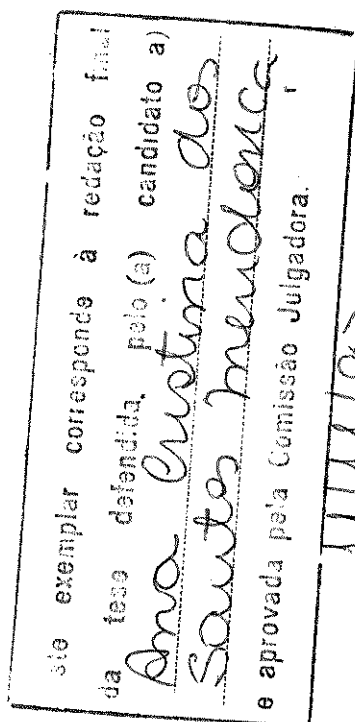




ANA CRISTINA DOS SANTOS MENDONÇA

MATURAÇÃO DA RESPOSTA SECRETÓRIA
DE INSULINA EM ILHOTAS DE RATOS:
DIFERENÇAS ENTRE OS ESTÍMULOS COM
GLICOSE, TEOFILINA, CARBAMILCOLINA E
POTÁSSIO



Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do grau
de Mestre em Ciências Biológicas,
na área de Fisiologia ~~celular~~.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero

Campinas

1997

53107
M523m

33707/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
T/Unicamp	
M.523m	
V.	
TOMBO BC/	33107
PROC.	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	07/05/98
N.º CPD	

CM-00110090-2

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA-UNICAMP**

Mendonça, Ana Cristina dos Santos

M523_m

Maturação da resposta secretória de insulina em ilhotas de ratos: diferenças entre os estímulos com glicose, teofilina, carbamilcolina e potássio/ Ana Cristina dos Santos Mendonça. - - Campinas, SP: [s. n.], 1997.

57f: illus.

Orientador: Antonio Carlos Boschero.

Dissertação (mestrado) -Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1- Maturação. 2-Pâncreas. 3-Secreção de insulina. 4- Células B. I-Boschero, Antonio Carlos. II-Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III-Título.

Campinas, 11 de novembro de 1997

BANCA EXAMINADORA

Professores Titulares



Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero (orientador)
Depto de Fisiologia e Biofísica/IB-UNICAMP



Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira
Depto de Fisiologia e Biofísica/IB-UNICAMP



Profa. Dra. Maria Alice Rostom de Mello
Depto de Educação Física/IB-UNESP- Rio Claro

Professor Suplente

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro
Depto de Educação Física/IB-UNESP- Rio Claro

UNICAMP

DEDICO

À minha mãe, meu pai (*in memoriam*) e meus irmãos, por tudo o que representam e cujo significado, simples palavras não conseguiriam alcançar...

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero, pela oportunidade, orientação, paciência, dedicação, presença amiga e participação ativa na realização deste trabalho.

Às docentes Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira, Profa. Dra. Maria Alice Rostom de Mello e Profa. Dra. Silvia Cristina Crepaldi, pela análise criteriosa da dissertação e sugestões consistentes na fase de pré-banca.

Ao Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro, pelo valioso auxílio no aprendizado da técnica de radioimunoensaio.

À Profa. Dra. Silvia Cristina Crepaldi, pela importante contribuição no ensino da técnica de secreção estática de insulina.

Ao Léscio Domingues Teixeira, pelo auxílio técnico eficiente e imprescindível e pela amizade.

Aos docentes da Universidade Federal de São Carlos 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.

Aos novos amigos da Pós-Graduação, em especial à Márcia Queiroz Latorraca, Silvana Maria Guida Cardoso e Cintia de Lima Rossi, pelo companheirismo e incentivos constantes.

Aos colegas do laboratório, pelo estímulo e bom humor.

Aos familiares e amigos pela compreensão e apoio indireto.

Às agências financiadoras CNPq, FAPESP, CAPES e FAEP, pelo auxílio financeiro.

OBRIGADA.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
ADP	Adenosina difosfato
AMPC.....	Adenosina monofosfato cíclico
ATP.....	Adenosina trifosfato
Canal L.....	Canal de Ca^{2+} sensível à voltagem
Cch.....	Carbamilcolina
CCK.....	Colecistoquinina
DAG	Diacilglicerol
G	Glicose
GIP.....	Polipeptídeo inibidor gástrico
GLP	Polipeptídeo semelhante ao glucagon
GRP.....	Polipeptídeo inibidor de gastrina
IP_3	Inositol 1,4,5 trifosfato
Canal K^+/ATP	Canal de potássio modulado pelo ATP
$\text{PK}_{\text{Ca}^{2+}\text{-Cal}}$	Proteína quinase dependente de cálcio- calmodulina
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
Teo.....	Teofilina

