

Este exemplar corresponde a redação final  
da tese defendida pela candidata  
Silvia C. Crepaldi e aprovada pela  
comissão julgadora

SILVIA CRISTINA CREPALDI <sup>ntb</sup>

24/08/91



EFEITO DA PROLACTINA <sup>ntb</sup>  
SOBRE A RESPOSTA SECRETÓRIA À  
GLICOSE EM ILHOTAS PANCREÁTICAS  
DE RATOS RECÉM-NASCIDOS,  
MANTIDAS EM CULTURA

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

ORIENTADORA: Profa. Dra. Marta H. Krieger-Azollini <sup>elena</sup>

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero <sup>†</sup>

CAMPINAS

1991

14478  
BC/9109423  
C863e

14478  
BC/9109423  
14478/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

SILVIA CRISTINA CREPALDI

EFEITO DA PROLACTINA  
SOBRE A RESPOSTA SECRETÓRIA À  
GLICOSE EM ILHOTAS PANCREÁTICAS  
DE RATOS RECÉM-NASCIDOS,  
MANTIDAS EM CULTURA

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

ORIENTADORA: Profa. Dra. Marta H. Krieger-Azollini

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero

CAMPINAS

1991

### Ficha Catalográfica

Crepaldi, Silvia Cristina.

Efeito da prolactina sobre a resposta secretória à glicose em ilhotas pancreáticas de ratos recém-nascidos, mantidos em cultura/ Silvia Cristina Crepaldi.

- - Campinas, 1991.

Dissertação (Mestrado) Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Departamento de Fisiologia e Biofísica.

Área de Concentração: Fisiologia Endócrina.

Orientadora: Profa. Dra. Marta H. Krieger-Azollini.

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero.

Unitermos: 1. Prolactina. 2. Secreção de Insulina.

3. Ilhotas pancreáticas. 4. Ratos recém-nascidos.

5. Cultura.

UNICAMP/IB.

à minha *MAE*,

meu *PAI*

e meu *IRMAO*, por tudo que significam...

e que eu não saberia definir

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero, por ter me transmitido sua sabedoria de vida e seus conhecimentos científicos, por sua amizade, paciência, compreensão e participação ativa na execução deste trabalho.

A Profa. Dra. Marta Helena Krieger Azollini pela dedicação e auxílio na finalização da tese.

A Profa. Dra. Maria Edwiges Hoffmann e Profa. Dra. Marcela Haun, por cederem o laboratório de cultura de células, no Departamento de Bioquímica, para execução da cultura de ilhotas pancreáticas

Ao Prof. Dr. Antônio Ari Gonçalves, Prof. Dr. Rui Curi e Profa. Dra. Doris Falkenstein pela análise minuciosa da tese e sugestões consistentes na fase de pré-banca.

Ao Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira Araújo, Prof. Dr. Gilberto D'Assunção Fernandez e Profa. Dra. Regina Pisani, por permitirem a utilização de equipamentos em seus laboratórios.

Ao Prof. Edson Delattre pelo valioso auxílio na utilização da técnica de radioimunoensaio de insulina.

Ao Prof. Dr. Norair Salviano dos Reis, pela contribuição na análise histológica.

A Cláudia de Lourdes Soraggi, Maristela de Freitas Pereira, Maria Silvia Capucci, Anna Lia Morselli e Nadja Cristina de Souza Pinto, pelo auxílio no aprendizado da técnica de cultura de células e pela convivência amiga no Departamento de Bioquímica.

Ao Prof. Dr. Valter Pinto e aos funcionários da CULTILAB materiais para cultura de células, pelas sugestões no procedimento de cultura de ilhotas pancreáticas.

Ao Prof. Everardo Magalhães Carneiro pela amizade e incentivos constantes

A Profa. Maria Cristina Cintra Gomes, Profa. Dra. Cássia Thaís Bussamra Viera Zaia, Profa. Dra. Silvia Ponzoni e Prof. Dr. Luis Carlos Jabur Gaziri, por despertarem em mim o interesse por um laboratório de pesquisas.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, por contribuírem para o início da minha formação acadêmica.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UNICAMP, pelos ensinamentos e convivência agradável.

A Silvana A. Bordin, Fábio Villar de Menezes e Carlos Alberto da Silva, pela colaboração no laboratório de pâncreas endócrino.

A Maristela Zocca, Aglae Maria Bortolucci e Maria Aparecida Ribeiro de Carvalho Reis, pela montagem das lâminas e fotomicrografias.

Ao Léscio Domingues Teixeira, Maria Alice Berton Guadagnini, Dirce Lima Gabriel e Ivete Jesus Roque, pela eficiente assistência técnica.

Ao Roberto Stal, Laurione Candido de Oliveira, Davi Antônio da Silva, Izildinha Aparecida Machado, Lucia Maria Fagian, Glaucia Lorenzetti e Denise Rocha da Pita Lima de Moraes, pelo auxílio nas leituras dos radioisótopos.

A Luciana Martins Ribeiro, Miriam Cristina Alves, Sérgio Tostumi, Cláudia Barros Monteiro Vitorello, Vera Christina Bueno, Fádua Rosana Coelho, Alfredo Carlos Coletti, Maria do Carmo Silva, Marco Aurélio de Ávila Carneiro, Maria Ângela Paschoaleto, Silmara Frederico, Rosinei M. M. Dalácqua, Maria Alice C. de Oliveira, pela amizade e incentivos indiretos.

Aos companheiros de Pós-graduação, pelo apoio e amizade.

Ao Márcio Augusto Ribeiro de Paula e ao Centro de Bioterismo da UNICAMP, pelo fornecimento dos ratos recém-nascidos.

A Carmelina de Sácio, bibliotecária do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela correção das referências bibliográficas.

Ao Paulo Prado e Cristiana Begnami e a Suzete Maria Cerutti pelo trabalho de digitação.

As agências financiadoras CNPq, FAPESP e FAP, pelo suporte financeiro.

**OBRIGADA.**



## LISTA DE TABELAS

|                      |                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela I -</b>    | Efeito da retirada de glicose (min 42 a 60) e da reintrodução de 2,8 mM (min 62 a 80) sobre o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ de ilhotas controle .....                                   | 90 |
| <b>Tabela II -</b>   | Efeito da retirada da glicose e da reintrodução de 2,8 mM sobre o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ de ilhotas tratadas com PRL .....                                                       | 91 |
| <b>Tabela III -</b>  | Efeito do aumento da concentração de glicose de 2,8 para 8,3 mM (min 42 a 60) e da reintrodução de 2,8 mM (min 62 a 80) sobre o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ de ilhotas controle ..... | 92 |
| <b>Tabela IV -</b>   | Efeito do aumento da concentração de glicose de 2,8 para 8,3 mM e da reintrodução de 2,8 mM sobre o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ de ilhotas tratadas cronicamente com PRL .....        | 93 |
| <b>Tabela V -</b>    | Efeito da Tolbutamida (min 42 a 60) e efeito de sua remoção do meio perfusor (min 62 a 80) sobre o efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ de ilhotas controle .....                              | 94 |
| <b>Tabela VI -</b>   | Efeito da Tolbutamida e da sua remoção da solução perfusora sobre o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ de ilhotas cultivadas na presença de PRL .....                                        | 95 |
| <b>Tabela VII -</b>  | Efeito da Diazoxida (min 42 a 60) e efeito da sua remoção do meio perfusor (min 62 a 80) sobre o efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ de ilhotas controle .....                                | 96 |
| <b>Tabela VIII -</b> | Efeito da Diazoxida e da sua remoção da solução perfusora sobre o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ de ilhotas cultivadas na presença de PRL .....                                          | 97 |

Tabela IX - Efeito de 16,7 mM de glicose sobre o efluxo do  $^{45}\text{Ca}$  em ilhotas controle perfundidas na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  e presença de 0,5 mM de EGTA ..... 98

Tabela X - Efeito de 16,7 mM de glicose sobre o efluxo do  $^{45}\text{Ca}$  em ilhotas tratatadas com PRL perfundidas na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  e presença de 0,5 mM de EGTA ..... 99

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                |       |                                                                                                                                        |
|----------------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BG             | ----- | "Back Ground" ou radiação de fundo.                                                                                                    |
| cpm            | ----- | contagens por minuto                                                                                                                   |
| GH             | ----- | Hormônio de Crescimento                                                                                                                |
| KREBS          | ----- | Solução tampão bicarbonato de KREBS-RINGER                                                                                             |
| MAX            | ----- | Máximo ou número de cpm contidos em 1,0 ml<br>do meio de incubação utilizado nos<br>experimentos de incorporação de $^{45}\text{Ca}$ . |
| MEM            | ----- | Meio essencial mínimo                                                                                                                  |
| min            | ----- | minuto                                                                                                                                 |
| PL             | ----- | lactogênio placentário                                                                                                                 |
| PRL            | ----- | prolactina                                                                                                                             |
| T <sub>3</sub> | ----- | triiodotironina                                                                                                                        |

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                 | 1  |
| 2. OBJETIVOS .....                  | 12 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....         | 13 |
| 4. RESULTADOS .....                 | 31 |
| 5. DISCUSSÃO .....                  | 51 |
| 6. RESUMO E CONCLUSÕES .....        | 58 |
| 7. ABSTRACT .....                   | 60 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... | 62 |
| APÊNDICE .....                      | 89 |

## 1 . INTRODUÇÃO

É fato comprovado que a secreção de insulina por ilhotas fetais ou neonatais apresenta-se reduzida quando comparada à de animais adultos (ASPLUND et alii, 1975; BAXTER-GRILLO, 1981 apud MOURMEAUX et alii, 1985; AMMON et alii, 1985; BOSCHERO et alii, 1988; MOURMEAUX et alii, 1989; AMMON et alii, 1989).

A capacidade da glicose em estimular a secreção de insulina em ilhotas fetais é muito pequena, tanto em animais experimentais (ASPLUND et alii, 1969; MILNER, 1969; WILLES et alii, 1969; HEINZE & STEINKE, 1971; LAVINE et alii, 1971; HEINZE & STEINKE, 1972; SODOYEZ-GOFFAUX et alii, 1972; ASPLUND, 1973a; AMMON et alii, 1983) quanto em humanos (GRASSO et alii, 1968; OBENSHAIN et alii, 1970; PHELPS et alii, 1978). Todavia, a observação que algumas substâncias, tais como leucina, arginina (LAMBERT et alii, 1969; GRASSO et alii, 1973) e teofilina (LAMBERT et alii, 1971; KERVRAN & RANDON, 1980), induzem a secreção de insulina em ilhotas de feto, sugere que parte do mecanismo sensor se encontra desenvolvido no estado fetal. Segundo os trabalhos de SODOYEZ-GOFFAUX et alii (1979) e ROTHEN (1980), as células B fetais de rato, no 20º dia de gestação, já respondem a estímulos com uma grande variedade de agentes; tais como: glicose, leucina, arginina e somatostatina. Embora em menor grau, quando comparadas com as células B

adultas, estas células também são capazes de modular sua taxa secretória frente a estes agentes, de maneira dose-dependente. Apesar da glicose ser incapaz de promover o padrão de secreção típico da célula B adulta, as reservas de insulina são adequadas (SODOYEZ-GOFFAUX et alii, 1971) e o mecanismo biossintético está íntegro em células B fetais (ASPLUND, 1973b).

Em adultos, a estimulação por concentrações insulínótropas de glicose provoca uma resposta bifásica de secreção, ou seja, uma elevação inicial rápida, seguida de um aumento secundário lento, que permanece enquanto o secretagogo estiver presente (GRODSKY et alii, 1967; CURRY et alii, 1968; BURR et alii, 1969; CLEMENTS & RHOTEN, 1976). Estudos da dinâmica secretória durante o desenvolvimento do pâncreas de rato demonstram o aparecimento de secreção monofásica de insulina, no período compreendido entre o 17º e 20º dias de gestação (GIRARD et alii, 1974; RANDON & KERVRAN, 1979; KERVRAN & RANDON, 1980; RHOTEN, 1980). Embora o padrão bifásico de secreção tenha sido encontrado a partir do 21º dia de gestação (RANDON & KERVRAN, 1979; KERVRAN & RANDON, 1980), a quantidade de insulina liberada durante a 2ª fase de secreção foi extremamente reduzida, quando comparada a do pâncreas adulto. Estudos em humanos demonstram que o pâncreas fetal já é responsivo à glicose bem antes da 20ª semana de gestação, mas que o padrão bifásico de secreção de insulina aparece somente na fase pós-natal (OTONKOSKY et alii, 1988).

Assim, durante a fase perinatal, a exemplo de outros órgãos, o pâncreas endócrino passa por etapas críticas de maturação. Provavelmente muitos fatores influenciam este processo e o conhecimento dos mesmos, reveste-se de grande interesse.

Estudos conclusivos, relativos à questão acima relatada, requerem uma quantidade adequada de ilhotas fetais isoladas e um sistema-modelo que possibilite o controle das variáveis individuais que possam estar envolvidas no processo de maturação.

As ilhotas de Langerhans correspondem a uma fração reduzida da massa celular total do pâncreas. Os avanços recentes no campo de investigações no mecanismo de secreção de insulina, devem-se ao desenvolvimento de técnicas que possibilitam superar as dificuldades encontradas devido a reduzida massa tecidual, a localização das ilhotas no pâncreas e a presença de diferentes tipos celulares numa mesma ilhota. O isolamento de ilhotas pancreáticas, através do uso de colagenase (MOSKALEWSKI, 1965 apud NIELSEN, 1985; LACY & KOSTIANOVSKY, 1967 apud HELLERSTROM et alii, 1979; ANDERSON & HELLERSTROM, 1972), contribuiu substancialmente para os estudos da fisiologia e bioquímica do pâncreas endócrino. Contudo, a análise dos mecanismos envolvidos no crescimento e desenvolvimento da célula B pancreática, requer ilhotas obtidas de animais fetais e de recém-nascidos, em quantidades adequadas. Em 1979, HELLERSTROM et alii, descreveram a técnica



para cultura de tecido de pâncreas fetal de rato, possibilitando isolar quantidades substanciais de ilhotas fetais, compostas predominantemente de células B. Após uma semana, o tecido em cultura sofre uma separação completa entre células endócrinas e acinares, com o aparecimento de numerosas ilhotas e atrofia das células exócrinas. Ilhotas pancreáticas podem ser mantidas em cultura por períodos superiores a 2 meses, com manutenção da função normal das células B (KAISER et alii, 1988).

As técnicas de cultura, além do isolamento de ilhotas, apresentam inúmeras vantagens. Oferecem um modelo, utilizado para estudos dos mecanismos que regulam a neogênese das células endócrinas pancreáticas e sua organização em ilhotas durante o período de vida perinatal (DUDEK et alii, 1980). Também permitem estudos das influências e da manipulação de fatores individuais na maturação do acoplamento entre o estímulo e o mecanismo de secreção. Portanto, a cultura de tecido fornece uma possibilidade única de acompanhar e influenciar o crescimento e maturação funcional das ilhotas pancreáticas.

Alguns pesquisadores demonstraram que a maturação da resposta secretória está relacionada à concentração de glicose no meio de cultura. FREINKEL et alii (1978) verificaram um aumento progressivo na secreção de insulina pelas ilhotas fetais (21,5 dias) de rato após 1, 4 e 7 dias de cultura em meio contendo 11,1 mM de glicose. Contudo, não foi observada uma 2ª fase de secreção de insulina completa. Verificou-se

também a ocorrência de uma maturação substancial da secreção de insulina em ilhotas fetais (21,5 dias) de rato, cultivadas por 7 a 8 dias em presença de 11,1 mM e 22,2 mM de glicose (HELLERSTROM et alii, 1979). DUDEK et alii (1984) relataram que a exposição de ilhotas fetais (21,5 dias) de rato, a 11,1 mM de glicose, durante 7 dias, resulta em mudanças na célula B, responsáveis por uma secreção de insulina elevada e bifásica. E concluíram que a glicose é um potente fator, atuante no subsequente desenvolvimento "in vitro" das ilhotas fetais. Este desenvolvimento envolveria aumento no conteúdo e liberação de insulina, poliploidia (aumento no conteúdo de DNA) e hipertrofia (aumento no volume da ilhota); mas não envolveria hiperplasia (aumento no número de células B). Por outro lado MOURMEAUX et alii (1985) não observaram melhora significativa na resposta à glicose, em ilhotas fetais, após um período de cultura de 9 dias, em meio contendo 10 mM de glicose. As causas para estas discrepâncias não são claras, embora discuta-se que elas possam ocorrer devido a variações tanto na concentração de glicose, quanto na concentração de soro fetal bovino e outros compostos do meio de cultura (DUDEK et alii, 1984).

Deste modo, vários parâmetros possivelmente envolvidos na progressão natural dos eventos, que conduzem à total competência secretória de insulina, devem ser cuidadosamente controlados.

Na fase de vida perinatal, ocorre elevação na concentração de vários hormônios circulantes, tais como hormônio do

crescimento (CORNBLATH et alii, 1965 apud NIELSEN, 1982), prolactina e lactogênio placentário (ARAGONA & FRIESEN, 1979 apud NIELSEN, 1982) e triiodotironina (FISHER et alii, 1977 apud BOSCHERO et alii, 1989). O processo de maturação da resposta secretória da célula B pancreática que ocorre nesta fase do desenvolvimento, poderia estar na dependência de um destes hormônios e/ou de um conjunto de substâncias inter-relacionadas que induziriam gradativamente ao comportamento secretório típico de ilhotas adultas.

No contexto geral, é pertinente lembrar a presença de fatores diabetogênicos na hipófise, que foi reconhecida, quando descobriu-se que a hipofisectomia melhorava os sintomas diabéticos em cães pancreatectomizados. Por outro lado, extratos de hipófise, bem como hormônio do crescimento (GH) puro, poderiam induzir o diabetes no cão (HOUSSAY, 1960 apud NIELSEN, 1982; BENNET & CURRY, 1976 apud NIELSEN, 1982). Desde então, numerosos estudos clínicos e experimentais "in vivo", têm discutido o papel dos hormônios hipofisários na homeostase da glicose e seus efeitos sinérgicos e antagônicos na função das ilhotas pancreáticas.

Estudos "in vitro", relatam que a secreção de insulina glicose-induzida, em ilhotas isoladas de ratos hipofisectomizados, está diminuída, quando comparada àquela observada em ilhotas de animais normais ou hipofisectomizados, tratados com GH (MARTIN & GAGLIARDINO, 1967 apud NIELSEN, 1982; MALAISSE et alii, 1968 apud NIELSEN, 1982). Além disso, o GH

parece induzir hiperplasia das células insulares (MARTIN, 1970 apud NIELSEN, 1982; HELLERSTROM, 1977 apud NIELSEN, 1982) e influenciar o crescimento fetal e desenvolvimento do pâncreas endócrino (HOET et alii, 1975 apud NIELSEN, 1982).

Em relação a triiodotironina ( $T_3$ ) BOSCHERO et alii (1989) não observaram aumento na sensibilidade à glicose, em ilhotas de rato neonatal ou adulto, cultivadas por 7 a 9 dias, em presença de 10  $\mu M$  de  $T_3$ .

Os primeiros relatos que a prolactina (PRL) poderia influenciar o metabolismo de carboidratos, foram de SINKOFF & BODO, em 1953 (apud KATZ et alii, 1981) e HOUSSAY & PENHOS, em 1956 (apud KATZ et alii, 1981); ambos mostrando que a administração de PRL ovina promovia efeitos diabetogênicos em cães. Posteriormente em pacientes hiperprolactinêmicos com adenomas hipofisários, alguns estudos demonstraram um efeito diabetogênico da PRL (TOURNIAIRE et alii, 1974 apud KATZ et alii, 1981; LANDGRAF et alii, 1977) enquanto outros não (HAGEN et alii, 1979; EVERSMAN et alii, 1979). De acordo com KATZ et alii (1981), em humanos, o efeito da PRL no metabolismo de carboidratos é pequeno e a hiperprolactinemia não prejudica a utilização periférica de glicose ou secreção de insulina. Portanto, as funções da PRL na homeostase da glicose, não estão ainda totalmente esclarecidas.

A hiperinsulinemia é uma característica importante e fisiologicamente comum da prenhez (SPELLACY & GOETZ, 1963 apud SORENSON & PARSONS, 1985; KITZMILLER, 1980 apud SORENSON &

PARSONS, 1985). Apesar de numerosos estudos, a causa da insulina plasmática elevada e seus mecanismos de controle não estão inteiramente elucidados. De acordo com NIELSEN et alii (1986) o efeito resultante da prenhez, na ação e liberação de insulina "in vivo", depende de uma interação complicada entre vários hormônios e metabólitos. Foi sugerido que a manutenção da concentração plasmática de hormônio lactogênio elevada, é um fator que contribui para esta hiperinsulinemia (GUSTAFSON et alii, 1980). Esta sugestão é consistente com a presença de insulina plasmática elevada, em animais e humanos, portadores de tumores que secretam PRL (GARAY et alii, 1971; GUSTAFSON et alii, 1978).

