIRHURST e MACRI, 1975; SCHENTAG e JUSKO (1977)).

A ação dos antibióticos aminoglicosídicos sobre a glicemia de ratos foi abordada através de duas séries diferentes de experimentos.

a) Inicialmente, avaliou-se sua ação durante e após o tratamento crônico que constou da administração IM de doses diárias de gentamicina (zero, 5, 10 e 50 mg/kg/dia, durante 17 dias) ou tobramicina (zero, 50, 100 e 200 mg/kg/dia, durante 30 dias). Essas concentrações foram semelhantes às utilizadas por inúmeros pesquisadores (CHAN,

BERNER e HOEPRICH, 1972; WELLES, 1973; HSU *et alii*, 1974 e BENNETT, HARTNETT, GILBERT, HOUGHTON e PORTER, 1976).

- b) Numa segunda etapa, analisou-se os efeitos dos antibióticos aminoglicosídicos durante e após infusão contínua de gentamicina (2 mg/kg/min, durante 30 minutos) sobre a glicemia de ratos anestesiados e submetidos a uma sobrecarga de glicose (50 mg/kg/min, por igual período) (SHA-BAN, 1974).

4.1. EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM GENTAMICINA OU TOBRAMICINA

Em relação aos diversos parâmetros analisados durante o tratamento crônico com gentamicina ou tobramicina, observa-se pelas Figuras I e II que os animais tratados com 10 mg de gentamicina, em relação ao ganho de peso, tiveram comportamento semelhante aos ratos do grupo controle, o mesmo ocorrendo com os animais tratados com 50 e 100 mg de tobramicina. O ganho de peso apresentado pelos ratos tratados com 5 mg de gentamicina, em relação aos animais do grupo controle, pode ser explicado pela diferença de peso entre os referidos grupos no início do período de experimentação. As Figuras I e II mostram também que os animais tratados com 50 mg de gentamicina ou com 200 mg de tobramicina perderam peso durante o tratamento. Estes dados estão de acordo com os resultados relatados por WELLES (1973) que observou perda de peso associado a um número grande de óbitos nos ratos tratados com 160 mg de tobramicina e em cães

tratados com 40 mg de gentamicina.

Como os antibióticos aminoglicosídicos, são excretados quase que exclusivamente por filtração glomerular (CHAN, 1972; APPEL e NEU, 1977). A glicosúria e a hematúria observada nos animais tratados com 200 mg de tobramicina podem ser consequência de lesões renais provocadas por estes antibióticos, como observados por WELLES (1973).

A análise da glicemia de jejum, não evidenciou alterações significativas ($p > 0,70$) durante o tratamento com os referidos antibióticos, exceto no grupo que recebeu 10 mg de gentamicina, cuja glicemia foi de 10% superior no final do período experimental. Figura III. ($p < 0,05$). Apenas a insulinemia de jejum dos ratos tratados com 200 mg de tobramicina, após 8 dias, foi significativamente menor ($p < 0,001$) que a insulinemia dos ratos controles e/ou tratados com 100 mg de tobramicina após 15 dias. (Figura VII). Tais resultados indicam que o tratamento crônico com antibióticos aminoglicosídicos, mesmo em doses 10 a 20 vezes mais elevadas que aquelas tidas como efetivas para o tratamento de infecções no homem (RODRIGUEZ, BODEY, VALDIVIESO, 1975; REYMANN, BRADAC, COBBS, DISMUKES, 1979) não alteram significativamente a glicemia de jejum dos animais. Isto vem reforçar a hipótese de que o tratamento crônico com estes antibióticos, a exemplo de outros antagonistas de cálcio (DEVIS *et alii*, 1975; MALAISSE *et alii*, 1976 a e b; YAMAGUCHI *et alii*, 1977; MALAISSE e BOSCHERO, 1977) apresentam menor potência de inibição da secreção de insulina "in vivo" do que "in vitro" (YAMAGUCHI *et alii*, 1979; DE MARINIS *et alii*, 1980 e GIUGLIANO *et alii* 1981). Esta suposição é reforçada pela análise das curvas