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig 1. Esquema simplificado dos mecanismos envolvidos na secreção de insulina.....	03
Fig 2. Secreção de insulina frente a diferentes concentrações de glicose.....	18
Fig 3. Incremento na secreção de insulina induzido por diferentes concentrações de glicose	19
Fig 4. Efeito do K^+ (30 mM) sobre a secreção de insulina.....	20
Fig 5. Incremento na secreção de insulina induzido por K^+ (30 mM)	21
Fig 6. Efeito da teofilina (5mM) e da carbamilcolina (200 μ M) sobre a secreção de insulina	22
Fig 7. Incremento na secreção de insulina induzido por carbamilcolina (200 μ M).....	23
Fig 8. Incremento na secreção de insulina induzido por teofilina (5mM).....	24

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1- INTRODUÇÃO.....	1
2- OBJETIVOS	8
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1- ANIMAIS.....	9
3.2- REAGENTES E RADIOISÓTOPO.....	9
3.3- SOLUÇÕES.....	10
3.3.1- SOLUÇÃO DE HANKS PARA ISOLAMENTO DE PÂNCREAS E ILHOTAS.....	10
3.3.2- SOLUÇÃO DE KREBS-RINGER PARA INCUBAÇÃO	10
3.3.3- MISTURA ÁCIDO-ÁLCOOL.....	11
3.4- PROTOCOLO EXPERIMENTAL	11
3.4.1- ISOLAMENTO DE PÂNCREAS DE RATOS FETAIS E NEONATAIS.....	11
3.4.2- ISOLAMENTO DAS ILHOTAS DE LANGERHANS DE RATOS ADULTOS	11
3.4.3- SECREÇÃO ESTÁTICA DE INSULINA	12
3.4.4- EXTRAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE INSULINA.....	13
3.4.5- DOSAGEM DE INSULINA	13
3.5- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	14
4- RESULTADOS	14
5- DISCUSSÃO.....	25
6- CONCLUSÃO	31
7- RESUMO	32
8- ABSTRACT.....	34
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
APÊNDICE	

1- INTRODUÇÃO

A secreção de insulina pelas células B pancreáticas é regulada por uma interação complexa de eventos metabólicos, hormonais e neurais, que possibilita o controle glicêmico frente a diferentes situações fisiológicas.

Em mamíferos, o aumento da relação adenosina trifosfato (ATP)/ adenosina difosfato (ADP) no citoplasma, proveniente do metabolismo da glicose ou de outros nutrientes, é o fator responsável pela sinalização do acoplamento estímulo/secreção (BOSCHERO *et al.*, 1977; HENQUIN, 1978; BLACK *et al.*, 1994). Esse evento, que favorece o fechamento dos canais de K^+ sensíveis a ATP, ou seja K^+ /ATP (COOK & HALES, 1984; ASHCROFT *et al.*, 1984; DUNNE & PETERSEN, 1986), promove a despolarização da membrana (MISLER *et al.*, 1992) e a abertura dos canais de Ca^{2+} (canais L) dependentes de voltagem (RORSMAN *et al.*, 1989; GILON & HENQUIN, 1992). Como consequência, o aumento do influxo de Ca^{2+} ativa os microtúbulos e microfilamentos que compõem o sistema secretor (ARKHAMMAR *et al.*, 1987; ASHCROFT & ASHCROFT, 1990) determinando a extrusão dos grânulos de insulina (WOLLHEIN & SHARP, 1981). A resposta secretória é ainda modulada por dois importantes componentes enzimáticos de membrana: adenilciclase (MILNER *et al.*, 1971; GRILL & CERASI, 1974; MALAISSE *et al.*, 1984) e fosfolipase C (TUCH *et al.*, 1988; KELLEY *et al.*, 1994),

que mediante atuação de seus segundos mensageiros: adenosina monofosfato cíclico (AMPc), inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) (MATSCHINSKY *et al.*, 1986 apud LAYCHOCK, 1990) e diacilglicerol (DAG) (PRENTKI & MATSCHINSKY, 1987), respectivamente, permitem o ajuste da secreção por substâncias não metabolizáveis pelas células B, ou seja, hormônios, neurotransmissores e agentes farmacológicos (Fig 1).