Inúmeras outras evidências indicam que lactogênios, na forma da prolactina ou lactogênio placentário, exercem influência na modulação da função da célula B. SORENSON & PARSONS (1985) observaram em pâncreas isolado perfundido, de ratas hiperprolactinêmicas (prenhas e portadoras de tumor mamossomatotrófico MtTW15), uma redução no limiar de secreção de insulina promovida pela glicose e um aumento na resposta secretória frente a concentrações supra-limiâres de glicose. Dados semelhantes já haviam sido obtidos em relação a ratas prenhas (GREEN & TAYLOR, 1972) e em relação a tumores secretores de PRL (PARSONS et alii, 1983). Além disso, humanos hiperprolactinêmicos (LANDGRAF et alii, 1977; GUSTAFSON et alii, 1978; GUSTAFSON et alii, 1980) e humanos tratados com lactogênio (BECK & DAUGHADAY, 1967 apud SORENSON et alii, 1987b;

GUSTAFSON et alii, 1978) apresentaram hiperinsulinemia após uma sobrecarga de glicose. Também "in vivo", ratas hipofisectomizadas tratadas com lactogênio tiveram a secreção de insulina normal restaurada (MARTIN & FRIESEN, 1969; MALAISSE et alii, 1969). "In vitro", NIELSEN (1982) observou secreção de insulina elevada, em ilhotas pancreáticas adultas, cultivadas com PRL ou PL.

Em adição aos efeitos dos lactogênios na sensibilidade das ilhotas à glicose, também foi observado que eles podem modular o acoplamento juncional (gap-junctions) entre as células B de uma ilhota. "Gap junctions" são canais proteicos transmembrana que unem diretamente os citoplasmas de células adjacentes, fornecendo vias de troca intercelular de íons e pequenas moléculas hidrossolúveis. Estas junções celulares são encontradas em muitos tecidos e em praticamente todas as espécies animais. Desempenham importantes implicações funcionais, acoplando elétrica e metabolicamente, células em contato (ALBERTS et alii, 1989). A presença destas junções em ilhotas pancreáticas é bem documentada (ORCI et alii, 1973; ORCI et alii, 1975; MEDA et alii, 1979; MEDA et alii, 1980a; MEDA et alii, 1980b; MEDA et alii, 1982; MEDA et alii, 1983). Vários estudos têm demonstrado a transferência de moléculas de corante (MEDA et alii, 1982; MEDA et alii, 1983; KOHEN et alii, 1979; MICHAELS & SHERIDAN, 1981; MICHAELS, 1982a); íons (MEISSNER, 1976; EDDLESTONE et alii, 1984) e metabólitos radiomarcados (MEDA et alii, 1981) entre células B de uma

ilhota. Embora a função destas junções não seja clara, vários autores sugerem uma possível relação entre aumento na secreção de insulina, com aumento do número de "gap-junctions" e do processo de transferência juncional entre células B (MEDA et alii, 1979; MEDA et alii, 1983; KOHEN et alii, 1979; SORENSON et alii, 1983; SORENSON & PARSONS, 1985). Também foi demonstrado que no interior de uma ilhota, muitas das células endócrinas são eletricamente sincronizadas. Isto possibilita o acoplamento de grupos de células, as quais respondem a secretagogos naturais e farmacológicos, de maneira rápida e em conjunto (MEDA et alii, 1984).

Retomando à análise dos efeitos dos lactogênios à nível desta junções intercelulares, existem relatos de que a transferência de corante entre células B, foi aumentada acentuadamente em ilhotas de ratos portadores de tumor MtTW15; de ratas lactantes no dia do desmame (MICHAELS, 1982b; MICHAELS et alii, 1987), e de ratas infundidas com PRL-ovina por mais de 4 dias (SORENSON et alii, 1987b). Em todas as situações, as concentrações plasmáticas de lactogênios apresentavam-se elevadas. Também foi observado um maior acoplamento entre as células B, em ilhotas de rato adulto tratadas com PRL "in vitro" (MICHAELS, 1982b; MICHAELS et alii, 1987) e em ilhotas neonatais cultivadas por 4 a 21 dias e a seguir tratadas com PRL por 4 dias (SORENSON et alii, 1987a).

A prolactina e o lactogênio placentário também foram efetivos em estimular a produção de insulina e síntese de DNA em ilhotas de rato neonatal após exposição por 24 horas (NIELSEN, 1982).

Os dados obtidos por SORENSON et alii (1987a), indicam que a PRL não estimula diretamente a secreção de insulina, nem amplifica diretamente o sinal de glicose, mas, altera fundamentalmente a sensibilidade das células B à glicose.

Em conclusão, pela bibliografia acima citada, parece de consenso geral que a prolactina é um importante sinal endócrino na alteração da estrutura e função da célula B pancreática, durante a fase de vida perinatal. Contudo, os mecanismos envolvidas nas mudanças, na secreção de insulina e homeostase de glicose, induzidas pela PRL, são ainda desconhecidos.



## 2. OBJETIVOS

Diante das inúmeras evidências encontradas na literatura, da provável participação da prolactina no processo de maturação da resposta secretória das células B pancreáticas no período de vida perinatal, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do referido hormônio sobre algumas etapas importantes do evento secretório. Para isto, foram avaliados os efeitos da PRL sobre a permeabilidade aos íons potássio e cálcio, além da secreção de insulina, em ilhotas de ratos neonatais, mantidas em cultura.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Foram utilizados aproximadamente 1600 ratos albinos wistar, de ambos os sexos, de no máximo 48 horas de vida, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas.

#### 3.2. CULTURA DE TECIDO

##### A. PREPARO DO MATERIAL CIRÚRGICO, VIDRARIA E SOLUÇÕES

As tesouras e pinças utilizadas na cirurgia foram cuidadosamente lavadas em água corrente de torneira e em água desionizada, secas em estufa a 40-42 °C e mantidas em becker contendo álcool, durante o procedimento cirúrgico.

Toda a vidraria empregada (placas de Petri, tubos de ensaio, pipetas, becker, garrafas), bem como material plástico (ponteiras, tampas, rolhas) foram submetidos a condições especiais de lavagem, descritas a seguir. Inicialmente, permaneceram por 24 horas mergulhados em água contendo 1 a 2 g/l de um detergente específico para limpeza de laboratório (NEO LIMP 20). Após este período, foram cuidadosamente lavados com bucha, enxaguados 10 vezes em água corrente de torneira e 5 vezes em água desionizada. Para a secagem, o material foi mantido em estufa a 40-42 °C, por 24 horas. A seguir, cada

unidade foi embrulhada em papel alumínio, sendo a vidraria esterilizada em forno (2 horas a 180 °C) e o material plástico em autoclave (20 min a 120 °C).

A água utilizada no preparo do meio de cultura e da solução de Hanks (HANKS e WALLACE, 1949 apud HERCHUELZ, 1980), foi previamente destilada, desionizada, autoclavada por 20 min a 120 °C e após esfriada, filtrada através de membranas estéreis (filtro millipore, MILLEX-GV, 0,2 µm filter unit; AP 1504200, GSTF 04700). Todo o processo de filtração da água, dissolução e filtração dos sais foi realizado sob fluxo laminar (Modelo VLFS 12 m, VECO, Campinas, SP).

Como solução nutritiva para o cultivo das ilhotas, foi utilizado o Meio Essencial Mínimo (MEM - EARLE). Este foi preparado através de dissolução lenta, sob constante agitação, num volume de 1 litro de água, previamente preparada. Após a dissolução total do pó, foram acrescentados 2,2 g de bicarbonato de sódio. A solução apresentou pH  $7,4 \pm 0,25$  e osmolaridade  $290 \pm 5$  mOsm/l. O meio para cultura foi esterilizado por filtração, como descrito anteriormente para a água e distribuído em frascos de 100 ml. As alíquotas foram armazenadas em câmara fria e para o uso, cada uma delas foi suplementada com 11% (vol/vol) de soro fetal bovino estéril, 2% de uma mistura dos antibióticos penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (0,1 mg/ml) e 0,5 ml de solução de glicose (25% g/ml), para obter uma concentração final de 10 mM de glicose. Cabe destacar a utilização de um meio contendo glutamina,

considerando-se a importância deste aminoácido durante a manutenção em cultura de ilhotas de rato, no subsequente desempenho metabólico e secretório destas ilhotas (OSTENSON & GRILL, 1986). Antes do uso, cada frasco permaneceu em estufa a 37 °C por 48 horas. Não havendo proliferação de microorganismos, o mesmo foi utilizado para a cultura do tecido em estudo.

A solução de Hanks também foi filtrada e distribuída em frascos de 100 ml. Assim como o meio para cultura, esta foi testada em estufa para assegurar sua esterilidade.

A Prolactina utilizada foi diluída em solução de  $\text{NaHCO}_3$  (4,2 mg/ml), pH 9,0, também previamente esterilizada por filtração.

## **B. OBTENÇÃO DAS ILHOTAS DE ANIMAIS RECENTE-NASCIDOS**

As ilhotas foram obtidas segundo o método descrito por HELLERSTROM et. alii (1979), ligeiramente modificado.

Para cada experimento, aproximadamente 40 animais foram sacrificados por decapitação. Após assepsia da região abdominal, realizada com auxílio de algodão embebido em álcool (96 GL), procedeu-se a laparotomia para a exposição e extirpação dos pâncreas. Estes foram a seguir reduzidos a fragmentos de cerca de 0,5 mm<sup>3</sup>, com o auxílio de tesoura e lavados com solução de Hanks. O tecido fragmentado foi transferido para um tubo de ensaio com tampa. Para facilitar a separação das ilhotas das células acinares, foi realizado um

tratamento com colagenase (0,44 U/mg). Após adição de 5 mg da enzima ao material contido no tubo, este último foi agitado manualmente por 5 min, em banho-maria a 37 °C. A seguir, o material foi lavado 5 vezes, com solução de Hanks, para eliminar a colagenase, bem como possíveis contaminantes adquiridos durante o procedimento cirúrgico. Cada lavagem foi seguida de centrifugação e descarte do sobrenadante.

### C. CULTURA DAS ILHOTAS NEONATAIS DE LANGERHANS

O estudo da fisiologia do pâncreas endócrino é bastante dificultado pela reduzida massa tecidual. Contudo, essa dificuldade pode ser contornada através da cultura de fragmentos de pâncreas. Em cultura, a parte acinar do pâncreas degenera, sobrevivendo apenas o tecido endócrino ou ilhotas (fig. 9 a 11), as quais, segundo MOURMEAUX et alii (1985), mantêm as características fisiológicas do momento em que foram extraídas do animal fetal ou recém-nascido. A manutenção de ilhotas pancreáticas em cultura, além de permitir a obtenção de quantidade adequada de células, possibilita o tratamento hormonal crônico.

Após o tratamento enzimático e remoção da colagenase, o tecido pancreático parcialmente digerido (ilhotas mais tecido acinoso) foi transferido para placas de Petri tipo pyrex (diâmetro 100 mm), contendo 8 ml do meio de cultura. O meio para cultura foi trocado a cada 48 horas. A montagem e manuseio diário das placas foram feitos sob fluxo laminar. Uma parte das

ilhotas em cultura serviu como controle e a outra recebeu tratamento diário com 2 µg/ml de PRL (SORENSEN et alii, 1987a). As placas foram mantidas em estufa (NBS CO<sub>2</sub> INCUBATOR; Model CO-20; NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, NEW BRUNSWICK, N.J., USA) a 37 °C, numa atmosfera umidificada e sob gaseamento contínuo, com mistura ar atmosférico-dióxido de carbono (5%), por 7 a 9 dias.

Após este período, as ilhotas pancreáticas livres de tecido acinoso, foram destacadas da base da placa de cultura e ressuspensas por leve agitação do fluido de cultura. A seguir, foram individualmente coletadas sob lupa, por aspiração com pipeta Pasteur previamente siliconizada e estirada; e utilizadas para experimentação.

### 3.3. EFLUXO DO <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> DE ILHOTAS ISOLADAS

O <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> é um traçador amplamente empregado como substituto do <sup>42</sup>K<sup>+</sup>, em estudos do efluxo desse íon, em uma série de tecidos, inclusive em ilhotas pancreáticas (SEHLIN e TALJEDAL, 1974; BOSCHERO e MALAISSE, 1977; BOSCHERO et alii, 1988; CARNEIRO, 1989). A utilização do <sup>42</sup>K<sup>+</sup> como radioisótopo do <sup>39</sup>K<sup>+</sup> é inviabilizada pela sua meia-vida muito curta (12,3 horas). Devido a semelhança da razão do efluxo do <sup>42</sup>K<sup>+</sup> e do <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> (BOSCHERO e MALAISSE, 1977; DAWSON et alii, 1986) utilizamos o efluxo do <sup>86</sup>Rb como um índice da permeabilidade do K<sup>+</sup>.

Para a análise do efluxo do <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>, 100 a 150 ilhotas controle ou tratadas cronicamente com PRL foram incubadas por 90 min, a 37 °C, em solução de Krebs-Ringer (KREBS & HENSELEIT,

1932 apud HERCHUELZ, 1980) contendo 16,7 mM de glicose e  $^{86}\text{RbCl}$  (15 a 30  $\mu\text{Ci/ml}$ ). Durante os 10 min iniciais da incubação, o pH (7,4) foi equilibrado com carbogênio (95%  $\text{O}_2$  / 5%  $\text{CO}_2$ ). Após o período de incubação, as ilhotas foram lavadas 2 vezes com Krebs não radioativo e imediatamente transferidas para 2 câmaras de perfusão (vol 0,3 ml) as quais continham um filtro poroso (diâmetro do poro = 8  $\mu\text{m}$ ) de acetato de celulose (MILLIPORE, SCWP 01300). As câmaras foram conectadas a um sistema de perfusão constituído de dois recipientes ligados por intermédio de catéteres cilíndricos a uma torneira de duas vias. As soluções perfusoras contidas nos recipientes foram mantidas a 37 °C e equilibradas com carbogênio para manutenção do pH a 7,4, durante toda a perfusão. A razão de fluxo do sistema perfusor foi de 1 ml/min, impulsionado por uma bomba peristáltica (HOLTER PUMP S 900 EXTRACORPOREAL MED SPEC INC, KING PRUSSIA Pa).

A perfusão foi iniciada imediatamente após a transferência das ilhotas para as câmaras e conexão das mesmas ao sistema. A solução perfusora foi proveniente do primeiro reservatório, do 1° ao 40° min; do segundo reservatório, do 41° ao 60° min e novamente do primeiro reservatório do 61° ao 80° min, quando se encerrou a perfusão. Os 20 min iniciais serviram para adaptação das ilhotas ao sistema. As amostras de perfusato foram coletadas em frascos de polietileno, a intervalos regulares de 2 min, do 20° ao 80° min. A radioatividade contida no efluente

de cada frasco foi medida em contador de partículas beta (BECKMAN LS 100C, MADE IN USA), através do efeito CERENKOV.

Como já foi discutido, a metodologia descrita permite-nos estudar a permeabilidade ao  $K^+$  ou  $Rb^+$ . Nestes experimentos foram verificados inicialmente os efeitos da glicose sobre o efluxo do  $^{86}Rb^+$ , uma vez que a glicose é um secretagogo fisiológico da secreção de insulina. A seguir, foram analisados os efeitos de duas drogas que atuam à nível da permeabilidade iônica estudada. A tolbutamida, que provoca o fechamento dos canais de  $K^+$  modulados por ATP e a diazoxida, que induz a abertura dos mesmos (HENQUIN & MEISSNER, 1982; TRUBE et alii, 1986). As alterações na solução perfusora (com glicose, tolbutamida ou diazoxida) serão descritas nos resultados.

Os resultados serão expressos como a razão fracional do efluxo, ou seja, como a percentagem do total de  $^{86}Rb^+$  contido na ilhota, liberado num determinado intervalo de tempo.

### 3.4. EFLUXO DO $^{45}Ca^{2+}$ DE ILHOTAS ISOLADAS

Para análise do efluxo do  $^{45}Ca^{2+}$ , grupos de 100 a 150 ilhotas foram incubadas durante 90 min, a 37 °C, em solução de Krebs contendo 16,7 mM de glicose e  $^{45}CaCl$  (180 a 200  $\mu Ci/ml$ ), sendo o pH 7,4 equilibrado durante os 10 min iniciais com carbogênio.

Após a incubação, as ilhotas foram lavadas 4 vezes com Krebs não radioativo e perfundidas segundo descrito anteriormente. O período de adaptação das ilhotas ao sistema



foi de 30 min, sendo as amostras coletadas do 32° ao 80° min. A solução perfusora acrescida de 0,5 mM de EGTA e sem adição de  $\text{Ca}^{2+}$ , foi proveniente do 1° reservatório (contendo 1,8 mM de glicose), do 1° ao 44° min e do 2° reservatório (contendo 16,7 mM de glicose), do 45° ao 80° min. O efluente foi coletado a intervalos regulares de 2 min, sendo a razão de fluxo do sistema de 0,8 ml/min. A cada aliquota utilizada para leitura do  $^{45}\text{Ca}$ , foi acrescentado 6 ml de líquido de cintilação. A contagem das desintegrações foi feita em contador de partículas beta. Os resultados serão expressos como efluxo fracional do  $^{45}\text{Ca}$  (% min<sup>-1</sup>).

### 3.5. SECREÇÃO DE INSULINA DE ILHOTAS ISOLADAS

Para análise da secreção dinâmica de insulina, grupos de 100 a 150 ilhotas foram incubadas durante 90 min, a 37°C em solução de Krebs contendo 16,7 mM de glicose, sendo o pH 7,4 equilibrado durante os 10 min iniciais com carbogênio. Após incubação, as ilhotas foram transferidas para o sistema perfusor. O período de adaptação das ilhotas ao sistema foi de 34 min. Neste caso, a solução perfusora continha 1,0 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . As amostras de efluente foram coletadas a intervalos regulares de 0,5 min, do 35° ao 65° min; em banho-maria gelado (0 a 4°C) e armazenadas a -20°C. A insulina secretada foi posteriormente dosada através de radioimunoensaio (DESBUQUOIS & AURBACH, 1971). Os resultados serão expressos em pg/ilhota por min.

### 3.6. CONTEÚDO TOTAL DE INSULINA DE ILHOTAS CULTIVADAS

O conteúdo de insulina foi avaliado nas ilhotas controle e tratadas com PRL após o período de cultura. Para isso, procedeu-se inicialmente à extração de insulina de grupos de 10 ilhotas, as quais foram mantidas durante 24 horas, a 4 °C, em 1,0 ml de solução ácido-álcool. Após extração, foram feitas as diluições necessárias e a insulina foi dosada pelo método descrito por DESBUQUOIS & AURBACH (1971). Os resultados serão expressos como  $\mu\text{U}/\text{ilhota}$ .

### 3.7. INCORPORAÇÃO DO $^{45}\text{Ca}$ POR ILHOTAS ISOLADAS

A técnica utilizada foi originalmente descrita por HELLMAN et alii (1976). Ilhotas foram coletadas a partir das placas de cultura e distribuídas em grupos de 100 a 130, em 3 frascos (A, B e C) de vidro, siliconizados, de aproximadamente 3 cm de altura e 0,5 cm de diâmetro. A seguir, as ilhotas foram pré-incubadas por 30 min em solução de Krebs modificado, tamponado com 10 mM de HEPES, a pH 7,4, contendo 2,8 mM de glicose, e gaseado com oxigênio puro. Após este período, seguiu-se uma incubação por 5 min em 100  $\mu\text{l}$  de solução de Krebs contendo  $^{45}\text{CaCl}_2$  (60  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ), modificada de acordo com a situação experimental. O frasco "A" continha o mesmo Krebs utilizado para a pré-incubação; ao frasco "B" foi adicionado Krebs acrescido de 16,7 mM de glicose, e ao frasco "C" adicionou-se

Krebs contendo 30 mM de  $K^+$ . A osmolaridade desta última solução foi mantida através de uma redução na concentração de NaCl.

Imediatamente após os 5 min de incubação, a reação foi interrompida pela adição, em cada frasco, de 0,9 ml de solução de  $LaCl_3$  a uma concentração final de 2,0 mM, a 0 °C e pH 7,4. O sobrenadante de cada frasco (A, B e C) foi transferido para outros 3 tubos de ensaio (A, B e C) para posterior preparo do padrão externo ou MAXIMO (MAX). A cada frasco contendo as ilhotas, foi adicionada novamente solução de  $LaCl_3$  e foram mantidos durante 60 min, a 0 °C. O sobrenadante foi descartado e as ilhotas foram lavadas 3 vezes com a mesma solução de cloreto de lantânio a 0 °C. As ilhotas foram transferidas para placas de Petri pequenas (5 cm de diâmetro) e recoletadas em grupos de quinze, em frascos de polietileno contendo 1 ml de água destilada.

Todas as etapas pós-incubação foram executadas a baixa temperatura (0 °C), obtidas através do uso de banho-maria gelado.