de tolerância à glicose as quais não evidenciaram diferenças ($p > 0,50$) entre os ratos do grupo controle e aqueles tratados com gentamicina (Figura V). Quanto aos tratados com tobramicina, observou-se um dado interessante. Após 15 minutos da administração da glicose, os animais controles apresentaram glicemia significativamente maior (Figura VI) que os ratos tratados. Esta diferença de glicemia é de difícil interpretação, porém, poderia ser explicada por um aumento (temporário?) da perda de glicose através da urina, uma vez que os animais tratados com altas doses destes antibióticos costumam apresentar lesões renais (WELLES, 1973). Talvez isto explique também as diferenças entre os valores de K nos diversos grupos analisados. Os valores de insulina medidos durante o GTT, revelaram uma resposta retardada em relação à glicemia nos animais tratados com 100 e 200 mg de tobramicina, durante o mesmo período. Este retardo associado às diferenças nos valores de K (Figura VI) evidenciam uma resposta deteriorada das células beta.

A realização de testes de tolerância à insulina, 17 dias após o tratamento com gentamicina e 33 dias após o tratamento com tobramicina revelaram hipoglicemia acentuada nos animais tratados com relação aos controles (Figura IX e X). Tal fato, poderia ser explicado por um aumento da sensibilidade periférica à insulina nos ratos tratados. A hipótese do aumento da sensibilidade periférica (e/ou número de receptores periféricos à insulina) apoia-se nos resultados de De FRONZO, HENDER e SIMONSON, 1982. Assim uma redução da insulinemia basal de animais tratados, embora

não suficiente para alterar a glicemia de jejum, poderia ser suficiente para induzir um aumento da sensibilidade periférica a insulina.

4.2. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE GENTAMICINA

O efeito da gentamicina sobre a glicemia de ratos anestesiados foi também evidenciada através da infusão contínua (via I.V.), por 30 minutos, desse antibiótico (2 mg/Kg/min) associado à administração de glicose (50 mg/Kg/min) por igual período de tempo.

Tal experimento foi desenvolvido, para permitir durante alguns minutos, uma concentração elevada de gentamicina no plasma, pelo menos dez vezes maior em relação a aquelas indicadas na literatura (CHAN *et alii*, 1972).

Através dos valores de K, observados para os animais controles, em relação aos tratados com gentamicina, verificamos uma deterioração da resposta à sobrecarga de glicose (Figura XI). Contudo, esta deterioração foi menos acentuada quando se procedia a adrenalectomia prévia dos animais. Estes experimentos evidenciam uma possível inibição, induzida pela gentamicina sobre a secreção de insulina com reflexos nos níveis de glicose plasmática.

A exacerbação da deterioração da resposta à sobrecarga de glicose, nos animais tratados com gentamicina não adrenalectomizados em relação aos adrenalectomizados (Figura XI e XII), poderia ser explicada por um aumento dos níveis de catecolaminas circulantes nos primeiros, aumento es-

te provocados pelo "stress" cirúrgico. A ação hiperglicemiante das catecolaminas é bem conhecida, estando os nossos resultados de acordo com o inúmeros outros pesquisadores (SHABAAN, 1974; GERICH, LORENZI, TSALIKIAN e KARAN, 1976 e WOODSON, BEE e POTTER, 1980). Entretanto devemos salientar que, embora atenuada, a piora da resposta à sobrecarga de glicose nos animais adrenalectomizados e tratados com gentamicina é patente, o que afasta a possibilidade do efeito ser exclusivamente devido a secreção aumentada de catecolaminas. A observação de que os animais adrenalectomizados e tratados com gentamicina apresentaram curva glicêmica semelhante aos controles após o aumento da concentração sérica de Ca^{2+} , (Figura XII), comprova definitivamente a existência de um antagonismo entre os antibióticos aminoglicosídicos e os referidos íons a nível de membrana plasmática das células betas, como observados "in vitro" (BOSCHERO *et alii* 1981; DELATTRE *et alii*, 1981).