É fato notório que, em humanos ou animais experimentais normais, a resposta insulínica do adulto apresenta uma curva bifásica de secreção (CERASI & LUFT, 1967 apud ASPLUND, 1973; CURRY *et al.*, 1968) caracterizada por um pico inicial rápido (de curta duração) (GRODSKY *et al.*, 1967; CURRY *et al.*, 1968; ASPLUND, 1973) seguida por uma elevação lenta que geralmente atinge um platô, cujos valores são semelhantes aos observados no pico inicial de secreção. Contudo, esse padrão só é completamente estabelecido no início do período neonatal (ASPLUND *et al.*, 1969; HOLE *et al.*, 1988; BOSCHERO *et al.*, 1993). Além disso, a secreção de insulina por ilhotas fetais é comprovadamente reduzida comparada à de adultos (ASPLUND *et al.*, 1969; SODOYEZ-GOFFAUX *et al.*, 1972; ASPLUND *et al.*, 1973 ; ASPLUND *et al.*, 1975; HELLERSTROM & SWENNE, 1991; BOSCHERO *et al.*, 1993). A literatura sugere ainda, que essa fase representa um período fundamental para a maturação do sistema secretor (SODOYEZ-GOFFAUX *et al.*, 1979; FREINKEL *et al.*, 1984; BLISS & SHARP, 1994b) porém, devido ao grande número de

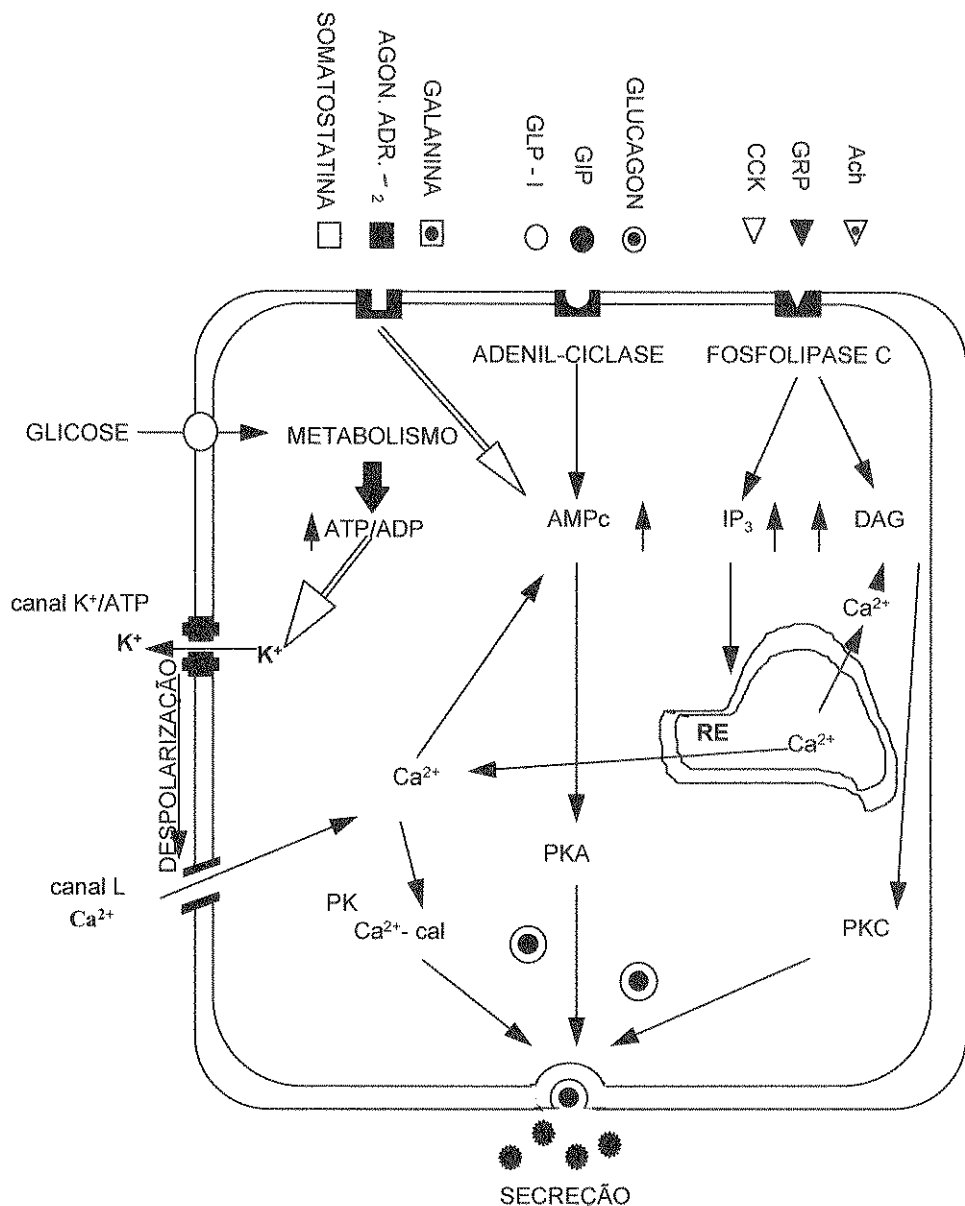


Fig 1. Esquema simplificado dos mecanismos envolvidos na secreção da insulina. (BOSCHERO, 1996)