De cada uma das placas de Petri, transferiu-se também um volume de líquido igual ao transportado junto com as ilhotas durante a coleta das mesmas. Esse volume, coletado em duplicata, serviu para a avaliação da radioatividade contida no meio (BG). O valor do MAX foi obtido através da avaliação da radioatividade contida em 50  $\mu$ l do sobrenadante radioativo (0,1 ml de  $^{45}CaCl_2$  mais 0,9 ml de  $LaCl_2$ ), em triplicata para cada situação experimental.

A cada frasco de polietileno foram acrescidos 6 ml de liquido de cintilação , e a radioatividade foi medida em contador de particulas beta.

A quantidade de  $^{45}\text{Ca}$  incorporado por ilhota foi calculada pela multiplicação de um fator F pelo número de cpm de cada frasco, após a subtração do BG correspondente.

O fator F foi obtido pela seguinte equação:

$$F = \frac{1000}{\text{cpm do MAX} \times 15}$$

onde:

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

cpm do MAX = número de cpm contidos em 1,0  $\mu\text{l}$  do meio de incubação.

15 = número de ilhotas coletadas em cada frasco.

Os resultados serão expressos em pmol de  $\text{Ca}^{2+}$  /ilhota por 5 min.

### 3.8. ANÁLISE HISTOLÓGICA DE ILHOTAS CULTIVADAS

Grupos de 50 ilhotas foram coletadas após 7 dias em cultura e fixadas durante 24 horas em solução de Bouin. Após este período foi realizado um tratamento para desidratação das células. Para isto, as ilhotas foram processadas em bateria alcoólica (70, 80, 90 e 100% v/v), em intervalos de 1 hora. A diafanização em xilol foi feita durante 20 min. O tecido foi mantido durante 1 hora em banho de parafina e à seguir incluído num bloco de parafina. Foram feitas secções de 3  $\mu$ m de espessura e as lâminas foram coradas com Hematoxilina -eosina. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico (CARL ZEISS DO BRASIL S.A.).

### 3.9. RADIOISÓTOPOS E REAGENTES

Todos os sais, bem como a D glicose e demais substâncias adicionadas ao meio de isolamento e/ou incubação possuíam grau analítico de pureza (P.A.).

Os radioisótopos e reagentes utilizados e suas respectivas fontes são os seguintes:

Albumina bovina fração V; EGTA (Ethylene Glycol bis - ( $\beta$ -Aminoethyl Ether) N,N,N', N' - Tetraacetic Acid); Tolbutamida; Diazoxida : Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA.

Colagenase (Collagenase aus *Clostridium histolyticum*,  
Lyophilisat): Boehringer Mannheim GmbH, W. Germany.

$^{86}\text{RbCl}$ ,  $^{45}\text{CaCl}$ , frascos de polietileno: New England  
Nuclear Research Products, Boston, Ma, USA.

$^{125}\text{I}$  - Insulina: Laboratório Fleury, S.P.

Anticorpo anti-insulina de rato: Laboratoire de Medecine  
Experimentale, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles,  
Belgium; doado gentilmente pela Dra. V. Leclercq-Meyer e pelo  
Dr. W. J. Malaisse.

Prolactina ovina (na forma liofilizada): NIADDK, NIH,  
BALTIMORE, M.D.; doado gentilmente pelo Dr. Rieti.

Tolueno: MERCK S.A. Inds. Químicas

Tinovetin: COEMA Produtos Industriais e Tecnologia Ltda

Omnifluor: New England Nuclear, Albany, St. Boston

MEM-EARLE, soro fetal bovino estéril, penicilina-  
estreptomicina: CULTILAB Materiais para cultura de células,  
Campinas, S.P., Brasil

### 3.10. SOLUÇÕES

As soluções utilizadas apresentaram as seguintes composições:

**Hanks** (HANKS & WALLACE, 1949 apud HERCHUELZ, 1980):

|                                                          |         |
|----------------------------------------------------------|---------|
| NaCl.....                                                | 8,000 g |
| KCl.....                                                 | 0,400 g |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....                | 0,185 g |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....                | 0,200 g |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O..... | 0,087 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....                    | 0,060 g |
| NaHCO <sub>3</sub> .....                                 | 0,350 g |
| H <sub>2</sub> O deionizada (qsp).....                   | 1,000 l |

**Meio Essencial Mínimo - MEM** (em mg/l):

Sais inorgânicos:

|                                                         |          |
|---------------------------------------------------------|----------|
| CaCl.....                                               | 264,87   |
| KCl.....                                                | 400,00   |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....               | 200,00   |
| NaCl.....                                               | 6.800,00 |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O..... | 140,00   |

Amino-ácidos:

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| L-alamina.....                       | 8,90   |
| L-arginina . HCl.....                | 126,00 |
| L-asparagina . H <sub>2</sub> O..... | 15,00  |
| ácido L-aspartico.....               | 13,30  |

|                                         |        |
|-----------------------------------------|--------|
| L-cistina.....                          | 31,29  |
| ácido L-glutâmico.....                  | 14,70  |
| L-glutamina.....                        | 292,00 |
| glicina.....                            | 7,50   |
| L-histidina . HCl.H <sub>2</sub> O..... | 42,00  |
| L-isoleucina.....                       | 52,00  |
| L-leucina.....                          | 52,00  |
| L-lisina . HCl.....                     | 72,00  |
| L-metionina.....                        | 15,00  |
| L-fenilalanina.....                     | 32,00  |
| L-prolina.....                          | 11,50  |
| L-serina.....                           | 10,50  |
| L-treonina.....                         | 48,00  |
| L-triptofano.....                       | 10,00  |
| L-tirosina.....                         | 52,10  |
| L-valina.....                           | 46,00  |

Vitaminas:

|                            |      |
|----------------------------|------|
| pantotenato de cálcio..... | 1,00 |
| cloreto de colina.....     | 1,00 |
| ácido fólico.....          | 1,00 |
| inositol.....              | 2,00 |
| nicotinamida.....          | 1,00 |
| piridoxal . HCl.....       | 1,00 |
| riboflavina.....           | 0,10 |
| tiamina . HCl.....         | 1,00 |



## Outros componentes:

|                        |         |
|------------------------|---------|
| glicose.....           | 1000,00 |
| vermelho de fenol..... | 10,00   |

**Krebs - Ringer** (KREBS & HENSELEIT, 1932 apud HERCHUELZ, 1980):

|                                           |          |
|-------------------------------------------|----------|
| NaCl.....                                 | 26,886 g |
| NaHCO <sub>3</sub> .....                  | 8,065 g  |
| KCl.....                                  | 1,492 g  |
| MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O..... | 0,813 g  |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O..... | 0,588 g  |
| H <sub>2</sub> O deionizada (qsp).....    | 1,000 l  |

Acrescentou-se à solução no momento do uso, 2 mg/ml de albumina bovina fração V.

**Líquido de cintilação:**

|                                                                                      |                |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Tolueno(MERCK).....                                                                  | 70 % (vol/vol) |
| Tinovetin [(COEMA Produtos Industriais e Tecnologia Ltda), (agente tensoativo)]..... | 30 % (vol/vol) |
| Omnifluor (NEN - New England Nuclear, Albany, St Boston) (cintilador orgânico).....  | 400 mg/ml      |

**Solução de Lantânio**

Solução concentrada.....12,5 ml

Composta por (em g/250 ml)

NaCl.....8,1232

KCl.....0,3503

CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O.....0,3824

MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O.....0,3596

H<sub>2</sub>O destilada.....37,5 ml

TRIS (2 amino-2-hidroximetilpropano 1-3 diol)..34,0 mg

LaCl<sub>3</sub>.7H<sub>2</sub>O.....74,0 mg

O pH foi ajustado a 7,4 com HCl 0,1 N.

**Mistura ácido-álcool**

HCl 12 N.....7,5 ml

Etanol.....492,5 ml

### 3.11. CÁLCULOS E TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para analisar a magnitude da variação do efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$ , foram calculados valores teóricos a partir dos valores reais de efluxo. Utilizando-se os valores do intervalo 22 a 40 min, foi realizada uma extrapolação da curva experimental para calcular os valores esperados para o intervalo 42 a 60 min. Para o intervalo 62 a 80 min, os cálculos de extrapolação foram feitos à partir dos valores do intervalo 42 a 60 min (tab. I a VIII).

Em relação ao efluxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , os valores para o intervalo 46 a 80 min foram calculados a partir dos valores do intervalo 32 a 44 min (tab. IX e X).

A determinação do grau de significância, diferenciando os valores reais e teóricos, foi avaliada por meio da aplicação do teste t de Student, admitindo-se como não significativos valores de p acima de 5%.

Nas tabelas I a X, os valores de efluxo esperados e observados são dados como porcentagem de efluxo por 2 min.

Nas fig. 1 e 2, a média dos valores da curva controle (glicose 2,8 mM), no intervalo 22 a 40 min, foi tomada como 100% e à partir dela foram ajustados os valores das outras curvas (0 e 8,3 mM de glicose), para fins de comparação.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. EFLUXO DO $^{86}\text{Rb}^+$

A fig. 1 mostra o efeito de diferentes concentrações de glicose sobre o efluxo fracional do  $^{86}\text{Rb}^+$  de ilhotas neonatais de rato, cultivadas por 7 a 9 dias. Na figura estão representados três grupos de experimentos iniciados em presença de 2,8 mM de glicose. A retirada da glicose do meio perfusor (círculos vazios) a partir do 40° min, causou um aumento no efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$  (min 42 a 60). Com a reintrodução da glicose ao meio (min 62 a 80), o efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$  atingiu valores próximos aos observados no intervalo 22-40 min. Nenhuma alteração no efluxo foi registrada quando a concentração de glicose (2,8 mM) foi mantida inalterada durante os 80 min da perfusão (círculos semi-preenchidos). Neste caso, a curva serviu como controle, para isto, a solução perfusora embora contendo sempre 2,8 mM de glicose, foi alternada do 1º e 2º reservatórios, assim como nas perfusões onde a concentração de glicose foi alterada. Por outro lado, o aumento da concentração de glicose de 2,8 para 8,3 mM induziu uma redução no efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$  (min 42 a 60). Esta foi revertida quando a concentração de glicose retornou a 2,8 mM (min 62 a 80).

Resultados de experimentos equivalentes aos apresentados na fig. 1, porém realizados com ilhotas tratadas cronicamente com PRL, estão ilustrados na fig. 2. Nesta condição, a retirada da glicose do meio perfusor (triângulos vazios) a partir do 40°

min induziu um aumento no efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$  (min 48 a 60), maior do que o observado na fig. 1, para ilhotas controle. A reintrodução de glicose no meio (min 62 a 80) reverteu o efluxo de  $^{86}\text{Rb}^+$  para valores próximos aos obtidos no intervalo 22-40 min. Quando a concentração de glicose foi mantida em 2,8 mM durante toda a perfusão (1° ao 80°min), não ocorreu alteração no efluxo (triângulos semi-preenchidos). Porém o aumento da concentração de glicose de 2,8 para 8,3 mM causou uma redução no efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$  (min 42 a 60), maior do que a observada na fig. 1 para ilhotas controle. Esta redução também foi revertida quando o perfusato passou a conter novamente 2,8 mM de glicose.

Os resultados apresentados nas fig. 1 e 2, foram analisados estatisticamente através da aplicação do teste t de Student entre os valores de efluxo de  $^{86}\text{Rb}^+$  observados experimentalmente e os teoricamente esperados para os intervalos 42 a 60 min e 62 a 80 min (tabelas I a IV).

As tabelas I e II apresentam os valores reais, bem como os valores esperados de efluxo de  $^{86}\text{Rb}^+$ , quando da retirada da glicose da solução perfusora (min 42 a 60) e quando da sua reintrodução a partir do min 62. Em relação às ilhotas controle, a remoção da glicose induziu diferenças estatisticamente significativas entre os valores esperados e os observados, apenas nos min 46, 50 e 52 (tabela I). Por outro lado, em relação às ilhotas tratadas com PRL, a diferença foi estatisticamente significativa para todos os valores, exceto para os min 42 e 44 (tabela II). Após a reintrodução da glicose

ao perfusato, observamos uma diferença estatisticamente significativa nos min 66, 68, 70, 74 e 76, para ilhotas controle (tabela I), enquanto que para ilhotas tratadas com PRL não existiram diferenças significativas entre os valores esperados e observados, exceto no min 74 (tabela II).

Nas tabelas III e IV encontram-se os valores teóricos e os experimentais de efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$  quando a solução perfusora passou de 2,8 para 8,3 mM (min 42) e novamente para 2,8 mM de glicose (min 62). Em ilhotas controle não existiram diferenças significativas entre os valores quando se elevou a concentração de glicose (tabela III). Contudo, em ilhotas tratadas com PRL, a diferença foi significativa para a maioria dos intervalos, com exceção dos min 42, 44, 56 e 60 (tabela IV). Após o retorno a 2,8 mM de glicose, diferenças estatisticamente significativas foram registradas nos min 72, 74, 78 e 80, para ilhotas controle (tabela III). Ao contrário, nenhum dos valores diferiu significativamente para ilhotas tratadas com PRL no mesmo intervalo de tempo (tabela IV).

A análise da média entre as taxas de elevações e reduções no efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$ , compreendidas no intervalo 42 a 60 min de perfusão, revelou valores de  $0,32 \pm 0,06$  e  $0,67 \pm 0,11 \text{ \% min}^{-1}$ , para ilhotas controle (fig. 1) e tratadas com PRL (fig. 2), respectivamente ( $p < 0,05$ ).

A fig. 3 representa as variações em percentagem de efluxo de  $^{86}\text{Rb}^+$ , de ilhotas controle e tratadas com PRL, perfundidas por soluções contendo diferentes concentrações de glicose. Os

valores foram obtidos a partir das curvas representadas nas fig. 1 e 2 e correspondem as médias dos pontos no intervalo de tempo 48 a 56 min. Foi considerado como 100 % a média obtida em ilhotas controle perfundidas por solução contendo 2,8 mM de glicose. A percentagem de redução do efluxo de 0 para 8,3 mM de glicose, foi de 15% para ilhotas controle e de 50% para ilhotas tratadas com PRL ( $p < 0,05$ ).

O efeito da tolbutamida (20  $\mu\text{g/ml}$ , de acordo com HENQUIN & MEISSNER, 1982) sobre o efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$  está representado na fig. 4. A adição da droga ao perfusato (min 42 a 46) reduziu o efluxo do referido isótopo, tanto em ilhotas controle (circunferências) quanto em ilhotas tratadas com PRL (triângulos). Este efeito foi revertido após a remoção da tolbutamida (min 62 a 80) em ambos os grupos. A análise estatística dos valores teóricos e experimentais (tabelas V e VI) revela um número maior de valores estatisticamente diferentes para as ilhotas tratadas com PRL em relação às controle, tanto no intervalo 42 a 60 min (presença da droga) quanto no intervalo 62 a 80 min (remoção da droga).

A análise da adição da diazoxida (20  $\mu\text{g/ml}$ , de acordo com HENQUIN & MEISSNER, 1982) ao meio perfusor nas ilhotas controle, demonstrou um aumento no efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$  (fig.4). Contudo, este aumento foi tardio (min 48) em relação às ilhotas tratadas com PRL e o retorno aos valores basais ocorreu mais precocemente (min 54). Nas ilhotas tratadas com PRL, a diazoxida elevou o efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$ , a partir do 44º min. Esta

elevação retornou a valores semelhantes àqueles registrados nos minutos que precederam a introdução da diazoxida, antes mesmo da retirada da droga do meio (min 58 a 60). Diferenças estatísticas significativas entre os valores observados e os teóricos esperados, foram registradas nos min 48, 50 e 52, para ilhotas controle (tabela VII) e nos min 44, 48, 50, 52, 54, 56, 58 e 60, para as ilhotas tratadas com PRL (tabela VIII). Após a remoção da diazoxida do meio, com exceção dos valores registrados no min 64, todos os outros foram estatisticamente diferentes para ilhotas tratadas com PRL (tabela VIII) ao passo que somente os valores correspondentes aos min 70 e 78 foram estatisticamente diferentes para ilhotas controle (tabela VII).

Os experimentos representados nas fig. 4 e 5 foram realizados na ausência de glicose. Nota-se que nos intervalos 22-40 min e em menor grau 62-80 min, o efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$  foi maior em ilhotas tratadas com PRL do que em ilhotas controle.

#### 4.2. INCORPORAÇÃO DO $^{45}\text{Ca}$

A fig. 6 ilustra a incorporação do  $^{45}\text{Ca}$  por ilhotas neonatais controle ou tratadas com PRL. A incorporação basal, ou seja, quando a incubação foi feita em presença de 2,8 mM de glicose e 5,0 mM de  $\text{K}^+$ , foi de  $0,23 \pm 0,025$  pMol/ilhota por 5 min, em ilhotas controle ( $n = 18$ ) e de  $0,25 \pm 0,035$  pMol/ilhota por 5 min, em ilhotas tratadas com PRL ( $n = 24$ ). Em presença de 16,7 mM de glicose e 5 mM de  $\text{K}^+$ , a incorporação foi elevada para  $0,35 \pm 0,035$  pMol/ilhota por 5 min e para  $0,36 \pm 0,025$



pMol/ilhota por 5 min, respectivamente em ilhotas controle (n = 16) e em ilhotas tratadas com PRL (n = 15). Uma acentuada elevação na incorporação de  $^{45}\text{Ca}$  ocorreu em ambos os grupos, quando incubados em presença de 2,8 mM de glicose e 30 mM de  $\text{K}^+$ . Neste caso, o valor observado para o grupo controle foi de  $0,64 \pm 0,04$  pMol/ilhota por 5 min (n = 18); enquanto no grupo tratado com PRL foi de  $0,72 \pm 0,045$  pMol/ilhota por 5 min (n = 18). O aumento na incorporação de cálcio induzido tanto por elevação na concentração de glicose, quanto de  $\text{K}^+$ , foi estatisticamente significativo para ambos os grupos ( $p < 0,05$ ), quando comparado com seus respectivos controles. Porém, nas três condições experimentais, não houve diferença entre ilhotas controle e tratadas com PRL.

### 4.3. EFLUXO DO $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Os efeitos da glicose sobre o efluxo do  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  de ilhotas perfundidas por solução na qual não se adicionou  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo acrescida de 0,5 mM de EGTA, estão representados na fig. 7. Observa-se que quando a concentração de glicose foi elevada de 1,8 para 16,7 mM (min 44) não ocorreram alterações no efluxo do  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  nas ilhotas controle e tratadas com PRL (tabelas IX e X), embora uma tendência de redução no efluxo (à partir do 50º min) possa ser observada nas ilhotas tratadas com PRL.

### 4.4. SECREÇÃO DE INSULINA

A fig. 8 ilustra a secreção dinâmica de insulina por ilhotas neonatais controle ou tratadas com PRL, perfundidas durante 65 min. No grupo controle, a secreção basal de insulina em 1,8 mM de glicose (min 35 a 44) foi estável. Após a elevação na concentração de glicose de 1,8 para 16,7 mM, ocorreu inicialmente uma pequena redução na secreção (min 44,5 a 46,5), seguida por um aumento lento, com obtenção da resposta secretória máxima no min 59, a partir do qual a secreção diminuiu até o final da perfusão. No grupo tratado com PRL, a secreção basal de 1,8 mM de glicose foi estável e maior em relação ao grupo controle. Após a elevação na concentração de glicose, também ocorreu uma pequena redução na secreção (min 44,5 a 46,5), seguida por um aumento rápido, sendo que o máximo de resposta foi obtido no min 50,5, a partir do qual foi

observada uma pequena redução e manutenção de uma secreção estável até o min 65, quando se encerrou a perfusão.

O valor médio de secreção (min 35 a 44), em ilhotas controle perfundidas por 1,8 mM de glicose, foi de  $4,50 \pm 0,13$  pg/ilhota por min, enquanto em ilhotas tratadas com PRL, foi de  $5,64 \pm 0,11$  pg/ilhota por min ( $p < 0,05$ ). Após elevação da concentração de glicose para 16,7 mM, a secreção média (min 48 a 65) atingiu  $6,94 \pm 0,35$  e  $9,46 \pm 0,24$  pg/ilhota por min, em ilhotas controle e tratadas com PRL ( $p < 0,05$ ), respectivamente. O aumento na capacidade secretória das ilhotas, frente a 16,7 mM de glicose foi de 54,22% para o grupo controle e de 67,73% para o grupo tratado com PRL, sendo significativo para ambos os grupos.