Embora os níveis séricos de Ca^{2+} , nos animais tratados e controles que não receberam infusão deste íon, estivessem normais, este antagonismo entre os antibióticos e o Ca^{++} a nível de membrana, simula uma hipocalcemia. Aliás LITTLEDIKE *et alii* (1968) e WITZEL e LITTLEDIKE, (1978) observaram uma resposta deteriorada a uma sobrecarga de glicose em animais hipocalcêmicos, resposta esta corrigida quando os níveis de Ca^{++} sérico foram elevados até os valores normais. Dando suporte à idéia de que a resposta normal a uma sobrecarga de glicose depende de um nível crítico de Ca^{2+} circulante, KEATING e SETHI (1977) cha-

maram a atenção para o fato de que disfunções no controle dos níveis de Ca^{2+} , pode às vezes induzir erros na avaliação desses testes. Assim indivíduos apresentando hipocalcemia poderiam ser enquadrados como pré-diabéticos ou mesmo diabéticos.

Finalizando, estes resultados confirmam experimentos "in vitro" (com ilhotas isoladas) de que os antibióticos aminoglicosídicos podem inibir também "in vivo" a secreção de insulina e conseqüentemente deteriorar a resposta a uma sobrecarga de glicose. Tudo indica que esta inibição se manifesta através de competição com os íons Ca^{++} a nível de membrana plasmática das células beta. Entretanto, a exemplo de outros antagonistas de Ca^{++} (verapamil e diltiazem) a ação inibidora desses antibióticos em termo de secreção de insulina, é muito menor "in vivo" do que "in vitro".

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo analisar as possíveis influências dos antibióticos aminoglicosídicos gentamicina e tobramicina sobre a glicemia de ratos normais.

Basicamente dois protocolos experimentais foram desenvolvidos:

- a) tratamento crônico com gentamicina (zero, 5, 10 e 50 mg/kg/dia) e com tobramicina (zero, 50, 100 e 200 mg/kg/dia) durante 17 e 33 dias respectivamente;
- b) tratamento agudo com gentamicina, que constou da infusão contínua do referido antibiótico (2 mg/kg/min) em associação com glicose (50 mg/kg/min) associado ou não à administração de gluconato de cálcio (0,063 mg/kg/min) por período equivalente.

Os animais tratados com 50 mg de gentamicina perderam peso durante o período de experimentação. Alteração da glicemia de jejum somente foram observadas naqueles que receberam 10 mg de gentamicina, embora nenhuma alteração da resposta à sobrecarga de glicose em relação aos controles, tenha sido observada.

Nos ratos tratados cronicamente com 200 mg de tobramicina observou-se hematúria e glicosúria bem como alterações de insulinemia de jejum, associadas a perda de peso e morte dos animais.

A resposta à sobrecarga de glicose esteve de

teriorada em todos os grupos tratados com tobramicina.

Todos os animais tratados com gentamicina ou tobramicina, apresentaram maior sensibilidade a um teste de tolerância à insulina, evidenciado por hipoglicemias mais acentuadas e prolongadas em relação aos controles.

Nos experimentos agudos, com infusão contínua de glicose, glicose mais gentamicina ou glicose mais entamicina mais gluconato de cálcio, evidenciou-se que: i) ratos não adrenalectomizados e infundidos com gentamicina apresentaram resposta mais deteriorada à sobrecarga de glicose em relação aos tratados e adrenalectomizados, ii) o aumento da concentração de Ca^{++} no plasma resultou numa melhora sensível da resposta à sobrecarga de glicose nos animais tratados com gentamicina.

Os resultados obtidos permite-nos concluir que, a exemplo, daqueles "in vitro":

- a) gentamicina e tobramicina inibem também "in vivo" a secreção de insulina;
- b) a inibição observada parece ser através de competição com íons Ca^{++} a nível de membrana plasmática;
- c) a inibição "in vivo" induzida pelos antibióticos apresentam menor potência quando comparados com aqueles observados "in vitro" utilizando-se ilhotas isoladas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALBIERO, L.; BAMONTE, F.; ONGINI, E. and PARRAVICINI, L. Comparison of neuromuscular effects and acute toxicity of some aminoglycoside antibiotics. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 233:343-350,1978.
02. APPEL, G.B. and NEU, H.C. The nephrotoxicity of antimicrobial agents. *The New England J. of Med.*, 296(13):722-728,1977.
03. ATWATER, I.; DAWSON, C.M.; RIBALET, B. and ROJAS, E. Potassium permeability activated by intra cellular calcium ion concentration in the pancreatic β -cell. *J. Physiol.*, 288:575-588,1979.
04. BENNETT, W.M.; HARTNETT, M.N.; GILBERT, D.; HOUGHTON, D. and PORTER, G.A. Effect of sodium intake on gentamicin nephrotoxicity in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 151:736-738,1976.
05. BOSCHERO, A.C.; DELATTRE, E. and SANTOS, M.L. Inhibition of insulin release by the aminoglycoside antibiotic sisomicin. *Horm. Metabol. Res.*, 13(9): 531-532,1981.
06. CERASI, E.; EFENDIC, S.; THORNQUIST, C. and LUFT, R. Effect of two sulphonylureas on the dose kinetics of