O esquema representa uma célula B pancreática e o mecanismo de secreção de insulina induzida por glicose. A figura mostra ainda, os sistemas de inibição e potencialização através da adenil-ciclase e fosfodiesterase de membrana com seus respectivos segundos mensageiros. As setas vazias representam os processos inibitórios e as setas preenchidas, os estimulatórios. Estão indicados também, os canais iônicos e receptores de membrana (símbolos preenchidos), bem como hormônios e neurotransmissores (diferentes símbolos no exterior da célula). Abreviaturas: canal K⁺/ATP - canal regulado pelo ATP; canal L - canal de Ca²⁺ dependente de voltagem; GIP - polipeptídeo inibidor gástrico; GLP - polipeptídeo semelhante ao glucagon; Ach - acetilcolina; GRP - polipeptídeo inibidor de gastrina; CCK - colecistoquinina; AMPc - adenosina monofosfato cíclica; IP₃ - inositol 1,4,5 trifosfato; DAG - diacilglicerol; RE - retículo endoplasmático; PKA - proteína quinase dependente do AMPc; PK_{Ca²⁺-Cal} - proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina; PKC - proteína quinase dependente do DAG.

resultados contraditórios (HOLE *et al.*, 1988; RORSMAN *et al.*, 1989), vários aspectos permanecem ainda não esclarecidos. Apesar das reservas de insulina das ilhotas (SODOYEZ-GOFFAUX *et al.*, 1971) e a capacidade de síntese estarem adequadas (FREIE *et al.*, 1975), a secreção em resposta à glicose e a outros nutrientes, em fetos de 17,5 a 21 dias, é reduzida (ASPLUND *et al.*, 1969; HEIZE & STEINKE, 1971; HELLERSTROM & SWENNE, 1991), monofásica (AMMON *et al.*, 1985; BLISS & SHARP, 1994b) e insensível aos bloqueadores de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (HOLE *et al.*, 1988; RORSMAN *et al.*, 1989), embora tenha sido detectada a presença de canais L aos 19,5 dias (HOLE *et al.*, 1988). Por outro lado, tem se demonstrado que ilhotas neonatais, contrariamente às fetais, apresentam incremento nos níveis de secreção de insulina induzida por glicose (FREIE *et al.*, 1975; HELLERSTROM & SWENNE, 1985). A alta concentração de insulina em pâncreas de neonatos, semelhante à de adultos (BLÁZQUEZ *et al.*, 1970), pode ser decorrente de taxas de crescimento diferenciadas entre os tecidos endócrino e exócrino (FREIE *et al.*, 1975). Entretanto, a resposta bifásica que ocorre nessa fase, ainda é qualitativamente inferior a adulta (KERVAN & RANDON, 1980; BLISS & SHARP, 1994b). De qualquer forma, à partir desse período a secreção tende a aumentar gradativamente, principalmente entre o 14º e 21º dias de vida, que correspondem ao período de desmame em ratos (BLISS & SHARP, 1994b).

Diante da observação de que inibidores de fosfodiesterase aumentam a secreção de insulina (HEINZE & STEINKE, 1972; CHARLES *et al.*, 1973; GRILL & CERASI, 1974) tem sido proposto que o AMPc atue como o segundo mensageiro potencializando a resposta monofásica (KERVAN & RANDON, 1980). Ao passo que, a estimulação da segunda fase pela glicose tem sido atribuída principalmente à ativação da proteína quinase C (FLETCHER & WAYS, 1991).

A fase crítica de maturação do sistema secretor, também tem sido tema bastante discutido. Se por um lado têm sido sugerido que o aparecimento da segunda fase de secreção da insulina à glicose ocorre apenas no início do período neonatal (ASPLUND *et al.*, 1969; ASPLUND, 1973; HOLE *et al.*, 1988), alguns autores relatam um aumento da responsividade à glicose a partir do 18,5º dia de vida intra-uterina (KERVAN & GIRARD, 1974). KERVAN & RANDON (1980), descrevem como nítida a secreção bifásica observada entre os dias 20,5º e 21,5º fetais em ratos. Em contrapartida, há trabalhos que se referem à ocorrência de um padrão monofásico no 21º dia de gestação (ASPLUND *et al.*, 1969; ASPLUND & FREINKEL, 1978). Estudos recentes porém, têm indicado o período compreendido entre o 19,5º e 20,5º dia como fundamental para o maturação da resposta secretória, ainda que não apresente uma curva de secreção bifásica (BLISS & SHARP, 1994a; BLISS & SHARP, 1994b). Esses trabalhos sugerem que uma alteração do metabolismo, com redução da oxidação de ácidos graxos e aumento da utilização da glicose, seria o fator

primordial para a maturação do acoplamento estímulo/secreção, favorecendo a ocorrência da segunda fase. Essa afirmação, de certa forma, está de acordo com a proposição de aparecimento da resposta bifásica apenas no início do período neonatal (FLETCHER & WAYS, 1991).