#### 4.5. CONTEÚDO TOTAL DE INSULINA

O conteúdo total de insulina em ilhotas neonatais cultivadas por 7 a 9 dias, foi de  $609 \pm 49$   $\mu$ U/ilhota ( $n = 36$ ) e de  $857 \pm 88$   $\mu$ U/ilhota ( $n = 40$ ), respectivamente para o grupo controle e tratado com PRL ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6. ANÁLISE HISTOLÓGICA DE ILHOTAS CULTIVADAS

As figuras 9 e 10 são fotomicrografias de uma cultura de ilhotas pancreáticas de ratos recém-nascidos. Nestas preparações "a fresco", nota-se em todo o campo, a presença de fibroblastos (células esféricas e fusiformes, refringentes). Ao centro do campo, nota-se formação elipsoidal coberta por

material mais denso (escuro), representado por porção de pancreâs exócrino (fig. 9) ou estrutura arredondada refringente (clara), típica de ilhota pancreática isolada (fig. 10).

Na fig. 11 observamos ilhotas pancreáticas isoladas, coradas com Hematoxilina-eosina, apresentando células globosas, com citoplasma aparentemente vacuolizado. Os núcleos são arredondados, há apenas um núcleo por célula, a cromatina é frouxa e o nucléolo é bem evidente. Tais características são compatíveis com células em atividade.

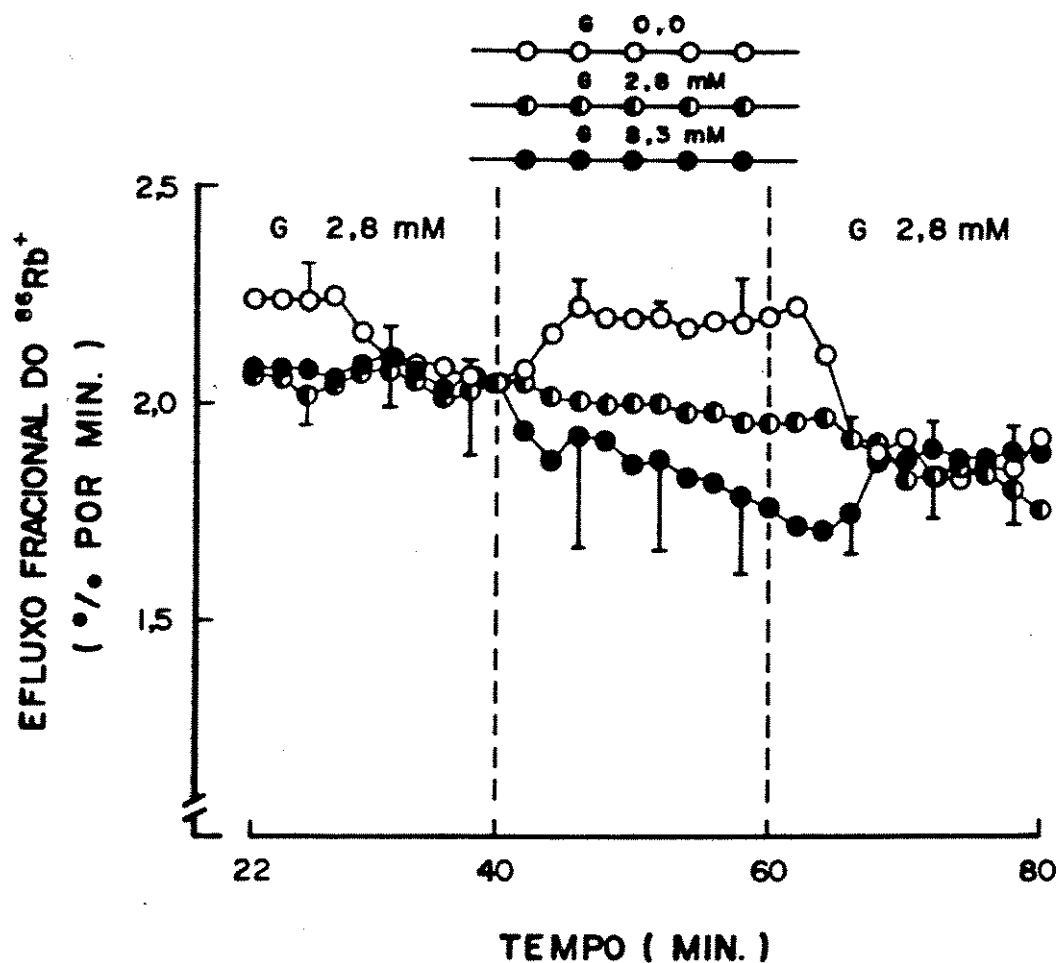


Figura 1

Efeito de diferentes concentrações de glicose sobre o efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$  de ilhotas neonatais de rato, cultivadas por 7 a 9 dias. As ilhotas foram previamente marcadas com o referido isótopo, durante 90 min, em presença de 16,7 mM de glicose e perfundidas durante 80 min. As alterações na concentração de glicose da solução perfusora feitas no intervalo 42 a 60 min, estão representadas na figura pelas linhas pontilhadas verticais. São indicadas as médias ( $\pm$  erro padrão da média ou EPM) de  $n = 3$  (ausência de glicose) e  $n = 4$  (glicose 8,3 mM). Os pontos da curva controle, que representa a perfusão durante 80 min com solução contendo 2,8 mM de glicose são médias de 2 experimentos.

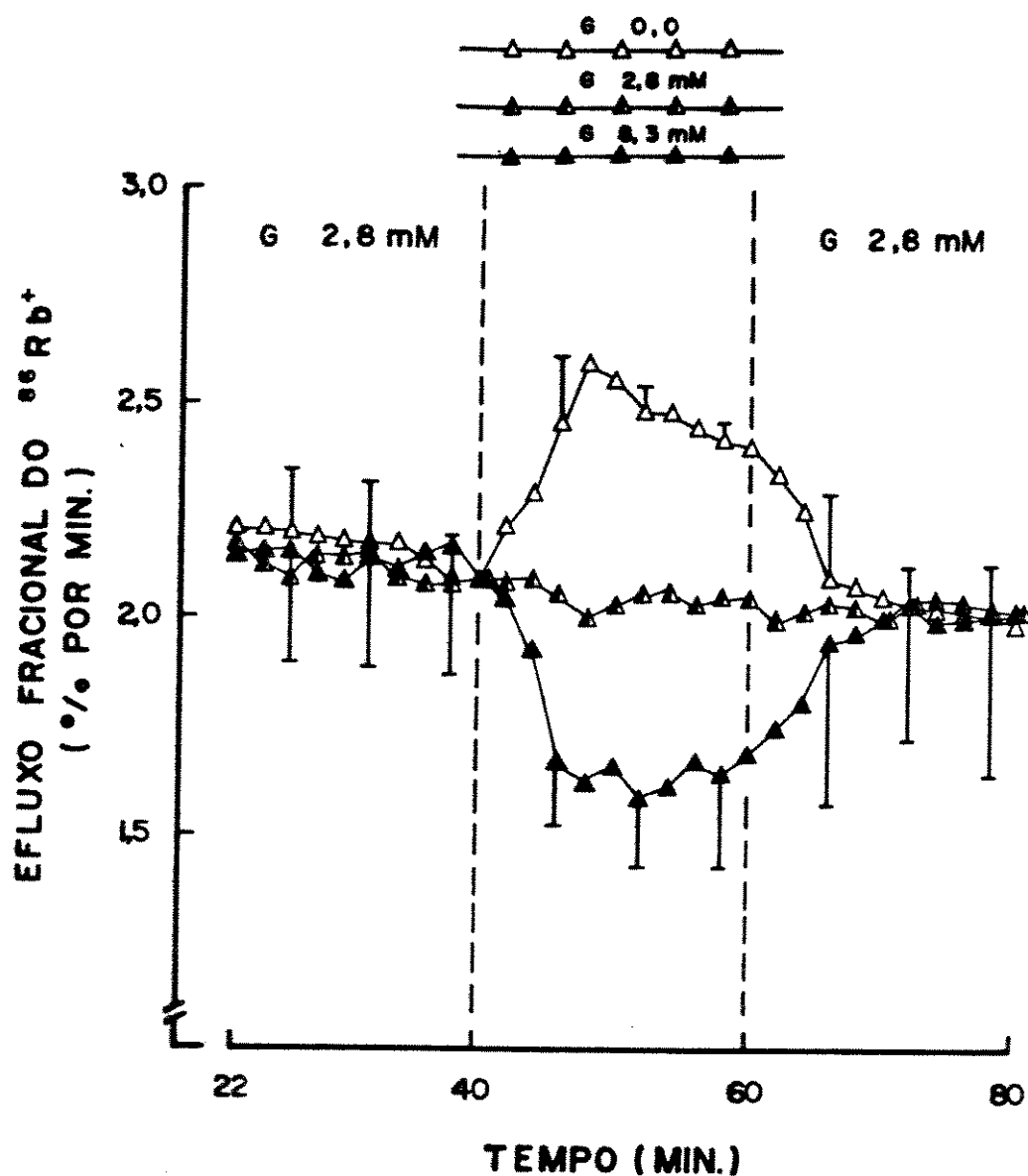


Figura 2

Efeito de diferentes concentrações de glicose sobre o efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$  de ilhotas neonatais de rato, cultivadas em presença de PRL (2  $\mu\text{g/ml}$ ). A marcação com o radioisótopo e a perfusão foram executados como descrito para a fig. 1. São indicadas as médias ( $\pm$  EPM) de  $n = 3$  (ausência de glicose) e  $n = 4$  (glicose 8,3 mM). A curva controle é média de 2 experimentos.

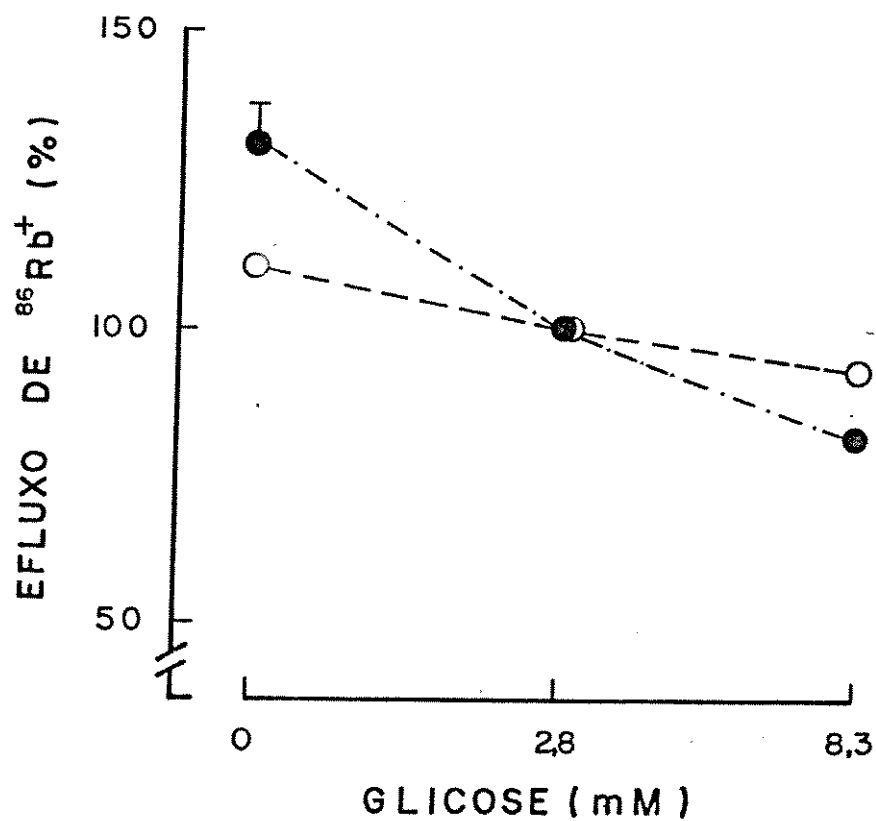


Figura 3

Percentagem de efluxo de  $^{86}\text{Rb}^+$  de ilhotas cultivadas na presença ( ●-.-.-● ) ou ausência ( ○- - -○ ) de PRL e submetidas a diferentes concentrações de glicose. Os valores médios ( $\pm$  EPM) de 5 pontos foram obtidos a partir do intervalo 48 a 56 min das fig. 1 e 2. O valor de 100 % representa o efluxo em ilhotas controle, perfundidas por solução contendo 2,8 mM de glicose.

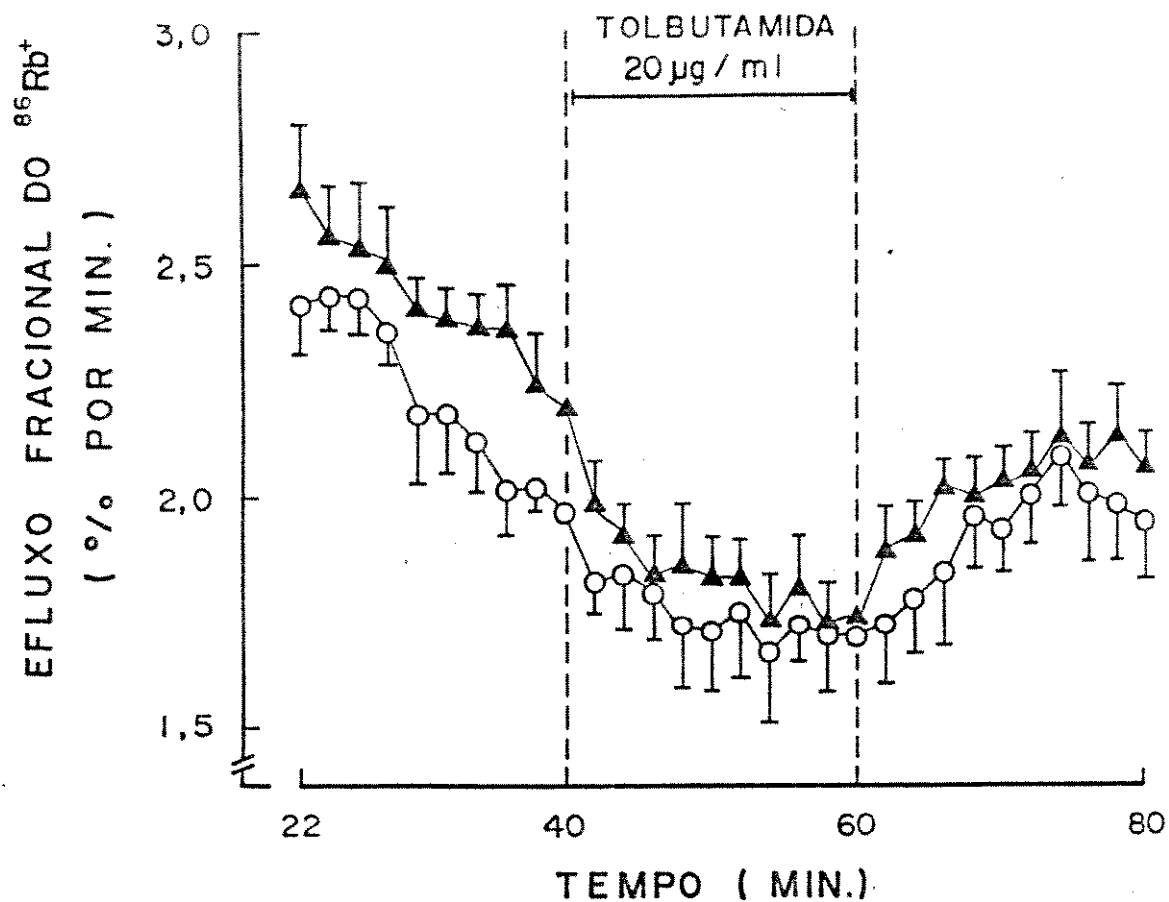


Figura 4

Efeito da tolbutamida (20 µg/ml) sobre o efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$ , de ilhotas mantidas em cultura por 7 a 9 dias, em presença (▲—▲) ou ausência (○—○) de PRL. Após incubação por 90 min em solução contendo  $^{86}\text{RbCl}$  e 16,7mM de glicose, as ilhotas foram perfundidas durante 80 min na ausência de glicose. As linhas tracejadas verticais indicam a introdução e a retirada da tolbutamida do meio perfusor. São indicadas as médias ( $\pm$  EPM) de 7 a 8 experimentos.



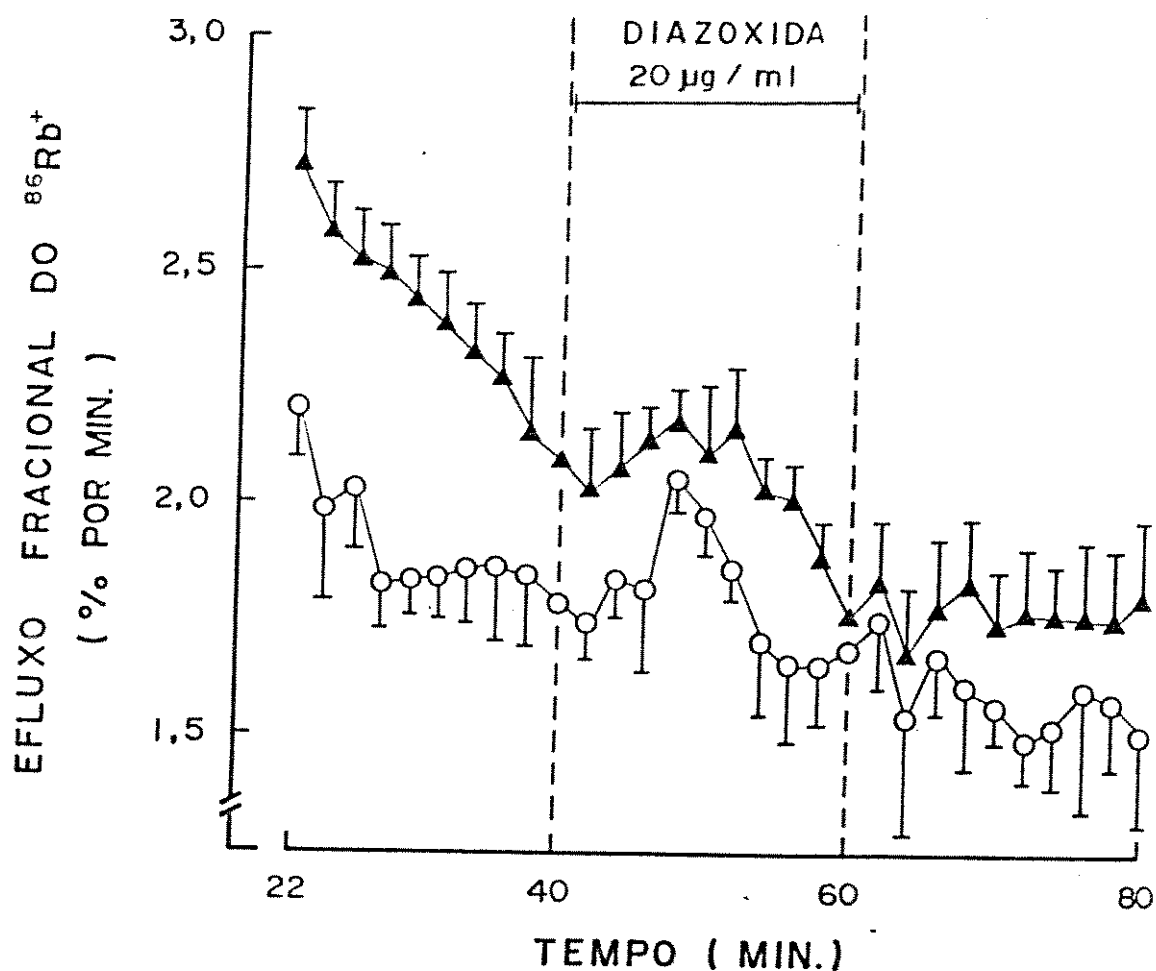


Figura 5

Efeito da diazoxida (20  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre o efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$  de ilhotas cultivadas em presença (▲—▲) ou ausência (○—○) de PRL. A marcação com o radioisótopo e a perfusão foram executados como descrito para a fig. 6. As linhas tracejadas verticais indicam a introdução e a retirada da diazoxida da solução perfusora. São indicadas as médias ( $\pm$  EPM) de 4 a 6 experimentos.