- glucose-induced insulin release in normal and diabetics subjects. *Acta Endocrinologica* 91(2):282-293 , 1979.
07. CHAN, P.A.; BENNER, E.J. and HOEPRICH, P.D. Gentamicin therapy in renal failure: a nomogram for dosage. *Annals of Internal Med.*, 76:773-778, 1972.
08. CORRADO, A.P. Respiratory depression due to antibiotics : calcium in treatment. *Anesth. Analog. Curr. Res.*, 42: 1-5, 1963.
09. CURRY, D.L.; BENNETT, L.L. and GRODSKY, G.M. Requirement for calcium ion in insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Am. J. Physiol.*, 214:174-178 , 1968.
10. De FRONZO, R.A.; HENDLER , R. and SIMONSON, D. Insulin resistance is a prominent feature of insulin - dependent diabetes. *Diabetes*, 31: 795-801, 1982.
11. DELATTRE, E. Efeitos de antibióticos aminoglicosídicos da família da Gentamicina sobre a secreção de insulina. Tese de Mestrado, Unicamp, 1981.
12. DELATTRE, E.; M.L. SANTOS and A.C. BOSCHERO. Effect of Gentamycin upon insulin release and ⁴⁵Ca net uptake by isolated islets. *Experientia* (in press), 1982.

13. De MARINIS L. and BARBARINO, A. Calcium antagonists and hormone release. I. Effects of verapamil on insulin release in normal subjects and patients with islet - cell tumor. *Metabolism Clin. and Exp.* 29(7):599-604 , 1980.
14. DESBUQUOIS, B. and AURBACH, G.D. Use of polyethylene - glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. *J. Clin. Endocrin. Me tabol.*, 33:732-738,1971.
15. DEVIS, G.; SOMERS, G.; Van OBBERGHEN, E. and MALAISSE , W.J. Calcium antagonists and islet function. I. Inhibition of insulin release by verapamil *Diabetes*, 24:547-551,1975.
16. ——— ; ——— and MALAISSE, W.J. Dynamics of calcium-induced insulin release. *Diabetologia*, 13:531 - 536,1977.
17. FAIRHUST, A.S. and MACRI, J. Aminoglycoside Ca^{++} interactions in skeletal muscle preparations. *Life Sci.*, 16:1321-1330,1975.
18. FRANKEL, B.J.; KROMHOUT, J.A.; IMAGAWA, W.; LANDAHL, H. D. and GRODSKY, G.M. Glucose-stimulated ^{45}Ca uptake in isolated rat islets. *Diabetes*, 27:365-369,1978.
19. GEDIK, O. and ZILELI, M.S. Effects of hypocalcemia and

- theophylline on glucose tolerance and insulin release in human beings. *Diabetes*, 26(9):813-819, 1977.
20. GERICH, J.E.; LORENZI, M.; TSALIKIAN, E. and KARAN, J.A. Studies on the mechanism of epinephrine induced hyperglycemia in man. Evidence for participation of pancreatic glucagon secretion. *Diabetes*, 25(1): 65 - 71, 1976.
21. GINGLIANO, D.; GENTILE, S.; VERZA, M.; PASSARIELLO, N. ; GIANNETTI, G. and VARRICCHIO, M. Modulation by verapamil of insulin and glucagon secretion in man. *Acta Diabetologica Lat.*, 18:163-171, 1981.
22. GRODSKY, G.M. and BENNETT, L.L. Insulin secretion from the isolated pancreas in absence of insulinogenesis : effect of glucose. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 114: 769-771, 1963.
23. ——— and ———. Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas. *Diabetes*, 15:910-913, 1966.
24. GRODSKY, G.M.; LANDAHL, H.; CURRY, D. and LAMBERT, L.L. In vitro studies suggesting a two compartmental model for insulin secretion. In: S. FALKMER, S.; B. BELLMAN and I.B. TALJEDAL (Eds.). *Structure and metabolism of the pancreatic islets*. Oxford: Pergamon, 1970, p. 409-420.