Vários mecanismos têm sido propostos para justificar a aparente imaturidade da resposta secretória fetal. Muitos trabalhos têm sugerido que as células B, nesse período, possuem um metabolismo mitocondrial imaturo ou alterado com relação aos substratos derivados da glicose (FREINKEL *et al.*, 1984; RORSMAN *et al.*, 1989; BOSCHERO *et al.*, 1990), repercutindo em uma ineficiência no bloqueio dos canais K^+ /ATP (WAHL *et al.*, 1992). Por outro lado, alguns pesquisadores acreditam que o acoplamento entre os canais de K^+ e a capacidade de induzir despolarização da membrana é que não se encontram completamente desenvolvidos nessa fase (HOLE *et al.*, 1988). Tem sido descrito, ainda, a ocorrência de um número reduzido de canais de Ca^{2+} e K^+ (AMMON *et al.*, 1989) ou uma funcionalidade alterada dos mesmos em ilhotas fetais (HEINZE & STEINKE, 1971; RORSMAN *et al.*, 1989).

Portanto, estudos relacionados com o processo de maturação da resposta secretória de insulina podem proporcionar novos esclarecimentos com relação aos mecanismos fisiológicos envolvidos no sistema de secreção (HELLERSTROM & SWENNE, 1991; BLACK *et al.*, 1994). Além disso, têm sido questionado se alterações ocorridas durante o período perinatal podem

comprometer a secreção pós-natal e predispor o organismo ao desenvolvimento do diabetes (HOLE *et al.*, 1988; BOSCHERO *et al.*, 1993). Entretanto, embora essa fase pareça representar um importante estágio de transição para o estabelecimento da resposta de secreção bifásica, ainda não foram obtidos dados conclusivos com relação ao período crítico em que isso ocorre.

2- OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a maturação da resposta secretória de insulina, em ratos, durante as fases de vida perinatal (fetos de 19 e 21 dias e neonatos de 3 dias) e adulta (90 dias). Para isso, foi realizado o estudo linear da participação de diferentes eventos no processo estímulo/secreção, ou seja, despolarização celular por altas concentrações de potássio, despolarização celular por bloqueio dos canais de K^+ /ATP pelo metabolismo da glicose, e ativação de segundos mensageiros que potencializam a secreção de insulina, tais como: AMPc, IP_3 e DAG.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- ANIMAIS

Ratos adultos (Rattus norvegicus, var. albina) wistar de ambos os sexos, fornecidos pela Central de Bioterismo da UNICAMP, foram mantidos sob condições controladas de temperatura, umidade e luz (12 horas de ciclo claro/escuro), recebendo água e ração comercial *ad libitum*. Fêmeas (3-6 meses) foram colocadas para acasalamento ao anoitecer. A presença de esperma em esfregaço vaginal, realizado na manhã seguinte (cerca de 15 horas depois), serviu como indicativo de cópula, sendo considerado então, como o 1º dia de gestação. Em nossos protocolos experimentais foram utilizados fetos de 19 e 21 dias, neonatos de 3 dias e adultos com aproximadamente 90 dias.

3.2- REAGENTES E RADIOISÓTOPO

Todas as substâncias utilizadas nas soluções possuíam grau analítico de pureza (P.A.).

Reagentes utilizados e procedência:

Albumina bovina fração V; teofilina; carbamilcolina: Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA.

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

Anticorpo anti-insulina de rato: Novo Research Institute, Bagsvaerd, Denmark.

¹²⁵I-Insulina: Amershan Health Science Group.
Buckinghamshire, England, UK.

3.3- SOLUÇÕES

3.3.1- Solução de Hanks* para isolamento de pâncreas e ilhotas

Composição:

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

3.3.2- Solução de Krebs-Ringer** para incubação

Composição:

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

* HANKS & WALLACE, 1949 apud HERCHUELZ, 1980

**KREBS & HENSELEIT, 1932 apud HERCHUELZ, 1980

Foram acrescentados à solução no momento do uso, 2 mg/ml de albumina bovina fração V.