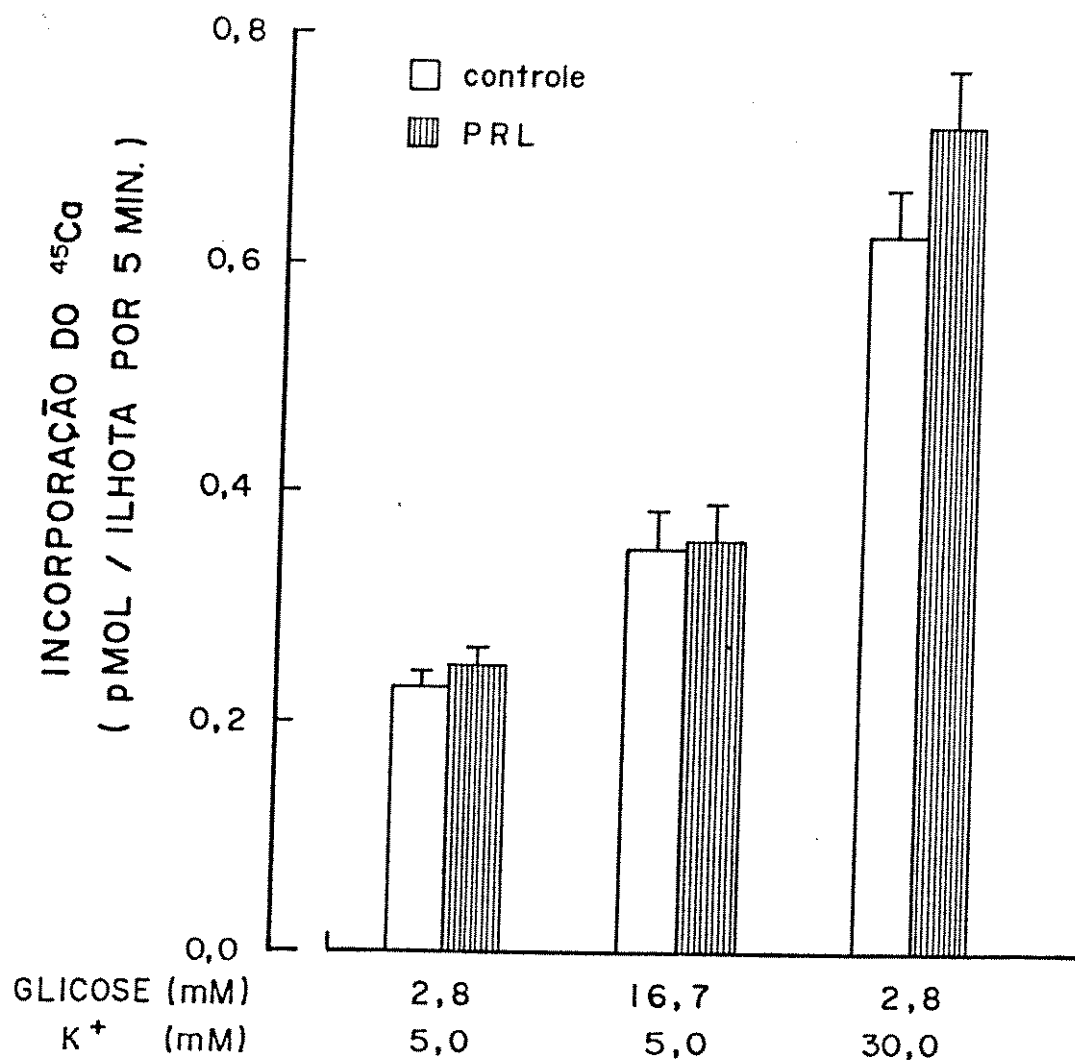


Figura 6

Efeito de 16,7 mM de glicose e 30 mM de KCl sobre a incorporação do  $^{45}\text{Ca}$ , por ilhotas neonatais mantidas em cultura por 7 a 9 dias, na ausência ou presença de PRL. Após cultura, as ilhotas foram pré-incubadas por 30 min em solução de Krebs modificada, tamponada a pH 7,4 utilizando-se HEPES (10 mM) e contendo 2,8 mM de glicose. São indicadas as médias  $\pm$  EPM, sendo  $n = 15$  a 24.

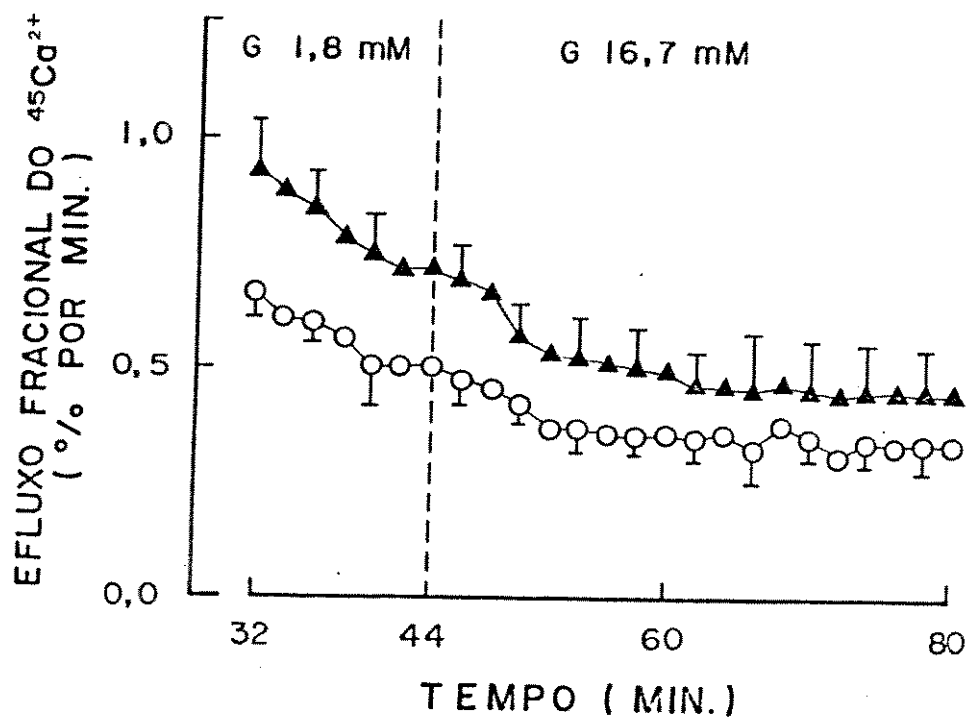


Figura 7

Efeito da glicose (16,7 mM) sobre o efluxo do  $^{45}\text{Ca}$  de ilhotas neonatais cultivadas em presença (▲—▲) ou ausência (○—○) de PRL. Após marcação durante 80 min com o radioisótopo correspondente, as ilhotas foram perfundidas durante 80 min, por solução sem acréscimo de  $\text{Ca}^{2+}$  e com acréscimo de 0,5 mM de EGTA. A linha tracejada vertical indica o aumento da concentração de glicose de 1,8 para 16,7 mM. As médias  $\pm$  EPM são indicadas ( $n = 4$ ).

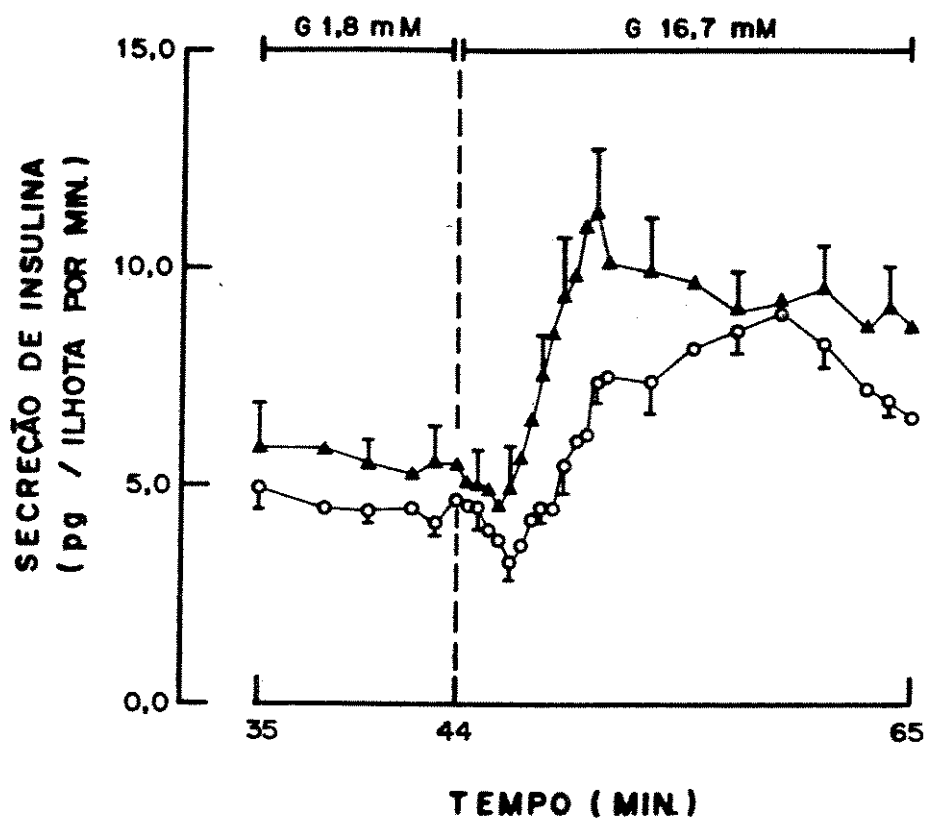


Figura 8

Efeito de 16,7 mM de glicose sobre a secreção de insulina, de ilhotas cultivadas na presença (  $\blacktriangle$  —  $\blacktriangle$  ) ou ausência (  $\circ$  —  $\circ$  ) de PRL. As ilhotas foram perfundidas durante 65 min por solução contendo 1,0 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . A linha tracejada vertical indica a introdução de 16,7 mM de glicose ao meio perfusor. São indicadas as médias ( $\pm$  KPM) de 5 experimentos.

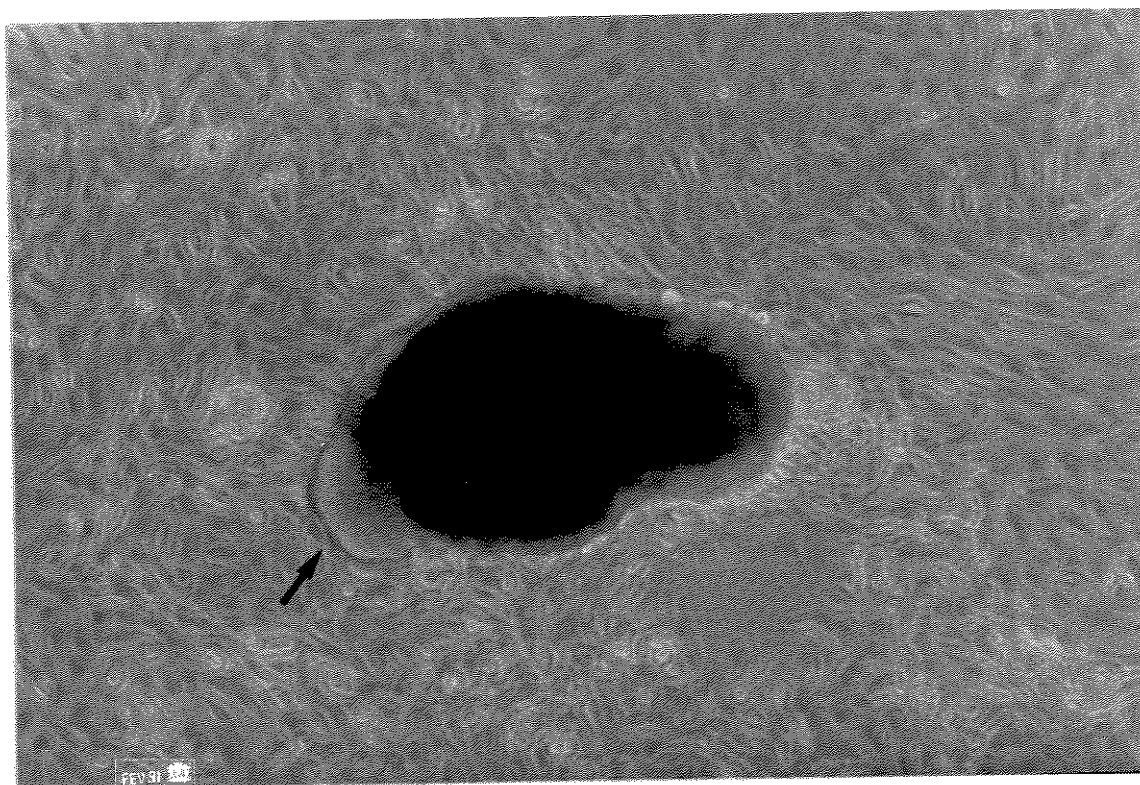


Figura 9

Fotomicrografia de uma cultura de ilhotas pancreáticas de ratos recém-nascidos; mantida por 5 dias em Meio Essencial Mínimo, suplementado com 10% de soro fetal bovino, contendo 10 mM de glicose, a 37°C e pH 7,4; obtida num microscópio invertido com contraste de fases (modelo Diaphot - Nikon, aumento: 400 X). Notam-se várias ilhotas ainda recobertas por tecido exócrino. A seta indica parte de uma destas ilhotas, já livre do material acinoso. Pode-se verificar ainda, grande proliferação de fibroblastos.

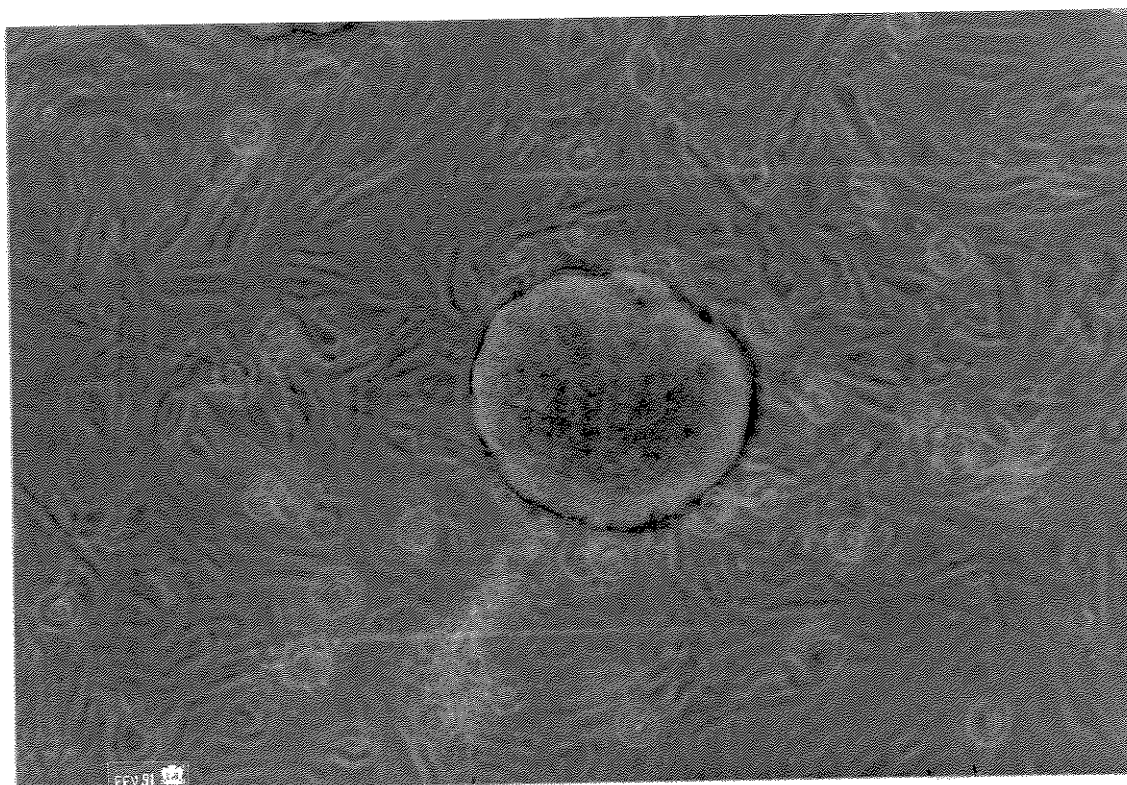
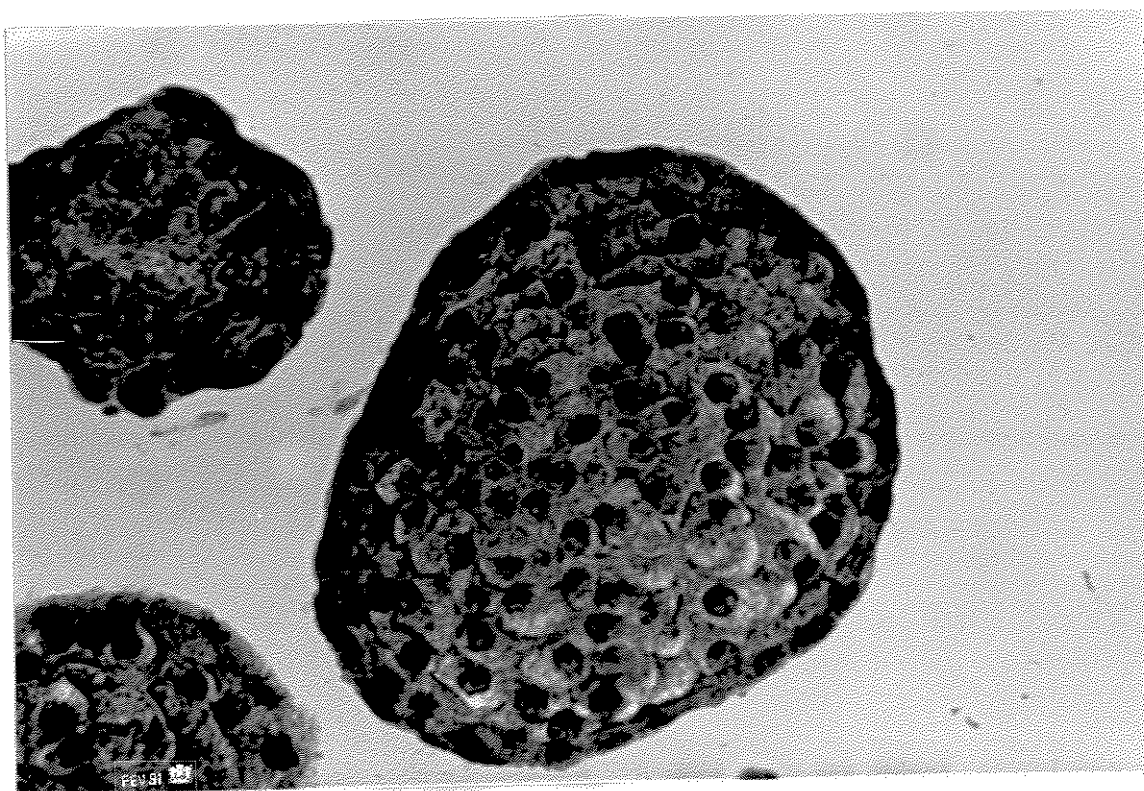


Figura 10

Fotomicrografia de uma cultura de ilhotas pancreáticas de ratos recém-nascidos; mantida sob as mesmas condições citadas na fig 9 ; obtida num microscópio invertido com contraste de fases. Observa-se uma ilhota completamente isolada do tecido exócrino, além de grande proliferação de fibroblastos (aumento: 800 X).



**Figura 11**

Fotomicrografia de secção de ilhotas pancreáticas de ratos neonatais; após cultura por 7 dias, em condições idênticas às citadas na fig. 9; coradas com hematoxilina-eosina. A fotomicrografia foi obtida em microscópio marca ZEISS (aumento: 1600 X).

#### 4. DISCUSSÃO

As células B pancreáticas, durante a fase de vida perinatal, passam por um processo de maturação funcional, adquirindo progressivamente um padrão de resposta à glicose, típico de células B adultas (ASPLUND, 1973a; RHOTEN, 1980; KERVRAN & RANDON, 1980; FREINKEL et alii, 1984; HOLE et alii, 1988). Os fatores que controlam este processo são pouco conhecidos e a compreensão dos mesmos torna-se importante, do ponto de vista fisiológico, e também devido às similaridades existentes entre células B fetais e células B de adultos em alguns estados patológicos. Assim, o conhecimento do mecanismo de maturação das ilhotas pancreáticas, durante a fase perinatal, pode contribuir para esclarecimentos da degeneração da sensibilidade à glicose que ocorre no diabetes tipo 2 (WARD et alii, 1984; KAHN & PORTE, 1988; LEAHY, 1990) assim como no diabetes da fase senil (ELAHI et alii, 1985; AMMON et alii, 1987; REAVEN et alii, 1987).

É interessante ressaltar que durante a transição da vida fetal para neonatal, a concentração plasmática de alguns hormônios apresenta-se elevada. Dentre estes, a PRL parece participar de forma bastante efetiva no processo de maturação da resposta secretória, uma vez que este hormônio altera a sensibilidade das células B à glicose e aumenta o acoplamento entre elas, em ilhotas neonatais (4 dias) mantidas em cultura (SORENSEN et alii, 1987a). Contudo, os mecanismos celulares



através dos quais a PRL induz estas mudanças, não estão elucidados.

Diante destas informações, nosso objetivo foi estudar em ilhotas neonatais de rato, os efeitos do tratamento crônico com PRL, sobre as permeabilidades dos íons potássio e cálcio e sobre a secreção de insulina.