25. HEDESKOV, C.J. Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiol. Rev.*, 60:442-509,1980.
26. HELLERSTRÖM, C. A method for the microdissection of intact pancreatic islets of mammals. *Acta endocr. Copenhagen*, 45:122-132,1964.
27. HELLMAN, B.; SEHLIN, J. and TALJEDAL, I.B. Calcium uptake by pancreatic β -cells as measured with the and of ^{45}Ca and manitol ^3H . *Am. J. Physiol.*, 221: 1795-1801,1971.
28. HELLMAN, B. Stimulation of insulin release after raising extracellular calcium. *Febs Letters*, 63: 125 - 128,1976.
29. ———. Calcium and pancreatic β -cell function. 3. Validity of the Ra^{+3} wash technique for discriminating between superficial and intracellular ^{45}Ca . *Biochem. Biophys. Acta*, 54:534-542,1978.
30. HENQUIN, J.C. and LAMBERT, A.E. Cobalt inhibition of insulin secretion and calcium uptake by isolated rat islet. *Amer. J. Physiol.*, 228(6): 1669-1677,1975.
31. ———. Opposite effects of intracellular Ca^{2+} and glucose on K^{+} permeability of pancreatic islet cells. *Nature*, 280:66-68,1979.

32. HERCHUELZ, A.; THONNART, N.; CARPINELLI, A.; SENER, A. e MALAISSE, W.J. Regulation of calcium fluxes in rat pancreatic islets: The role of K^+ conductance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 215:213-220,1980.
33. HSU, C.H.; KURTZ, T.W.; EASTERLING, R.E. and WELLER, J. M. Potentiation of Gentamicin nephrotoxicity by metabolic acidosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 146:894-897,1974.
34. KEATING, M.J.; SETHI, M.R.; BODEY, G.P. and SAMAAAN, N. A. Hypocalcemia witer hypoparathyroidism and renal tubular dysfunction associated with aminoglycoside therapy. *Cancer*, 39:1410-141,1977.
35. KIKUCHI, M.; C.B. WOLLHEIM, G.S. CUENDET, A.E.; RENOLD and W.G. SHARP. Studies on the dual effects of glucose on $^{45}\text{Ca}^{+2}$ efflux from isolated rat islets. *Endocrinology*, 102:1339-1349,1978.
36. —————; —————; SIEGEL, E.G.; RENOLD, A.E. and SHARP, W.G. Biphasic insulin release in rat islets of Langerhans and the role of intracellular Ca^{++} stores. *Endocrinology*, 105(4):1013-1019,1979.
37. LACY, P.E. e KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, 16:35-39, 1967.

DC/19834

38. ————. Beta cell secretion—from the stand point of a pathobiologist. *Diabetes*, 19:895-905,1970.
39. ———— ; WALKER, M.M. e FINK, C.J. Perifusion of isolated rat islets "in vitro" - Participation of the microtubular system in the biphasic release of insulin. *Diabetes*, 21:987-998,1972.
40. LAMBERT, A.E.; JUNOD, A.; STAUFFACHER, W.; JEAN-RENAUD, B. e 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.)*, 184:529-539,1969.
41. LISH, H.J.; BOLZANO, K.; PATSCH, J.; SAILER, S. and BRAUNSTEINER, H. Interaction between serum calcium concentration and glucose tolerance in normal and azotaemic patients. *Diabetologia*, 9(6):467-471,1973.
42. LITTLEDIKE, E.T.; WITZEL, D.A. and WHIPP, S.C. Insulin: evidence for inhibition of release in spontaneous hypocalcemia. *Proc. soc. exp. Biol.*, 129:135-139,1968.
43. LODHI , S.; WEINER N.D. and SCHACHT, J. Interactions of neomycin and calcium in synaptosomal membranes and polyphosphoinositide mono-layers. *Biochim. Biophys. Acta*, 426:781-785, 1976.
44. LUNDBAEK, K. Intravenous glucose tolerance as a tool