3.3.3- Mistura ácido-álcool

Composição:

Etanol 492,5 ml

HCl 12 N 007,5 ml

3.4- PROTOCOLO EXPERIMENTAL

3.4.1- Isolamento de pâncreas de ratos fetais e neonatais

Todos os animais foram sacrificados por decapitação. Os fetos foram retirados das mães através de cesariana. Após incisão abdominal, o pâncreas foi removido e fragmentado em pedaços de aproximadamente 0,5 à 1 mm³ com auxílio de tesoura e lâmina de barbear. Em seguida, realizou-se a transferência do tecido com o auxílio de pipeta Pasteur para placas de cultura com 24 poços (2 fragmentos por poço), nos quais adicionou-se previamente 0,75 ml de solução de pré-incubação (Krebs-Ringer contendo 5,6 mM de glicose).

3.4.2- Isolamento das ilhotas de Langerhans de ratos adultos

O isolamento das ilhotas foi obtido através da destruição da porção exócrina pancreática através de digestão por collagenase.

Os animais foram sacrificados por decapitação. Após incisão abdominal e oclusão da extremidade duodenal do ducto

pancreático foi injetada, através de uma seringa conectada à uma cânula, solução de Hanks contendo collagenase (7 mg/10 ml) na porção hepática do mesmo ducto. Depois de intumescido, o pâncreas foi excisado e transferido para uma placa de Petri contendo solução de Hanks. Em seguida, depois de retirar-se o tecido adiposo e gânglios linfáticos, o material foi fragmentado e transferido para um tubo de ensaio (30 ml). Esse tubo foi deixado em banho-maria a 37°C durante 18 minutos. Decorrido esse período, o tubo foi agitado manualmente, ainda em banho-maria, por aproximadamente 1,5 minutos, sendo esse tempo controlado de acordo com a viscosidade do material. Em seguida, o conteúdo foi transferido para um becker, procedendo-se várias lavagens com solução de Hanks através de suspensões do material com seringa (20 ml) sem agulha. As ilhotas foram coletadas sob lupa (aumento de 20 vezes), com o auxílio de uma pipeta Pasteur estirada. Cada pâncreas forneceu cerca de 400 ilhotas. Foram utilizadas 5 ilhotas para cada poço da placa de cultura.

3.4.3- Secreção estática de insulina

Os fragmentos de pâncreas fetais e neonatais bem como as ilhotas de adultos, foram inicialmente incubados à 37°C por 1 hora em solução de Krebs-Ringer (0,75 ml) contendo 5,6 mM de glicose (G). O pH da solução foi ajustado em 7,4 através de gaseamento com carbogênio (95% O₂/5% CO₂). Após esse período, a solução de pré-incubação foi substituída por 1 ml de

Krebs com diferentes concentrações de glicose (2,8; 5,6; 8,3 e 16,7 mM) ou solução de Krebs (5,6 mM G) acrescida de 5 mM de teofilina (Teo), 200 μ M de carbamilcolina (Cch) ou ainda 25 mM de potássio (K^+).

Prosseguiu-se a incubação por 1 hora em condições controladas de temperatura e pH. Após resfriamento da placa em banho de gelo, o sobrenadante de cada poço foi transferido para tubos de ensaio e armazenados à -20°C até a realização das dosagens de insulina.

3.4.4- Extração do conteúdo total de insulina

Nas placas contendo fragmentos de pâncreas ou ilhotas, adicionou-se 1 ml de uma solução de extração, composta pela mistura de 70% etanol e 30 % HCl 0,2 N, sendo o conteúdo de cada poço transferido para tubos de ensaio. Em seguida, procedeu-se a trituração do tecido com auxílio de um macerador e um aparelho de agitação. Após esse procedimento, a solução foi deixada à 4°C por um período de 24 horas, quando as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante coletado e armazenado à -20°C.

3.4.5- Dosagem de insulina

A insulina secretada e a extraída dos fragmentos foram diluídas (quando necessário) e medidas por radioimunoensaio segundo método descrito por SCOTT *et al.*, (1981).

3.5- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados estão representados pelos valores médios e os respectivos erros padrões das médias. Nas Figs 2, 4 e 6, os valores correspondem ao conteúdo total de secreção de insulina extraída dos fragmentos (fetos e neonatos) ou ilhotas (adultos). As Figs 3, 5, 7 e 8 mostram os dados expressos em termos de percentagem sobre seus respectivos valores basais.

Para comparar dois grupos de resultados entre si, foi empregado o teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon. Quando mais de dois grupos foram analisados simultaneamente, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido por distribuição livre de comparações múltiplas.

Foram considerados significativos os valores de p menores que 5 %.

4- RESULTADOS

A secreção de insulina, tanto em presença de 2,8 quanto de 5,6 mM de glicose, não apresentou diferença significativa dentro dos grupos estudados. Isso permitiu que os respectivos resultados fossem colocados em um único grupo denominada basal.