Sabe-se que uma das etapas fundamentais do mecanismo de secreção de insulina, consiste no bloqueio da permeabilidade ao  $K^+$  induzido pelo ATP, após metabolização da glicose (COOK & HALES, 1984; PETERSEN & FINDLAY, 1987; ASHCROFT et alii, 1984). Este aspecto foi estudado analisando-se os efeitos da glicose sobre o efluxo do  $^{86}Rb^+$ , em ilhotas tratadas ou não com PRL. Observamos pelas fig. 1 a 3 e tab. I a IV que as alterações na permeabilidade ao  $^{86}Rb^+$ , induzidas por mudanças na concentração de glicose, foram significativamente maiores em ilhotas tratadas com o hormônio do que em relação às controle. O tratamento com PRL, nesta condição induziu uma resposta semelhante àquela apresentada por ilhotas adultas não tratadas (BOSCHERO et alii, 1988), quando se elevou a concentração de glicose de 2,8 para 8,3 mM, bem como, quando se retirou a glicose do perfusato. AMMON et alii (1985) não detectaram redução no efluxo de  $^{86}Rb^+$ , em ilhotas recém-isoladas de fetos (21 dias) de rato, quando elevaram a concentração de glicose de 3,0 para 5,6 ou 16,7 mM. A ausência de efeito redutor do secretagogo sobre o efluxo do referido isótopo, demonstrada por AMMON et alii (1985), pode estar relacionada ao fato destes

pesquisadores não terem analisado o efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$  na ausência do açúcar; considerando-se que no intervalo de concentração de zero para 3,0 mM é onde reside o maior efeito bloqueador da glicose sobre a permeabilidade do  $^{86}\text{Rb}^+$  (HENQUIN, 1978; BOSCHERO et alii, 1988).

Em células B fetais e neonatais, demonstrou-se a presença de canais de  $\text{K}^+$  modulados pelo ATP (COOK et alii, 1986; RORSMAN et alii, 1989), cuja sensibilidade a este nucleotídeo foi similar à de uma célula B adulta (ARKHAMMAR et alii, 1987; DUNE & PETERSEN, 1986). Diante da existência deste canais, já operantes nas células B fetais e neonatais, foi proposto que o maior "defeito" nestas ilhotas imaturas, poderia estar na deficiência da produção de um sinal metabólico apropriado, o qual modula a atividade do canal (FREINKEL et alii, 1984; RORSMAN et alii, 1989; BOSCHERO et alii, 1990b). Contudo, observação de BOSCHERO et alii (1988); de que ilhotas neonatais mantidas em cultura, apresentam um efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$  reduzido em relação a ilhotas adultas, na ausência de glicose; sugere uma menor densidade e/ou comportamento alterado dos canais de  $\text{K}^+$  modulados pelo ATP.

Portanto, o fato do tratamento com PRL ter induzido uma resposta maior sobre o bloqueio da permeabilidade ao  $\text{K}^+$ , frente a variações na concentração de glicose, indica um possível efeito direto do hormônio, a nível dos canais de  $\text{K}^+$ , aumentando a densidade e/ou sensibilidade dos canais operantes, ou ainda,

um efeito indireto na maturação das vias metabólicas oxidativas da glicose.

Visando a esclarecer melhor esta questão, analisamos os efeitos da tolbutamida e da diazoxida sobre o efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$ , uma vez que as mesmas atuam nos canais de  $\text{K}^+$  modulados por ATP. Essas drogas exercem ações contrárias, sendo que a tolbutamida provoca o bloqueio, enquanto a diazoxida induz a abertura destes canais (HENQUIN & MEISSNER, 1982; TRUBE et alii, 1986).

Em relação às sulfoniluréias hipoglicemiantes, estudos anteriores relataram que em ilhotas fetais (21 dias) recém-isoladas, a tolbutamida não reduziu o efluxo de  $^{86}\text{Rb}^+$ , na presença de 3 mM de glicose (AMMON et alii, 1989). No mesmo tipo de preparação, glipizide mostrou-se ineficaz no aumento da secreção de insulina (PETERSON et alii, 1986). Em nossos experimentos, os efeitos da tolbutamida e da diazoxida sobre a permeabilidade do  $^{86}\text{Rb}^+$ , foram mais acentuados em ilhotas tratadas com PRL que quando comparadas a ilhotas controle (fig. 4 e 5; tab. V a VIII). Estes resultados indicam que a ação do hormônio se manifesta, pelo menos em parte, diretamente sobre os canais de  $\text{K}^+$  modulados pelo ATP, uma vez que foi observada uma maior eficiência dos fluxos de  $\text{K}^+$  após o tratamento com PRL..

É sabido que durante o processo de secreção de insulina, o bloqueio dos canais de  $\text{K}^+$ , metabolicamente regulados, provoca retenção do íon, induzindo despolarização da membrana da célula B (BOSCHERO et alii, 1977; PETERSEN & FINDLEY, 1987) com

consequente ativação da permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  dependente da voltagem (WOLLHEIM & SHARP, 1981). O íon cálcio por sua vez, ativa o sistema efector microtubular-microfilamentar (HARRISON et alii, 1984), responsável pela extrusão dos grânulos de insulina (HUTTON, 1984).

Desta forma, a etapa seguinte em nossos estudos, foi verificar o efeito do tratamento com PRL, sobre os fluxos de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . A captação de cálcio pela célula B pancreática adulta, é um processo que ocorre, principalmente, via canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes (BRAUNWALD, 1982); os quais foram recentemente demonstrados também em pâncreas fetal de rato (HOLE et alii, 1988), e pâncreas fetal humano (TUCH et alii, 1990), nos quais a secreção de insulina induzida por concentrações despolarizantes de KCl, foi inibida pelo bloqueador de canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , verapamil. Verificamos que 16,7 mM de glicose e em maior grau, 30 mM de KCl, causaram aumentos significativos na captação do  $^{45}\text{Ca}$ , em ambos os grupos de ilhotas, quando comparados com os respectivos valores basais (fig 6). Contudo, os aumentos obtidos foram proporcionalmente menores do que os observados em ilhotas adultas recém-isoladas (PLASMAN et alii, 1990) ou cultivadas (VERSPOHL et alii, 1988). Em contraste aos nossos resultados, AMMON et alii (1985) e AMMON et alii (1989), não observaram alterações na captação de cálcio por ilhotas fetais, frente à glicose. A elevada incorporação de cálcio que ocorreu em presença de 30 mM de  $\text{K}^{+}$ , sugere que canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à voltagem, estão presentes

e operantes em ilhotas neonatais de rato após 7 dias em cultura. Sugere ainda que o tratamento com PRL não alterou a densidade nem funcionalidade destes canais. Esses dados indicam também que o aumento da sensibilidade à glicose sobre as alterações da permeabilidade ao  $K^+$ , induzido pelo tratamento crônico pelo PRL, não levou a um aumento na incorporação de  $^{45}Ca^{2+}$ .

Analizamos também o efeito da glicose em reduzir o efluxo do  $^{45}Ca^{2+}$ , de ilhotas perfundidas em meio deficiente em  $Ca^{2+}$  e enriquecido com EGTA (fig. 7, Tab. IX e X). Ao contrário do observado em ilhotas adultas recém-isoladas ou cultivadas (BOSCHERO et alii, 1990a; BORDIN, 1991), não foi verificada nenhuma redução significativa no efluxo, quando foi adicionado 16,7 mM de glicose à solução perfusora, tanto em ilhotas neonatais controle quanto nas tratadas com PRL.

Nossos resultados, obtidos após o tratamento de ilhotas neonatais com PRL, contrastam com aqueles apresentados por SORENSON et alii (1987a) quanto ao conteúdo total de insulina. Esses autores não registraram aumento no conteúdo de insulina, porém, em concordância aos nossos resultados, observaram aumento na secreção de insulina frente a alta concentração de glicose em ilhotas tratadas com PRL.

Por outro lado, MARKOFF et alii (1990), discutem que o aumento na insulina liberada por ilhotas neonatais, após tratamento com PRL, é proporcional a elevação na síntese protéica total sugerindo que o efeito do hormônio no aumento da

secreção de insulina (o qual neste caso, foi cerca de 30% acima do observado em ilhotas controle), parece não ser específico. Assim, o hormônio atuaria como estímulo geral de atividade metabólica.

Concluindo, nossos resultados indicam que o tratamento crônico com PRL, aumentou o conteúdo total de insulina, alterou a capacidade da glicose em reduzir o efluxo do  $K^+$  e melhorou a resposta secretória frente a glicose, em ilhotas neonatais de rato. Contudo, a PRL não influenciou significativamente em relação ao efeito da glicose sobre os fluxos de  $Ca^{2+}$ .

## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo analisar o efeito da PRL no processo de maturação da resposta secretória à glicose em células B pancreáticas. Ênfase foi dada, ao estudo de possíveis alterações nas permeabilidades dos íons potássio e cálcio e sobre a secreção de insulina.

Para isto, ilhotas de ratos Wistar recém-nascidos, foram cultivadas por 7 a 9 dias, em Meio Essencial Mínimo, acrescido de 11% de soro fetal bovino (v/v), 2% da mistura penicilina (100 U/ml)-estreptomicina (0,1 mg/ml), com concentração final de glicose de 10 mM. As ilhotas foram mantidas a 37°C; pH 7,4; em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi renovado a cada 48 horas. Parte do material em cultura serviu como controle e parte recebeu tratamento diário com PRL (2 µg/ml).

Após o período de cultura, foram executados os seguintes protocolos:

- a) Perfusão de ilhotas para a análise da dinâmica do efluxo do <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>, do <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> e da secreção de insulina.
- b) Medidas do influxo de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>.
- c) Extração e dosagem do conteúdo total de insulina por ilhota.

Os resultados mostraram que:

1. A capacidade da glicose em alterar o efluxo do <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>, foi maior em ilhotas tratadas com PRL do que em relação às controle.

2. O efeito da tolbutamida, diminuindo e da diazoxida, aumentando o efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$ , foi mais acentuado em ilhotas tratadas com PRL do que nas controle.

3. O aumento na incorporação de  $^{45}\text{Ca}$  que ocorreu frente ao aumento da concentração de glicose ou de  $\text{K}^+$ , foi semelhante em ambos os grupos experimentais.

4. Na ausência do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, glicose não provocou redução no efluxo do  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , em ambos os grupos de ilhotas.

5. O tratamento hormonal melhorou a resposta secretória das ilhotas, quando estimuladas por 16,7 mM de glicose.

6. O conteúdo total de insulina foi maior em ilhotas tratadas com PRL do que em ilhotas controle.

Concluindo, os resultados indicam que em ilhotas neonatais de rato, o tratamento crônico com PRL, aumentou o conteúdo de insulina, potencializou a capacidade da glicose em reduzir o efluxo do  $\text{K}^+$  e em aumentar a secreção de insulina. Contudo, o tratamento com PRL não influiu de maneira significativa sobre o efeito da glicose a nível dos fluxos de  $\text{Ca}^{2+}$ .



## 7. ABSTRACT

The present study aimed to compare the effect of PRL on the maturation of the mechanisms of insulin secretion induced by glucose in neonatal pancreatic islets. Our attention were centralized mainly on possible alterations in  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  fluxes and insulin release.

For this purpose islets from neonatal Wistar rats were cultured for 7 to 9 days in Minimal Essential Medium, supplemented with 11% fetal calf serum (v/v), 2% penicilin (100 U/ml)-streptomycin (0,1 mg/ml) and glucose (final concentration 10 mM). The islets were maintained at 37°C; pH 7,4; in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. Culture medium was renewed every 48 hours. Part of the islets was used as control and part was treated daily with PRL (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

After culture, the following protocols were executed:

a) Measurement of  $^{86}\text{Rb}^{+}$  and  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  efflux rate and insulin release by perfused islets.

b) Measurement of  $^{45}\text{Ca}$  influx in incubated islets.

c) Measurement of total insulin content in the islets.

The results showed that:

1. The capacity of glucose in changing the  $^{86}\text{Rb}^{+}$  efflux, was higher in PRL-treated islets than in control islets.

2. The effects of tolbutamide (lowering) and diazoxide (increasing) the  $^{86}\text{Rb}^{+}$  efflux, were higher in PRL-treated than in control islets.

3. PRL-treatment did not affect the ability of glucose and high  $K^+$  to increase the  $^{45}Ca$  uptake by incubated islets.

4. Glucose failed to affect the  $^{45}Ca^{2+}$  efflux from islets perfused in the absence of  $Ca^{2+}$ , either in PRL-treated or control islets.

5. Total insulin content was higher in PRL-treated than in control islets.

6. Finally, glucose induced higher increase in insulin secretion in PRL-treated islets than in control islets.

The results indicate that in neonatal rat islets, the chronic treatment with PRL increased the insulin content of islets and significantly changed the ability of glucose in reducing the  $K^+$  efflux and to increasing the insulin secretion. However, PRL treatment did not influence the effect of glucose on  $Ca^{2+}$  fluxes.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

1. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. ; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Cell adhesion, cell junctions, and the extracellular matrix. In: MOLECULAR biology of the cell. 2 ed. Ed B. Alberts et alii. New York, Garland, 1989. p 791-836.
2. AMMON, H.P.T.; BUMILLER, G.; DUPPENBECKER, H.; HEINZE, E.; LUTZ, S.; VERSPOHL, E.J. Pentose phosphate shunt, pyridine nucleotides, glutathione, and insulin secretion of fetal islets. *Am. J. Physiol.*, 244: 354-60, 1983.
3. AMMON, H.P.T.; FAHMY, A.; MARK, M.; STROLIN, W.; WAHL, M.A. Failure of glucose to affect <sup>86</sup>Rubidium efflux and <sup>45</sup>Calcium uptake of fetal rat pancreatic islets. *J. Physiol.*, 358: 365-72, 1985.
4. AMMON, H.P.T.; FAHMY, A.; MARK, M.; WAHL, M.A.; YOUSSEF, N. The effect of glucose on insulin release and ion movements in isolated pancreatic islets of rats in old age. *J. Physiol.*, 384: 347-54, 1987.

---

\* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS

Referências bibliográficas: N.B. In: NORMAS ABNT sobre documentação. Rio de Janeiro, 1978. p 13-20. SERIAL Sources for the BIOSIS data base. Philadelphia. BIOSIS, 1991.

5. AMMON, H.P.T.; GLOCKER, G.; WALDNER, R.G.; WAHL, M.A.  
Insulin release from pancreatic islets of fetal rats mediated by leucine b-BCH, tolbutamide, glibenclamide, arginine, potassium chloride, and theophylline does not require stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  net uptake. *Cell Calcium*, 10: 441-50, 1989.
6. ANDERSON, A. & HELLERSTROM, C. Metabolic characteristics of isolated pancreatic islets in tissue culture. *Diabetes*, 21: 546-54, 1972.
7. ARAGONA, C. & FRIESEN, H.G. Lactation and galactorrhea. *Endocrinology*, 3: p 1613, 1979. apud NIELSEN, J.H., 1982.
8. ARKHAMMAR, P.; NILSSON, T.; RORSMAN, P.; BERGGREN, P.O.  
Inhibition of ATP-regulated  $\text{K}^{+}$  channel preceds depolarization-induced increase in cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Biol. Chem.*, 262: 5448-54, 1987.
9. ASPLUND, K. Dynamics of insulin release from the foetal and neonatal rat pancreas. *Eur. J. Clin. Invest.*, 3: 338-44, 1973a.

10. ASPLUND, K.        Effects of glucose on insulin biosynthesis in foetal and newborn rats. *Horm. Metab. Res.*, 5: 410-5, 1973b.
11. ASPLUND, K.; ANDERSSON, A.; JARROUSSE, C.; HELLERSTROM, C.        Function of the fetal endocrine pancreas. *Isr. J. Med. Sci.*, 11: 581-90, 1975.
12. ASPLUND, K.; WESTMAN, S.; HELLERSTROM, C.        Glucose stimulation of insulin secretion from the isolated pancreas of foetal and newborn rats. *Diabetologia*, 5: 260-2, 1969.
13. ASHCROFT, F.M.; HARRISON, D.E.; ASCROFT, S.J.H.        Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic B-cells. *Nature*, 312: 446 - 8, 1984.
14. BAXTER-GRILLO, D.; BLASQUEZ, E.; SODOYEZ, T.A.I.; SODOYEZ-GOFFAUX, J.C.; FOA, P.P.        In: THE ISLETS of Langerhans: Biochemistry, Physiology and Pathology. Ed. S.J. Cooperstein & D. Watkins. New York, Academic Press, 1981. p. 35-49. apud MOURMEAUX, J.L. et alii, 1985.

15. BECK, P. & DAUGHADAY, W.H. Human placental lactogen: studies of its acute metabolic effects and disposition in normal man. *J. Clin. Invest.*, 84: 619-21, 1967 apud SORENSON, R.L. et alii, 1987b.
16. BENNETT, L.L. & CURRY, D.L. Growth hormone and insulin secretion. In: *GROWTH hormone and related peptides*. Ed. A. Pecile & E. E. Muller. Amsterdam, Excerpta Medica, 1976. p 116. apud NIELSEN, J.H., 1982.
17. BORDIN, S. Efeitos da glicose sobre a secreção de insulina, efluxo de  $^{45}\text{Ca}$  e concentração citosólica do  $\text{Ca}^{2+}$  em ilhotas de Langerhans de ratos adultos, recém-isoladas ou mantidas em cultura. Campinas, 1991, 68 p. [Dissertação - Mestrado. Instituto de Biologia da Univ. Estadual de Campinas].
18. BOSCHERO, A.C.; BORDIN, S.; HERCHUELZ, A.; LEBRUN, P. Effects of glucose on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  outflow, cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and insulin release from freshly isolated and cultured adult rat islets. *Cell Calcium*, 11: 603-9, 1990a.

19. BOSCHERO, A.C.; BORDIN, S.; SENER, A.; MALAISSE, W.J. D-glucose and L-leucine metabolism in neonatal and adult cultured rat pancreatic islets. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1990b (no prelo).
20. BOSCHERO, A.C.; KAWAZU, S.; DUNCAN, G.; MALAISSE, W.J. Effects of glucose on K<sup>+</sup> handling by pancreatic islets. *FEBS Lett.*, 83: 151-4, 1977.
21. BOSCHERO, A.C.; MALAISSE, W.J. Effect of glucose, theophylline, Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> upon <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> efflux from pancreatic islets. *Proc. Int. Union Physiol. Sci.*, 13: 89, 1977.
22. BOSCHERO, A.C.; TOMBACCINI, D.; ATWATER, I. Effects of glucose on insulin release and <sup>86</sup>Rb-permeability in cultured neonatal and adult rat islets. *FEBS Lett.*, 236: 375-9, 1988.
23. BOSCHERO, A.C.; TOMBACCINI, D.; ATWATER, I. Effects of triiodothyronine on insulin release from cultured neonatal and adult rat islets. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 22: 1015-7, 1989.

24. BRAUNWALD, E. Mechanism of action of calcium-channel-blocking agents. *N. Engl. J. Med.*, 307: 1618-27, 1982.
25. BURR, I.M.; STAUFFACHER, W.; BALANT, L.; RENOLD, E.; GRODSKY, G.M. Regulation of insulin release in perfused pancreatic tissue. *Acta Diabetol. Lat.*, 6: 580-96, 1969.
26. CARNEIRO, E.M. Permeabilidade ao potássio (cálcio intracelular-dependente) nas células beta de pâncreas de rato. Efeito da Gentamicina. Campinas, 1989, 65p [Dissertação - Mestrado. Instituto de Biologia da Univ. Estadual de Campinas].
27. CLEMENTS, R.S.Jr. & RHOTEN, W.B. Phosphoinositide metabolism and insulin secretion from isolated rat pancreatic islets. *J. Clin. Invest.*, 57: 684-91, 1976.
28. COOK, D.L. & HALES, C.N. Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channel in pancreatic beta cells. *Nature*, 311: 271-3, 1984.
29. COOK, D.L.; HALES, C.N.; SATIN, L.S. Glucose suppresses ATP-inhibited K-channels in pancreatic B-cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 211: 63-7, 1986.



30. CORNBLATH, M.; PARKER, M.L.; REISNER, S.H.; FORBES, A.E.; DAUDHADAY, W.H. Secretion and metabolism of growth hormone in premature and full-term infants. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 25: 209 ,1965 apud NIELSEN, J.H., 1982.
31. CURRY, D.L.; BENNETT, L.L.; GRODSKY, G.M. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology*, 83: 572-84, 1968.
32. DAWSON, C.M.; CROGHAN, P.C.; SCOTT, A.M.; BANGHAM, J.A. Potassium and rubidium permeability and potassium conductance of the B-cell in mouse islets of Langerhans. *Q. J. Exp. Physiol.*, 71: 205, 1986.
33. DESBUQUOIS, B. & AURBACH, G.D. Use of Polyethylene Glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. *J. Clin. Endocrinol* ., 33: 732-8, 1971.
34. DUDEK, R.W.; FREINKEL, N.; LEWIS, N.J.; HELLERSTROM, C.; JOHNSON, R.C. Morphologic study of cultured pancreatic fetal islets during maturation of the insulin stimulus-secretion mechanism. *Diabetes*, 29: 15-21, 1980.