- in definition and diagnosis of diabetes mellitus.
Brit. Med. J., 5291(6):1507-1513, 1962.
45. MALAISSE, W.J.; MALAISSE-LAGAE, F. e KING, S. Quantitative and qualitative aspects of islets function in the rat. *J. Lab. Clin. Med.*, 71:56-64,1968.
46. MALAISSE-LAGAE, F. and MALAISSE, W.J. Stimulus - secretion coupling of glucose-induced insulin release. III. Uptake of ^{45}Ca by isolated islets of Langerhans. *Endocrinology*, 88:72-80,1971.
47. MALAISSE, W.J.; Van OBBERGHEN, E.; DEVIS, G.; SOMERS, G. and RAVAZZOLA, M. Dynamics of insulin release and microtubular-microfilamentous system. V. A model for the phasic release of insulin. *Europ. J. Clin. Invest.*, 4:313-318,1974.
48. ——— ; DEVIS, G.; HERCHUELZ, O.; SENER, A. and SOMERS, G. Calcium antagonists and islet function. VIII. The effect of magnesium. *Diabete & Metabol.*, Paris, 2: 1-4,1976.
49. ——— ; DEVIS, G.; PIPELEERS, D.G. and SOMERS, G. Calcium-antagonists and islet function. IV. Effect of D-600. *Diabetologia*, 12:77-81,1976.
50. ——— ; SENER, A.; DEVIS, G. and SOMERS, G. Calcium-

- antagonists and islet function. V. Effect of R33711. *Horm. Metabol. Res.*, 8(6):434-438,1976.
51. MALAISSE, W.J. Calcium-antagonists and islet function . X. Effect of suloctidil. *Arch. int. Pharmacodyn.* 228 (2):339-344,1977.
52. ——— and BOSCHERO, A.C. Calcium antagonists and islet function. XI. Effect of nifedipine. *Hormone Res.*, 8:203-209,1977.
53. ———. Séquence cytophysiologique de L'insulino- secretion. *Bull. Acad. Méd. Bel.*, 133:271-278,1978.
54. ———; SENER, A.; HERCHUELZ, A. e HUTTON, J.C. Insulin release: The fuel hypothesis. *Metabolism*, 28: 373-386,1979.
55. McDANIEL, M.L.; WEAVER, D.C.; ROTH, C.E.; FINK, C.J., SWANSON, J.A. and LACY, F.E. Characterization of the methylxanthines theophylline and caffeine in isolated pancreatic islets and their effect on D-glucose transport. *Endocrinology*, 101(6):1701-1708,1977.
56. MILNER, R.D.G. and HALES, C.N. The role of calcium and magnesium in insulin secretion from rabbit pancreas studied "in vitro". *Diabetologia*, 3:47-49,1967.
57. MOSKALEWSKI, S. Isolation and culture of the islets of

- Langerhans of the guinea pig. *Gen. Comparat. Endocrinol.*, 5:342-353,1965.
58. NABER, S.P.; McDANIEL, M.L. e LACY, P.E. The effect of glucose on the acute uptake and efflux of calcium- 45 in isolated rat islets. *Endocrinology*, 101:686-693 , 1977.
59. PAYET, M.D.; BKAILY, G.; SCHANNE, O.F. e RUIZ-CERETTI , E. Influence of streptomycin on spontaneous activity of clusters of cultured cardiac cells from neonatal rats. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, 58:433-435,1980.
60. 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(2):317-327, 1978.
61. PITTINGER, C. and ADAMSON, R. Antibiotic blockade of neuro muscular function. *Ann. Rev. Pharmacol.*, 12:169-184, 1972.
62. POPOVIC, V. and POPOVIC, P. Permanent cannulation of aorta and veia cava in rats and ground squirrels. *J. Appl. Physiol.*, 15(4):727-728,1960.
63. RAHWAN, R.G.; PIASCIK, M.F. and WITIAK, D.T. The role of calcium antagonism in the therapeutic action of