A figura 2 mostra os valores de secreção de insulina, expressos em percentagem do conteúdo total, em presença de diferentes concentrações de glicose. A secreção de insulina basal (glicose 2,8-5,6 mM) foi de $0,66 \pm 0,08\%$; $0,82 \pm 0,08\%$; $0,38 \pm 0,04$ e $0,88 \pm 0,21\%$ do conteúdo pancreático total de fetos com 19 e 21 dias, neonatos com 3 dias e adultos com 90 dias, respectivamente.

A elevação da concentração de glicose para 8,3 e 16,7 mM não promoveu alteração significativa na resposta fetal aos 19 dias atingindo, para essas concentrações de glicose $0,89 \pm 0,08$ e $0,9 \pm 0,13\%$ do conteúdo total, respectivamente. Contudo, ilhotas fetais de 21 dias apresentaram aumentos significativos, ainda que discretos, a partir de 8,3 mM de glicose. Nesta concentração, a secreção foi de $1,16 \pm 0,09\%$ atingindo $1,26 \pm 0,13\%$ do conteúdo total com 16,7 mM de glicose. Em pâncreas de neonatos com 3 dias de vida a secreção de insulina foi de $0,7 \pm 0,17\%$ em 8,3 mM de glicose e $1,06 \pm 0,23\%$ em 16,7 mM de glicose. Para estas mesmas concentrações de glicose, a secreção por ilhotas de ratos adultos atingiu respectivamente $1,83 \pm 0,22$ e $2,62 \pm 0,15\%$, enquanto o

aumento obtido em presença de 16,7 mM de glicose foi aproximadamente 3 vezes maior que o basal.

O incremento na secreção de insulina sobre o basal (2,8-5,6 mM), induzido por 8,3 e 16,7 mM de glicose nas diferentes idades estudadas, está representado na figura 3. Na presença de 8,3 mM de glicose o incremento na secreção foi de 35, 41, 84 e 104% para fetos de 19 e 21 dias, neonatos (3 dias) e adultos, respectivamente. Para os mesmos grupos de animais, esses valores foram de 36, 54, 179 e 193% em presença de 16,7 mM de glicose.

A secreção induzida por solução contendo 30 mM de potássio está ilustrado na figura 4. Apesar de ter ocorrido aumento progressivo na resposta de insulina com o decorrer da idade, nenhuma diferença significativa foi encontrada em grupos fetais (Figs 4A e 4B). A figura 4 demonstra, ainda que, em presença de altas concentrações de potássio, neonatos de 3 dias apresentaram secreção de insulina 1,4 vezes maior que a basal ($2,41 \pm 0,43\%$, Fig 4C) e, em ilhotas provenientes de animais adultos, o aumento observado foi de 2 vezes o basal ($3,56 \pm 0,18\%$, Fig 4D). Esses dados estão representados na figura 5 como incremento na secreção de insulina sobre a resposta basal. Os aumentos registrados foram 7, 34, 43 e 101%, respectivamente, para 19 e 21 dias fetais e 3 e 90 dias de vida, embora somente os grupos de 3 e 90 dias tenham apresentado aumentos significativos.

A figura 6 ilustra os efeitos da teofilina (5 mM) e da carbamilcolina sobre a secreção de insulina. Ambas,

potencializaram significativamente a resposta secretória de insulina em todas as idades estudadas. Os aumentos foram de $1,2 \pm 0,23$; $1,6 \pm 0,29$; $1,11 \pm 0,32$ e $3,75 \pm 0,44\%$ em fetos de 19 e 21 dias, neonatos de 3 dias e adultos de 90 dias, respectivamente. Em presença de $100 \mu\text{M}$ de Cch, a secreção foi de $1,4 \pm 0,41$ e $1,61 \pm 0,24$, em fetos de 19 e 21 dias, $1,23 \pm 0,35$ em neonatos e $4,43 \pm 0,31\%$ do conteúdo total em adultos, respectivamente.

Na figura 7, os valores foram expressos como incremento sobre a secreção basal ($5,6 \text{ mM}$ de glicose). Nesse caso, o incremento na secreção em resposta à Teo foi de 82, 95, 192 e 318% para 19, 21 dias de gestação, 3 e 90 dias de vida, respectivamente.

A secreção em resposta ao estímulo com carbamilcolina foi mais acentuada nos fetos de 19 dias, neonatos de 3 dias e nas ilhotas de animais adultos, ou seja, 2, 3 e 5 vezes maior que o basal ($5,6 \text{ mM}$ de glicose), respectivamente. Na figura 8 estão representados os valores expressos como percentagem do conteúdo total. Em fetos de 19 e 21 dias, neonatos com 3 dias e adultos com 90 dias, os resultados foram de 127, 96, 224 e 396% da secreção basal, respectivamente.