35. DUDEK, R.W.; KAWABE, T.; BRINN, J.E.; O'BRIEN, K.; POOLE, M.C.; MORGAN, C.R. Glucose affects "in vitro" maturation of fetal rat islets. *Endocrinology*, 114: 582-7, 1984.
36. DUNNE, M.J. & PETERSEN, O.H. Intracellular ADP activates  $K^+$  channels that are inhibited by ATP in on insulin-secreting cell line. *FEBS Lett.*, 208: 59-62, 1986.
37. EDDLESTONE, G.T.; GONÇALVES, A.A.; BANGHAM, J.A.; ROJAS, E. Electrical coupling between cells in islets of Langerhans from mouse. *J. Membr. Biol.*, 77: 1-14, 1984.
38. ELAHI, D.; MULLER, D.C.; ANDERSEN, D.K.; TOBIN, J.D.; ANDRES, R. The effect of age and glucose concentration on insulin secretion by the isolated perfused rat pancreas. *Endocrinology*, 116: 11-6, 1985.
39. EVERSMAN, T.R.; LANDGRAF, W.; LONDONG, K.; VON WERDER Effect of cimetidine on prolactin secretion and glucose tolerance in men. *Horm. Metab. Res.*, 11: 412-3, 1979.

40. FISHER, D.A.; DUSSAULT, J.H.; SACK, J.; CHOPRA, I.J.  
Ontogenesis of hypothalamic-pituitary-thyroid function  
and metabolism in man, sheep and rat. **Recent Prog.  
Horm. Res.**, 33: 59-116 ,1977 apud BOSCHERO, A.C. et  
alii, 1989.
41. FREINKEL, N.; LEWIS, N.J.; JOHNSON, R.; HELLERSTROM, C.  
Maturation of stimulus recognition and insulin secretion  
during tissue culture of fetal pancreas islets. **Trans.  
Am. Clin. Clin. Assoc.**, 90: 86, 1978.
42. FREINKEL, N.; LEWIS, N.J.; JOHNSON, R.; SWENNE, I.; BONE,  
A.; HELLERSTROM, C. Differential effects of age versus  
glicemic stimulation on the maturation of insulin  
stimulus-secretion. Coupling during culture of fetal rat  
islets. **Diabetes**, 33: 1028-38, 1984.
43. GARAY, G.L.; AKERBLOM, H.K.; MARTIN, J.M. Experimental  
hypersomatotropism serum growth hormone and insulin and  
pituitary and pancreatic changes in MtTW15 tumor-bearing  
rats before and after tumor removal. **Horm. Metab. Res.**,  
3: 82-9, 1971.

44. GIRARD, J.R.; KERVAN, A.; SOUFFLET, E.; ASSAN, R.  
Factors affecting the secretion of insulin and glucogen  
by rat fetus. *Diabetes*, 23: 310-7, 1974.
  
45. GRASSO, S.; MESSINA, A.; DISTEFANO, G.; VIGO, R.; REITANO,  
G. Insulin secretion in the premature infant. Response  
to glucose and amino-acids. *Diabetes*, 22: 349-53, 1973.
  
46. GRASSO, S.; SAPORITA, N.; MESSINA, A.; REITANO, G.  
Serum-insulin response to glucose and amino-acids in the  
premature infant. *Lancet*, 2: 755-7, 1968.
  
47. 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. Endocrinol.*, 54: 317-25, 1972.
  
48. GRODSKY, G.M.; BENNET, L.L.; SMITH, D.F.; SCHMID, F.G.  
Effect of pulse administration of glucose or glucagon on  
insulin secretion in vitro. *Metabolism*, 16: 222-33,  
1967.
  
49. GUSTAFSON, A.B.; BANASIAK, M.F.; KALHOFF, R.K.; HAGEN,  
T.C.; KIM, H.J. Prolactin-induced hyperinsulinemia.  
*Clin. Res.*, 26: 720A, 1978.

50. GUSTAFSON, A.B.; BANASIAK, M.F.; KALHOFF, R.K.; HAGEN, T.C.; KIM, H.J. Correlation of hiperprolactinemia with altered plasma insulin and glucagon: similarity to effects of late human pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51: 242-46, 1980.
51. HAGEN, C.; PEDERSEN, P.B.; JENSEN, S.B.; FABER, O.K.; JENSEN, T. The effect of supiride induced hyperprolactinaemia on glucose tolerance and insulin secretion in normal subjects. *Clin. Endocrinol.*, 10: 55-60, 1979.
52. HANKS, J.H. & WALLACE, R.E. Regulation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 71: 196-200, 1949. apud HERCHUELZ, A, 1980.
53. HARRISON, D.E.; ASHCROFT, S.J.H.; CHRISTIE, M.R.; LORD, J.M. Protein phosphorylation in the pancreatic B-cell. *Experientia*, 40: 1075-84, 1984.
54. HEINZE, E. & STEINKE, J. Glucose metabolism of isolated pancreatic islets: difference between fetal, newborn and adult rats. *Endocrinology*, 88: 1259-63, 1971.

55. HEINZE, E. & STEINKE, J.        Insulin secretion during development: response of isolated pancreatic islets of fetal, newborn and adult rats to theophylline and arginine. *Horm. Metabol. Res.*, 4: 234-6, 1972.
56. HELLERSTROM, C.    Growth pattern of pancreatic islets in animals.    In: THE DIABETIC pancreas. Ed. B. W. Volk & K. F. Wellmannn. New York, Plenum Press, 1977, 61 p. apud NIELSEN, J.H., 1982.
57. HELLERSTROM, C; LEWIS, N.; BORG, H.; JOHSON, R.; FREINKEL, N.    Method for large scale isolation of pancreatic islets by tissue culture of fetal rat pancreas. *Diabetes*, 28: 767-6, 1979.
58. HELLMAN, B.; SEHLIN, J.; TALJEDAL, 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, 1976.
59. HENQUIN, J.C.        D-glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islet cells.    *Nature*, 271: 271-3, 1978.

60. HENQUIN, J.C. & MEISSNER, H.P. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on  $^{86}\text{Rb}^+$  fluxes and membrane potential in pancreatic B cells. *Biochem. Pharmacol.*, 31: 1407-15, 1982.
61. HERCHUELZ, A. Regulation des flux calciques dans les ilots des Langerhans. Bruxelles, 1980, 336 p. [Tese - Univ. Libre de Bruxelles].
62. HOET, J.J.; GRASSO, S.; VAN ASSCHE, F.A. Endocrine factors in islets cell maturation. In: EARLY DIABETES in Early Life. Ed. R.A. Davalos & H.S. Cole. New York, Academic, 1975, 93 p. apud NIELSEN, J.H., 1982.
63. HOLE, R.L.; PIAN-SMITH, M.C.M.; SHARP, G.W.G. Development of biphasic response to glucose in fetal and neonatal rat pancreas. *Am. J. Physiol.*, 254: 167E-74, 1988.
64. HOUSSAY, B.A. Others hormones. In: WILLIAMS, R.H. Diabetes, New York, B.Hoeber, 1960. pp.233-56 apud NIELSEN, J.H., 1982.

65. HOUSSAY, B.A. & PENHOS, J.C. Diabetogenic action of pituitary hormones on adrenalectomized hypophysectomized dogs. *Endocrinology*, 59: 637-41, 1956 apud KATZ, E.J. et alii, 1981.
66. HUTTON, J.C. Secretory granules. *Experientia*, 40: 1091-8, 1984.
67. KAHN, S.E. & PORTE, D.J. Islet dysfunction in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Am. J. Med.*, 85(Suppl. 5A): 4-8, 1988.
68. KAISER, N.; CORCOS, A.P.; TUR-SINAI, A.; ARIAV, Y.; CERASI, E. Monolayer culture of adult rat pancreatic islets on extracellular matrix: long term maintenance of differentiated B-cell function. *Endocrinology*, 123: 834-40, 1988.
69. KATZ, E.J.; DONALD, R.A.; BEAVEN, D.W.; ESPINER, E.A. Lack of effect of hyperprolactinaemia on glucose disposal and insulin secretion in patients with prolactinomas. *Horm. Metabol. Res.*, 13: 667-9, 1981.



70. KERVRAN, A. & RANDON, J. Development of insulin release by fetal rat pancreas in vitro: effects of glucose, amino acids, and theophylline. *Diabetes*, 29: 673-8, 1980.
71. KITZMILLER, J.L. The endocrine pancreas and maternal metabolism. In: *MATERNAL and Fetal Endocrinology*. Ed. D. Tolchinsky & K.J. Ryan. Philadelphia, Saunders, 1980, p. 58-83. ,1980. apud SORENSON, R.L. & PARSONS, J.A., 1985.
72. KOHEN, E.; KOHEN, C.; THEORELL, B.; MINTZ, D.H.; RABINOVITCH, A. Intercellular communication in pancreatic islets monolayer cultures: a microfluorometric study. *Science*, 204: 862-5, 1979.
73. KREBS, H.A. & HENSELEIT, K. Untersuchungen uber die Hanstoffbildung im Tierkoper. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.-Chem.*, 210: 33-66, 1932 apud HERCHUELZ, A., 1980.
74. LACY, P.E. & KOSTIANOVSKY, H. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from rat pancreas. *Diabetes*, 16: 35-9 ,1967. apud HELLERSTROM, C. et alii, 1979

75. LAMBERT, A.E.; JEANRENAUD, B.; JUNOD, A.; RENOLD, A.E.  
Insulin release induced by amino acids. **Biochem. Biophys. Acts.**, 174: 540-53, 1969.
76. LAMBERT, A.E.; KANAZAWA, Y.; BURR, I.; ORCI, L.; RENOLD, A.E.  
On the role of cyclic AMP in insulin release. I. Overall effects in cultured fetal rat pancreas. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 185: 232-44, 1971.
77. LANDGRAF, R.; LANDGRAF-LEURS, M.M.C.; WEISSMANN, A.; HORL, R.; VON WERDER, K.; SCRIBA, P.C.  
Prolactin: a diabetogenic hormone. **Diabetologia**, 13: 99-104, 1977.
78. LAVINE, R.L.; CHICK, W.L.; LIKE, A.A.; MAKDISI, T.W.  
Glucose tolerance and insulin secretion in neonatal and adult mice. **Diabetes**, 20: 134-9, 1971.
79. LEAHY, J.L.  
Natural history of B-cell dysfunction in NIDDM. **Diabetes Care**, 13: 912-1010, 1990.
80. MALAISSE, W.J.; MALAISSE-LAGAE, F.; PICARD, C.; FLAMENT-DURAND, J.  
Effects of pregnancy and chorionic growth hormone upon insulin secretion. **Endocrinology**, 84: 41-4, 1969.

81. MALAISSE, W.J.; MALAISSE-LAGAE, F.; KING, S.; WRIGHT, P.H.  
Effect of growth hormone on insulin secretion. *Am. J. Physiol.*, 215: 423, 1968 ,1968. apud NIELSEN, J.H., 1982.
82. MARKOFF, E.; BEATTIE, G.M.; HAYEK, A.; LEWIS, U.J.  
Effects of prolactin and glycosylated prolactin on (pro) insulin synthesis and insulin release from culture rat pancreatic islets. *Pancreas*, 5: 99-103, 1990.
83. MARTIN, J.M. Islet regeneration following partial pancreatectomy (ppx) in hypersomatotropic rats. *Diabetes*, 19: 395, 1970 apud NIELSEN, J.H., 1982.
84. MARTIN, J.M. & FRIESEN, H. Effect of human placental lactogen on the isolated islets of Langerhans in vitro. *Endocrinology*, 84: 619-21, 1969.
85. MARTIN, J.M. & GAGLIARDINO, J.J. Effects of growth hormone on the isolated pancreatic islets of rat "in vitro". *Nature*, 213: 630, 1967 apud NIELSEN, J.H., 1982.
86. MEDA, P.; AMHERDT, M.; PERRELET, A.; ORCI, L. Metabolic coupling between cultured pancreatic B-cells. *Exp. Cell Res.*, 133: 421-30, 1981.

- 87 MEDA, P.; ATWATER, I.; GONÇALVES, A.; BANGHAM, A.; ORCI, L.; ROJAS, E. The topography of electrical synchrony among B-cells in the mouse islets of Langerhans. *Q. J. Exp. Physiol.*, **69**: 719-35, 1984.
88. MEDA, P.; DENEFF, J.F.; PERRELET, A.; ORCI, L. Nonrandom distribution of gap junctions between pancreatic B-cells. *Am. J. Physiol.*, **238**: 114C-9, 1980a.
89. MEDA, P.; HALBAN, P.; PERRELET, A.; RENOLD, A.C.; ORCI, L. Gap junction development is correlated with insulin content in the pancreatic B-cell. *Science*, **209**: 1026-8, 1980b.
90. MEDA, P.; KOHEN, E.; KOHEN, C.; RABINOVITCH, A.; ORCI, L. Direct communication of homologous and heterologous endocrine islet cells in culture. *J. Cell. Biol.*, **92**: 221-6, 1982.
91. MEDA, P.; MICHAELS, R.L.; HALBAN, P.A.; ORCI, L.; SHERIDAN, J.D. In vivo modulation of gap junctions and dye coupling between B-cells in the intact pancreatic islets. *Diabetes*, **32**: 859-68, 1983.

92. MEDA, P.; PERRELET, A.; ORCI, L. Increase of gap junctions between pancreatic B-cells during stimulation of insulin secretion. *J. Cell. Biol.*, 82: 441-8, 1979.
93. MEISSNER, P. Electrophysiological evidence for coupling between B-cells of pancreatic islets. *Nature*, 262: 502-4, 1976.
94. MICHAELS, R.L. Immunocytochemical identification of dye-injected cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 30: 189-91, 1982a.
95. MICHAELS, R.L. Increased dye coupling among cells in prolactin stimulated pancreatic islets. *J. Cell. Biol.*, 95: 94a, 1982b.
96. MICHAELS, R.L. & SHERIDAN, J.D. Islets of Langerhans: dye coupling among immunocytochemically distinct cell types. *Science*, 214: 801-3, 1981.
97. MICHAELS, R.L.; SORENSON, R.L.; PARSONS, J.A.; SHERIDAN, J.D. Prolactin enhances cell-to-cell communication among B-cells in pancreatic islets. *Diabetes*, 36: 1098-103, 1987.

98. MILNER, R.D.G.      The secretion of insulin from fetal and post-natal rabbit pancreas in response to various substances. *J. Endocrinol.*, 44: 267-2, 1969.
99. MOSKALEWSKI, S.      Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen. Comp. Endocr.*, 5: 342-53, 1965. apud NIELSEN, J.H., 1985.
100. MOURMEAUX, J.C.; REMACLE, C.; HENQUIN, J.C.      Morphological and functional characteristics of islets neoformed during tissue culture of fetal rat pancreas. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 39: 237-46, 1985.
101. MOURMEAUX, J.C.; REMACLE, C.; HENQUIN, J.C.      Effects of stimulation of adelinato cyclase and protein kinase C on cultured fetal B-cells. *Endocrinology*, 125: 2636-44, 1989.
102. NIELSEN, J..H.      Growth and function of the pancreatic B cell in vitro: effects of glucose, hormones and serum factors on mouse, rat and human pancreatic islets in organ culture. *Acta Endocrinol*, 108: 1-40, 1985.

103. NIELSEN, J.H.      Effects of growth hormone, prolactin, and placental lactogen on insulin content and release, and deoxyribonucleic acid synthesis in cultured pancreatic islets. *Endocrinology*, 110: 600-06, 1982.
104. NIELSEN, J.H.      Growth and function of the pancreatic B cell in vitro: effects of glucose, hormones and serum factors on mouse, rat and human pancreatic islets in organ culture. *Acta Endocrinol.*, 108:1-40, 1985.
105. NIELSEN, J.H.; NIELSEN, V.; PEDERSEN, L.M.; DECKERT, T.      Effects of pregnancy hormones on pancreatic islets in organ culture. *Acta Endocrinol.*, 111: 336-41, 1986.
106. ORCI, L.; UNGER, R.; RENOLD, A.      Structural coupling between pancreatic islet cells. *Experientia*, 29: 1015-8, 1973.
107. ORCI, L.; MALAISSE-LAGAE, F.; RAVAZOLLA, M.; ROULLIER, D.; RENOLD, A.; PERRELET, A.; UNGLER, R.      A morphological basis for intercellular communication between A and B-cells in the endocrine pancreas. *J. Clin. Invest.*, 56: 1066-70, 1975.

108. OSTENSON, C.-G. & GRILL, V. Differences in long-term effects of L-glutamine and D-glucose on insulin release from rat pancreatic islets. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 45: 215-21, 1986.
109. OTONKOSKI, T.; ANDERSSON, S.; KNIP, M.; SIMELL, O. Maturation of insulin response to glucose during human fetal and neonatal development. Studies with perifusion of pancreatic isletlike cell clusters. *Diabetes*, 37: 286-91, 1988.
110. PARSONS, J.; HARTFEL, M.; HEGRE, O.; Mc EVOY, R. Effect of MtTW15 mammosomatotropic tumors on pancreatic islets hormones. *Diabetes*, 32: 67-74, 1983.
111. PETERSEN, O.H. & FINDLAY, I. Electrophysiology of the pancreas. *Physiol. Rev.*, 67: 1054-116, 1987.
112. PETERSON, C.M.; MILLER, N.; WALKER, L.; FORMBY, B. Effect of glipizide on insulin secretion from cultured human fetal pancreatic islets. *Diabetes Care*, 9: 556-7, 1986.



113. PHELPS, R.L.; FREINKEL, N.; RUBINSTEIN, A.H.; KUZUNGA, H.; METZGER, B.; BOEHM, J.J.; MOLSTED-PEDERSEN, L. Carbohydrate metabolism in pregnancy. XV. Plasma C-peptide during intravenous glucose tolerance in neonates from normal and insulin treated diabetic mothers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 46: 61-8, 1978.
114. PLASMAN, P.O.; HERMANN, M.; HERCHUELZ, A.; LEBRUN, P. Sensitivity to  $\text{Cd}^{2+}$  but resistance to  $\text{Ni}^{2+}$  of  $\text{Ca}^{2+}$  inflow into rat pancreatic islets. *Endocrinol. Metab.*, 21: 529E-33, 1990.
115. RANDON, J. & KERVRAN, A. Cinetique du la secretion d'insuline en réponse au glucose par les ilots de Langerhans isolés de foetus de rat. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 288: 1567-70, 1979.
116. REAVEN, E.P.; CURRY, D.L.; REAVEN, G.M. Effect of age and sex on rat endocrine pancreas. *Diabetes*, 36: 1397-400, 1987.
117. RHOTEN, W.B. Insulin secretory dynamics during development of rat pancreas. *Am. J. Physiol.*, 239: 57E-63, 1980.

118. RORSMAN, P.A., ARKHAMMAR, P.; BOKVIST, K.; HELLERSTROM, C.; NILSSON, T.; WELSH, M.; WELSH, N.; BERGGREN, P.-O. Failure of glucose to elicit a normal secretory response in fetal pancreatic beta cells results from glucose insensitivity of the ATP-regulated  $K^+$  channels. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86: 4505-9, 1989.
119. SEHLIN, J. & TALJEDAL, I.B. Transport of rubidium and sodium in pancreatic islets. *J. Physiol.*, 242: 509-15, 1974.
120. SINKOFF, M.W. & BODO, R.C. Prolactin as an insulin antagonist. *Arch. Exper. Path. Pharmacol.*, 219: 110, 1953 apud KATZ, E.J. et alii, 1981.
121. SODOYEZ-GOFFAUX, F.; SODOYEZ, J.C.; DE VOS, C.J. Insulin secretion and metabolism during the perinatal period in the rat. *J. Clin. Invest.*, 63: 1095-102, 1972.
122. SODOYEZ-GOFFAUX, F.; SODOYEZ, J.C.; DE VOS, C.J.; FOA, P.P. Insulin and glucagon secretion by islets isolated from fetal and neonatal rats. *Diabetologia*, 16: 121-3, 1979.

123. SODOYEZ-GOFFAUX, F.; SODOYEZ, J.C.; FOA, P.P. Effects of gestational age, birth and feeding on the insulinogenic response to glucose and tolbutamide by fetal and newborn rat pancreas. *Diabetes*, 20: 589-91, 1971.
124. SORENSON, R.L.; BRELJE, T.C.; HEGRE, O.D.; MARSHALL, S.; ANAYA, P.; SHERIDAN, J.D. Prolactin (in vitro) decreases the glucose stimulation threshold, enhances insulin secretion, and decreases dye coupling among islets B cells. *Endocrinology*, 121: 1447-53, 1987a.
125. SORENSON, R.L.; JOHNSON, M.G.; PARSONS, J.A.; SHERIDAN, J.D. Decreased glucose stimulation threshold, enhanced insulin secretion, and increased beta cell coupling in islets of prolactin-treated rats. *Pancreas*, 3: 283-8, 1987b.
126. SORENSON, R.L.; MICHAELS, R.L.; PARSONS, J.A.; SHERIDAN, J.D. Association of the glucose threshold of insulin release with gap junctional coupling of B-cells. *Diabetes*, 32: 9A, 1983.
127. SORENSON, R.L. & PARSONS, J.A. Insulin secretion in mammosomatotropic tumor-bearing and pregnant rats. A role for lactogens. *Diabetes*, 34: 337-41, 1985.