- drugs. *Can. J. Physiol. and Pharmacol.*, 57(5):443 - 460, 1979.
64. RANDLE, P.J. and HALES, C.N. Insulin release mechanisms. In: STEINER, D.F. & FREINKEL, N. (Eds.). *Handbook of Physiology: Endocrinology*, Washington, D.C. Amer. Physiol. Soc., Sect. 7, vol. 1, p.219-235, 1972.
65. REYMANN, M.T.; BRADAC, J.A.; COBBS, C.G. and DISMUKES, W.E. Correlation of aminoglycoside dosages with serum concentrations during therapy of serious gram-negative bacillary disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16:353-361, 1979.
66. RODRIGUEZ, V.; BODEY, G.P.; VALDIVIESO, M. and FELD, R. Clinical pharmacology of sisomicin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7:38-41, 1975.
67. SCHENTAG, J.J. and JUSKO, W.J. Renal clearance and tissue accumulation of Gentamicin. *Clin. Pharmacol. and Therapeutics*, 22(5): 365-370, 1977.
68. SHABAAN, A.; TURNER, D.S. and MARKS, V. The effect of adrenaline on insulin releasing polypeptide (IRP) mediated insulin release "in vivo" in the rat. *Diabetologia*, 10:475-478, 1974.
69. SOMERS, G.; DEVIS, G.; Van OBBERGHEN, E. and MALAISSE, W.J. Calcium antagonists and islet function. II. In-

- teraction of theophylline and verapamil. *Endocrinology*, 99:114-124, 1976.
70. SOMERS, G.; DEVIS, G.; Van OBBERGHEN, E. and MALAISSE, W.J. Calcium antagonists and islet function. VI. Effect of barium. *Pflügers Arch.*, 365:21-28, 1976b.
71. ———; ——— and MALAISSE, W.J. Calcium antagonists and islet function. IX. Is extracellular calcium required for insulin release? *Acta Diabet. Lat.*, 16:9-18, 1979.
72. SUAREZ-KURTZ, G. Inhibition of membrane calcium activation by neomycin and streptomycin in crab muscle fibers. *Pflügers Arch.*, 349:337-349, 1974.
73. SWAIN, H.H.; KIPLINGER, G.F. and BRODY, T.M. Actions of certain antibiotics on the isolated dog heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 117:151-159, 1956.
74. TURTLE, J.R.; LITTLETON, G.K. and KIPNIS, D.M. Stimulation of insulin secretion by theophylline. *Nature*, 213:727-728, 1967.
75. VITAL BRAZIL, O. and PRADO-FRANCESCHI, J. The neuromuscular blocking action of Gentamicin. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 179(1):65-77, 1969a.

76. ——— and ——— . The nature of neuromuscular block produced by neomycin and gentamicin. *Arch. int. Pharmacodyn.* 179(1):78-85,1969b.
77. WELLES, J.S.; EMERSON, J.L.; GIBSON, W.R.; NICKANDER, R. OWEN, N.V. and ANDERSON, R.C. Preclinical toxicology studies with Tobramycin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* , 25:398-409,1973.
78. WITZEL, D.A. and LITLEDIKE, E.T. Suppression of insulin secretion during induced hypocalcemia. *Endocrinology*, 93(4):761-766,1973.
79. WOLLHEIM, G.B.; KIKUCHI, M.; RENOID, A.E. and SHARP, G. W.G. The roles of intracellular and extracellular Ca^{++} in glucose-stimulated biphasic insulin release by rat islets. *J. Clin. Invest.*, 62:451-458,1978.
80. WOLLHEIM, C.B. and SHARP, W.G. Regulation of insulin release by calcium. *Physiol. Rev.*, 61(4):914-973, 1981.
81. WOOLSON, L.C.; BEE, D.E. and POTTER, D.E. Catecholamine induced hyperglycemia in dogs: independence from alterations in pancreatic hormone release. *Horm. Metab. Res.*, 12:434-439,1980.
82. YAMAGUCHI, I.; AKIMOTO, Y.; NAKAJIMA, H. and KYOMOTO ,

- A. Effect of diltiazem on insulin secretion. I. Experiments "in vitro". *Japan. J. Pharmacol.*, 27: 679 - 687, 1977.
83. _____ ; _____; _____ and _____. Effect of diltiazem on insulin secretion. II. Experiments on perfused rat pancreas, anesthetized dogs and conscious rats. *Japan. J. Pharmacol.*, 29:375-383, 1979.
84. YALOW, R.S. and BERSON, S.A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.*, 39: 1157 - 1175, 1960.