128. SPELLACY, W.N. & GOETZ, F. Plasma insulin in normal late pregnancy. *New Engl. J. Med.*, 268: 988, 1963 apud SORENSON, R.L. & PARSONS, J.A., 1985.
129. TOURNIAIRE, J.; PALLO, D.; POUSSET, G.; BIZOLLON, C.; BACHELOT, I. Diminution de la tolerance glucidique et hyperinsulinisme dans l'adenoma a prolactine. *Nouv. Presse. Med.*, 3: 1705-7, 1974 apud KATZ, E.J. et alii, 1981.
130. TRUBE, G.; RORSMAN, P.; OHNO-SHOSAKU, T. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent  $K^+$  channel in mouse pancreatic B-cells. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, 407: 493-9, 1986.
131. TUCH, B.E.; OSGERBY, K.J.; TURTLE, J.R. The role of calcium in insulin release from the human fetal pancreas. *Cell Calcium*, 11: 1-9, 1990.
132. VERSPOHL, E.J.; KAISER, P.; WAHL, M.; AMMON, P.T. Decreased insulin secretory response of pancreatic islets during culture in the presence of low glucose is associated with diminished  $^{45}Ca^{2+}$  net uptake, NADPH/NADP<sup>+</sup> and GSH/GSSG ratios. *Life Sci.*, 43: 209-19, 1988.

133. WARD, W.K.; BOLGIANO, D.C.; MCKNIGHT, B.; HALTER, J.B.; PORT, D.Jr. Diminished B cell secretory capacity in patients with noninsulin dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, 74: 1310-28, 1984.
134. WILLES, R.F.; BODA, J.M.; MANNS, J.G. Insulin secretion by ovine fetus in utero. *Endocrinology*, 84: 520-7, 1969.
135. WOLLHEIM, C.D. & SHARP, G.W.G. Regulation of insulin release by calcium. *Physiol. Rev.*, 61: 914-73, 1981.

## APÊNDICE

Tabela I - Efeito da retirada de glicose (min 42 a 60) e da reintrodução de 2,8 mM (min 62 a 80) sobre o efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$  de ilhotas controle.

| n = 3 | MIN | VALOR ESPERADO | VALOR OBSERVADO | T      | P     |
|-------|-----|----------------|-----------------|--------|-------|
|       | 42  | 3,81           | 3,92            | NS     |       |
|       | 44  | 3,78           | 4,10            | 1,745  | NS    |
|       | 46  | 3,76           | 4,20            | 5,842  | <0,05 |
|       | 48  | 3,73           | 4,15            | 2,658  | NS    |
|       | 50  | 3,70           | 4,14            | 8,278  | <0,05 |
|       | 52  | 3,68           | 4,16            | 10,299 | <0,05 |
|       | 54  | 3,65           | 4,09            | 3,246  | NS    |
|       | 56  | 3,63           | 4,15            | 3,726  | NS    |
|       | 58  | 3,60           | 4,13            | 3,762  | NS    |
|       | 60  | 3,58           | 4,14            | 4,013  | NS    |
| <hr/> |     |                |                 |        |       |
|       | 62  | 4,11           | 4,14            | 0,171  | NS    |
|       | 64  | 4,11           | 3,97            | 1,770  | NS    |
|       | 66  | 4,10           | 3,54            | 9,872  | <0,05 |
|       | 68  | 4,10           | 3,52            | 6,352  | <0,05 |
|       | 70  | 4,10           | 3,60            | 14,541 | <0,05 |
|       | 72  | 4,10           | 3,43            | 4,148  | NS    |
|       | 74  | 4,09           | 3,41            | 8,505  | <0,05 |
|       | 76  | 4,09           | 3,48            | 5,320  | <0,05 |
|       | 78  | 4,09           | 3,43            | 3,817  | NS    |
|       | 80  | 4,08           | 3,60            | 2,642  | NS    |

NS = Não significativo

Tabela II - Efeito da retirada da glicose e da reintrodução de 2,8 mM sobre o efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$  de ilhotas tratadas com PRL.

| n = 3 | MIN | VALOR ESPERADO | VALOR OBSERVADO | T      | P     |
|-------|-----|----------------|-----------------|--------|-------|
|       | 42  | 3,98           | 4,38            | 2,631  | NS    |
|       | 44  | 3,91           | 4,52            | 3,901  | NS    |
|       | 46  | 3,84           | 4,88            | 5,297  | <0,05 |
|       | 48  | 3,77           | 5,17            | 6,737  | <0,05 |
|       | 50  | 3,70           | 5,05            | 8,990  | <0,05 |
|       | 52  | 3,63           | 4,92            | 22,299 | <0,05 |
|       | 54  | 3,56           | 4,93            | 11,813 | <0,05 |
|       | 56  | 3,50           | 4,83            | 25,588 | <0,05 |
|       | 58  | 3,44           | 4,81            | 47,591 | <0,05 |
|       | 60  | 3,37           | 4,76            | 8,579  | <0,05 |
| <hr/> |     |                |                 |        |       |
|       | 62  | 4,70           | 4,63            | 0,391  | NS    |
|       | 64  | 4,66           | 4,43            | 0,767  | NS    |
|       | 66  | 4,62           | 4,12            | 1,808  | NS    |
|       | 68  | 4,58           | 4,14            | 1,805  | NS    |
|       | 70  | 4,53           | 4,03            | 2,300  | NS    |
|       | 72  | 4,49           | 3,98            | 3,411  | NS    |
|       | 74  | 4,45           | 4,00            | 4,329  | <0,05 |
|       | 76  | 4,41           | 3,98            | 2,851  | NS    |
|       | 78  | 4,37           | 3,97            | 2,453  | NS    |
|       | 80  | 4,32           | 3,93            | 4,283  | NS    |

NS = Não significativo



**Tabela III** - Efeito do aumento da concentração de glicose de 2,8 para 8,3 mM (min 42 a 60) e da reintrodução de 2,8 mM (min 62 a 80) sobre o efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$  de ilhotas controle.

| n = 4 | MIN | VALOR ESPERADO | VALOR OBSERVADO | T     | P     |
|-------|-----|----------------|-----------------|-------|-------|
|       | 42  | 3,60           | 3,47            | 0,837 | NS    |
|       | 44  | 3,57           | 3,31            | 0,965 | NS    |
|       | 46  | 3,54           | 3,45            | 0,311 | NS    |
|       | 48  | 3,51           | 3,43            | 0,282 | NS    |
|       | 50  | 3,48           | 3,31            | 0,714 | NS    |
|       | 52  | 3,46           | 3,33            | 0,497 | NS    |
|       | 54  | 3,43           | 3,25            | 0,778 | NS    |
|       | 56  | 3,40           | 3,24            | 0,750 | NS    |
|       | 58  | 3,37           | 3,17            | 0,948 | NS    |
|       | 60  | 3,35           | 3,11            | 1,127 | NS    |
| <hr/> |     |                |                 |       |       |
|       | 62  | 3,01           | 3,04            | 0,136 | NS    |
|       | 64  | 2,97           | 3,00            | 0,173 | NS    |
|       | 66  | 2,93           | 3,10            | 1,722 | NS    |
|       | 68  | 2,88           | 3,33            | 2,867 | NS    |
|       | 70  | 2,84           | 3,31            | 3,006 | NS    |
|       | 72  | 2,80           | 3,40            | 3,227 | <0,05 |
|       | 74  | 2,76           | 3,36            | 3,144 | <0,05 |
|       | 76  | 2,72           | 3,34            | 2,871 | NS    |
|       | 78  | 2,68           | 3,40            | 3,674 | <0,05 |
|       | 80  | 2,64           | 3,40            | 3,512 | <0,05 |

NS = Não significativo

**Tabela IV** - Efeito do aumento da concentração de glicose de 2,8 para 8,3 mM e da reintrodução de 2,8 mM sobre o efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$  de ilhotas tratadas cronicamente com PRL.

| n = 4 | MIN | VALOR<br>ESPERADO | VALOR<br>OBSERVADO | T     | P     |
|-------|-----|-------------------|--------------------|-------|-------|
|       | 42  | 4,97              | 4,93               | 0,133 | NS    |
|       | 44  | 4,96              | 4,68               | 0,850 | NS    |
|       | 46  | 4,95              | 4,12               | 4,271 | <0,05 |
|       | 48  | 4,94              | 4,04               | 8,623 | <0,05 |
|       | 50  | 4,94              | 4,11               | 4,731 | <0,05 |
|       | 52  | 4,93              | 3,93               | 5,408 | <0,05 |
|       | 54  | 4,92              | 4,02               | 3,283 | <0,05 |
|       | 56  | 4,91              | 4,11               | 2,237 | NS    |
|       | 58  | 4,91              | 4,06               | 3,609 | <0,05 |
|       | 60  | 4,90              | 4,16               | 3,086 | NS    |
| <hr/> |     |                   |                    |       |       |
|       | 62  | 4,07              | 4,28               | 1,360 | NS    |
|       | 64  | 4,11              | 4,41               | 0,907 | NS    |
|       | 66  | 4,15              | 4,71               | 1,262 | NS    |
|       | 68  | 4,19              | 4,72               | 1,314 | NS    |
|       | 70  | 4,23              | 4,79               | 1,371 | NS    |
|       | 72  | 4,27              | 4,89               | 1,518 | NS    |
|       | 74  | 4,31              | 4,77               | 1,375 | NS    |
|       | 76  | 4,36              | 4,82               | 1,380 | NS    |
|       | 78  | 4,40              | 4,82               | 1,025 | NS    |
|       | 80  | 4,44              | 4,84               | 1,138 | NS    |

NS = Não significativo

**Tabela V** - Efeito da Tolbutamida (min 42 a 60) e efeito de sua remoção do meio perfusor (min 62 a 80) sobre o efluxo de  $^{86}\text{Rb}^+$  de ilhotas controle.

| n = 7 | MIN | VALOR<br>ESPERADO | VALOR<br>OBSERVADO | T     | p     |
|-------|-----|-------------------|--------------------|-------|-------|
|       | 42  | 3,81              | 3,63               | 3,977 | <0,05 |
|       | 44  | 3,72              | 3,68               | 0,412 | NS    |
|       | 46  | 3,63              | 3,61               | 0,237 | NS    |
|       | 48  | 3,54              | 3,45               | 0,943 | NS    |
|       | 50  | 3,46              | 3,41               | 0,526 | NS    |
|       | 52  | 3,37              | 3,51               | 1,277 | NS    |
|       | 54  | 3,29              | 3,28               | 0,135 | NS    |
|       | 56  | 3,21              | 3,46               | 4,054 | <0,05 |
|       | 58  | 3,14              | 3,44               | 3,199 | <0,05 |
|       | 60  | 3,06              | 3,39               | 4,814 | <0,05 |
| <hr/> |     |                   |                    |       |       |
|       | 62  | 3,37              | 3,45               | 0,872 | NS    |
|       | 64  | 3,37              | 3,56               | 2,408 | NS    |
|       | 66  | 3,37              | 3,66               | 2,770 | <0,05 |
|       | 68  | 3,36              | 3,93               | 6,796 | <0,05 |
|       | 70  | 3,36              | 3,85               | 8,592 | <0,05 |
|       | 72  | 3,36              | 4,01               | 8,587 | <0,05 |
|       | 74  | 3,36              | 4,19               | 9,995 | <0,05 |
|       | 76  | 3,36              | 4,00               | 6,076 | <0,05 |
|       | 78  | 3,35              | 3,95               | 7,156 | <0,05 |
|       | 80  | 3,35              | 3,88               | 6,063 | <0,05 |

NS = Não significativo

Tabela VI - Efeito da Tolbutamida e da sua remoção da solução perfusora sobre o efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$  de ilhotas cultivadas na presença de PRL.

| n = 8 | MIN | VALOR<br>ESPERADO | VALOR<br>OBSERVADO | T      | P     |
|-------|-----|-------------------|--------------------|--------|-------|
|       | 42  | 4,26              | 3,96               | 4,249  | <0,05 |
|       | 44  | 4,15              | 3,83               | 7,635  | <0,05 |
|       | 46  | 4,05              | 3,64               | 6,104  | <0,05 |
|       | 48  | 3,95              | 3,71               | 2,701  | <0,05 |
|       | 50  | 3,85              | 3,65               | 3,328  | <0,05 |
|       | 52  | 3,75              | 3,65               | 1,834  | NS    |
|       | 54  | 3,66              | 3,45               | 2,698  | <0,05 |
|       | 56  | 3,57              | 3,63               | 0,968  | NS    |
|       | 58  | 3,48              | 3,43               | 0,731  | NS    |
|       | 60  | 3,39              | 3,48               | 2,070  | NS    |
| <hr/> |     |                   |                    |        |       |
|       | 62  | 3,40              | 3,79               | 7,377  | <0,05 |
|       | 64  | 3,37              | 3,84               | 9,570  | <0,05 |
|       | 66  | 3,33              | 4,05               | 20,247 | <0,05 |
|       | 68  | 3,30              | 4,00               | 14,095 | <0,05 |
|       | 70  | 3,27              | 4,06               | 15,945 | <0,05 |
|       | 72  | 3,24              | 4,08               | 14,857 | <0,05 |
|       | 74  | 3,21              | 4,27               | 12,008 | <0,05 |
|       | 76  | 3,18              | 4,11               | 13,875 | <0,05 |
|       | 78  | 3,15              | 4,27               | 15,873 | <0,05 |
|       | 80  | 3,12              | 4,12               | 17,721 | <0,05 |

NS = Não significativo

**Tabela VII** - Efeito da Diazoxida (min 42 a 60) e efeito da sua remoção do meio perfusor (min 62 a 80) sobre o efluxo de  $^{86}\text{Rb}^+$  de ilhotas controle.

| n = 4 | MIN | VALOR<br>ESPERADO | VALOR<br>OBSERVADO | T      | P     |
|-------|-----|-------------------|--------------------|--------|-------|
|       | 42  | 3,57              | 3,47               | 1,446  | NS    |
|       | 44  | 3,55              | 3,66               | 1,736  | NS    |
|       | 46  | 3,52              | 3,62               | 0,569  | NS    |
|       | 48  | 3,50              | 4,10               | 10,921 | <0,05 |
|       | 50  | 3,47              | 3,93               | 5,678  | <0,05 |
|       | 52  | 3,45              | 3,70               | 4,130  | <0,05 |
|       | 54  | 3,43              | 3,39               | 0,259  | NS    |
|       | 56  | 3,40              | 3,39               | 0,746  | NS    |
|       | 58  | 3,38              | 3,29               | 0,977  | NS    |
|       | 60  | 3,36              | 3,37               | 0,113  | NS    |
| <hr/> |     |                   |                    |        |       |
|       | 62  | 3,17              | 3,49               | 2,481  | NS    |
|       | 64  | 3,10              | 3,04               | 0,256  | NS    |
|       | 66  | 3,03              | 3,33               | 2,838  | NS    |
|       | 68  | 2,97              | 3,18               | 1,334  | NS    |
|       | 70  | 2,90              | 3,11               | 3,776  | <0,05 |
|       | 72  | 2,84              | 2,97               | 2,006  | NS    |
|       | 74  | 2,78              | 3,03               | 2,014  | NS    |
|       | 76  | 2,72              | 3,19               | 1,925  | NS    |
|       | 78  | 2,66              | 3,14               | 3,696  | <0,05 |
|       | 80  | 2,60              | 2,98               | 1,938  | NS    |

NS = Não significativo

**Tabela VIII** - Efeito da Diazoxida e da sua remoção da solução perfusora sobre o efluxo do  $^{86}\text{Rb}^+$  de ilhotas cultivadas na presença de PRL.

| n = 6 | MIN | VALOR<br>ESPERADO | VALOR<br>OBSERVADO | T      | p     |
|-------|-----|-------------------|--------------------|--------|-------|
|       | 42  | 4,02              | 4,05               | 0,283  | NS    |
|       | 44  | 3,88              | 4,15               | 2,657  | <0,05 |
|       | 46  | 3,74              | 4,38               | 13,009 | <0,05 |
|       | 48  | 3,61              | 4,47               | 17,527 | <0,05 |
|       | 50  | 3,48              | 4,20               | 5,840  | <0,05 |
|       | 52  | 3,36              | 4,34               | 10,885 | <0,05 |
|       | 54  | 3,24              | 4,05               | 17,940 | <0,05 |
|       | 56  | 3,13              | 3,93               | 13,988 | <0,05 |
|       | 58  | 3,02              | 3,79               | 18,844 | <0,05 |
|       | 60  | 2,91              | 3,50               | 6,517  | <0,05 |
| <hr/> |     |                   |                    |        |       |
|       | 62  | 3,35              | 3,66               | 3,271  | <0,05 |
|       | 64  | 3,19              | 3,34               | 1,368  | NS    |
|       | 66  | 3,03              | 3,55               | 4,686  | <0,05 |
|       | 68  | 2,89              | 3,65               | 6,936  | <0,05 |
|       | 70  | 2,74              | 3,46               | 7,302  | <0,05 |
|       | 72  | 2,61              | 3,51               | 7,597  | <0,05 |
|       | 74  | 2,48              | 3,50               | 11,861 | <0,05 |
|       | 76  | 2,36              | 3,50               | 8,992  | <0,05 |
|       | 78  | 2,25              | 3,47               | 9,666  | <0,05 |
|       | 80  | 2,14              | 3,62               | 12,109 | <0,05 |

NS = Não significativo

Tabela IX - Efeito de 16,7 mM de glicose sobre o efluxo do  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em ilhotas controle perfundidas na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  e presença de 0,5 mM de EGTA.

| n = 4 | MIN | VALOR<br>ESPERADO | VALOR<br>OBSERVADO | T     | P     |
|-------|-----|-------------------|--------------------|-------|-------|
|       | 46  | 0,91              | 0,94               | 0,604 | NS    |
|       | 48  | 0,87              | 0,90               | 0,579 | NS    |
|       | 50  | 0,83              | 0,84               | 0,202 | NS    |
|       | 52  | 0,79              | 0,74               | 1,239 | NS    |
|       | 54  | 0,76              | 0,74               | 0,430 | NS    |
|       | 56  | 0,72              | 0,72               | 0,115 | NS    |
|       | 58  | 0,69              | 0,71               | 0,529 | NS    |
|       | 60  | 0,66              | 0,72               | 1,336 | NS    |
|       | 62  | 0,63              | 0,69               | 1,508 | NS    |
|       | 64  | 0,60              | 0,72               | 2,979 | NS    |
|       | 66  | 0,57              | 0,64               | 1,211 | NS    |
|       | 68  | 0,55              | 0,73               | 5,225 | <0,05 |
|       | 70  | 0,52              | 0,68               | 3,947 | <0,05 |
|       | 72  | 0,50              | 0,62               | 2,214 | NS    |
|       | 74  | 0,47              | 0,68               | 4,091 | <0,05 |
|       | 76  | 0,45              | 0,67               | 3,605 | <0,05 |
|       | 78  | 0,43              | 0,67               | 4,742 | <0,05 |
|       | 80  | 0,41              | 0,66               | 3,798 | <0,05 |

NS = Não significativo

**Tabela X** - Efeito de 16,7 mM de glicose sobre o efluxo do  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em ilhotas tratadas com PRL perfundidas na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  e presença de 0,5 mM de EGTA.

| n = 4 | MIN | VALOR<br>ESPERADO | VALOR<br>OBSERVADO | T     | P  |
|-------|-----|-------------------|--------------------|-------|----|
|       | 46  | 1,33              | 1,40               | 1,136 | NS |
|       | 48  | 1,27              | 1,33               | 0,769 | NS |
|       | 50  | 1,22              | 1,15               | 1,176 | NS |
|       | 52  | 1,17              | 1,07               | 1,442 | NS |
|       | 54  | 1,12              | 1,05               | 0,863 | NS |
|       | 56  | 1,08              | 1,04               | 0,444 | NS |
|       | 58  | 1,03              | 1,00               | 0,399 | NS |
|       | 60  | 0,99              | 0,99               | 0,020 | NS |
|       | 62  | 0,95              | 0,92               | 0,421 | NS |
|       | 64  | 0,91              | 0,92               | 0,087 | NS |
|       | 66  | 0,87              | 0,90               | 0,192 | NS |
|       | 68  | 0,84              | 0,94               | 1,049 | NS |
|       | 70  | 0,81              | 0,91               | 1,038 | NS |
|       | 72  | 0,77              | 0,89               | 1,554 | NS |
|       | 74  | 0,74              | 0,90               | 1,722 | NS |
|       | 76  | 0,71              | 0,90               | 1,980 | NS |
|       | 78  | 0,68              | 0,88               | 2,074 | NS |
|       | 80  | 0,65              | 0,89               | 2,236 | NS |

NS = Não significativo