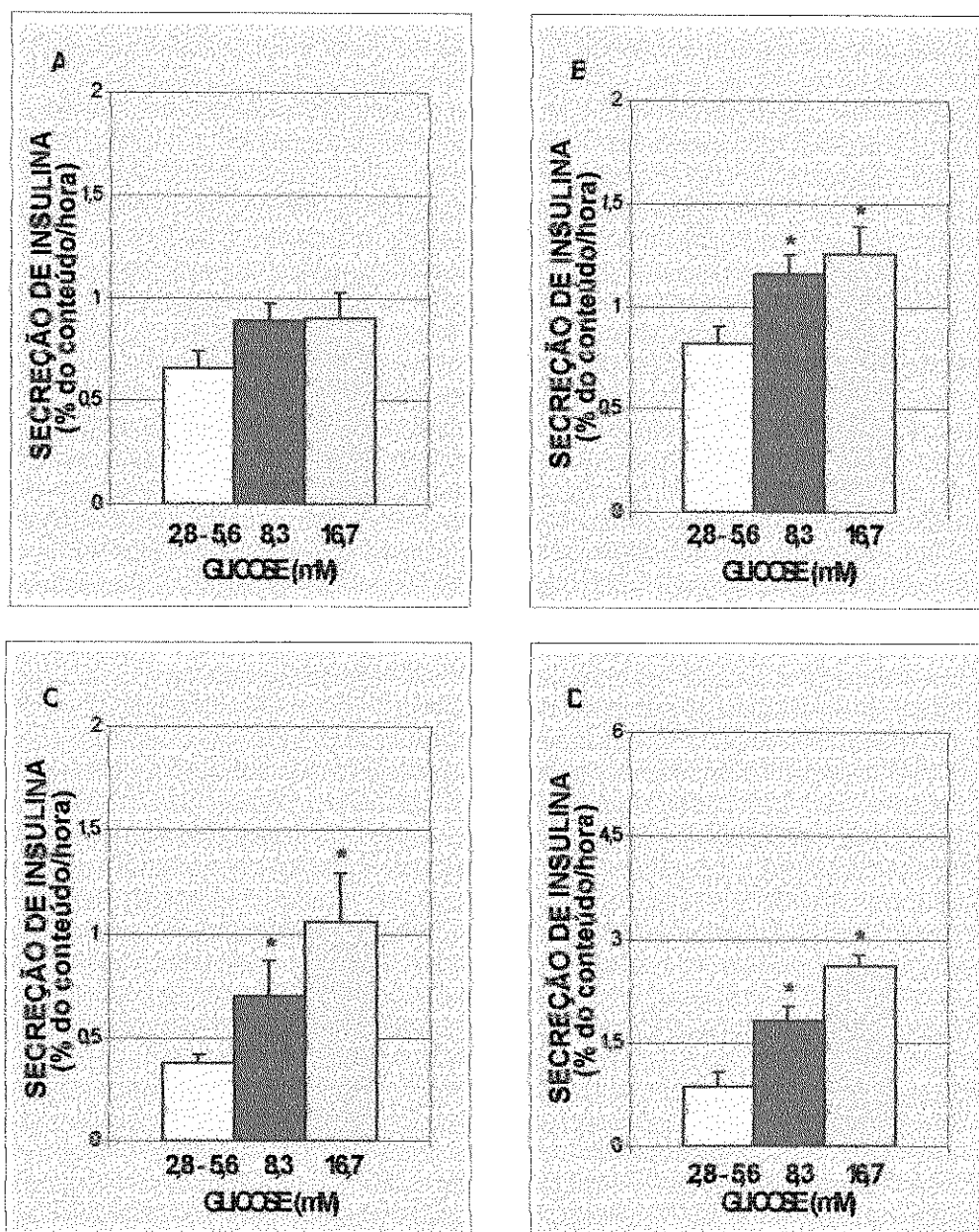


Fig 2. Secreção de insulina frente à diferentes concentrações de glicose

Estão representados a média $\pm$ EP dos valores observados em fetos de 19 e 21 dias (A e B), neonatos de 3 dias (C) e adultos de 90 dias (D). Fragmentos de pâncreas (fetos e neonatos) ou ilhotas isoladas (adultos) foram incubados por 1 hora em solução de Krebs-Ringer contendo 2,8; 5,6; 8,3 e 16,7 mM. A extração do conteúdo total de insulina foi executada mediante trituração do tecido em solução de ácido-álcool. Para animais adultos utilizou-se uma escala de 0 a 6. O valor de n variou de 4 a 25.

* $p < 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis seguido por múltiplas comparações)

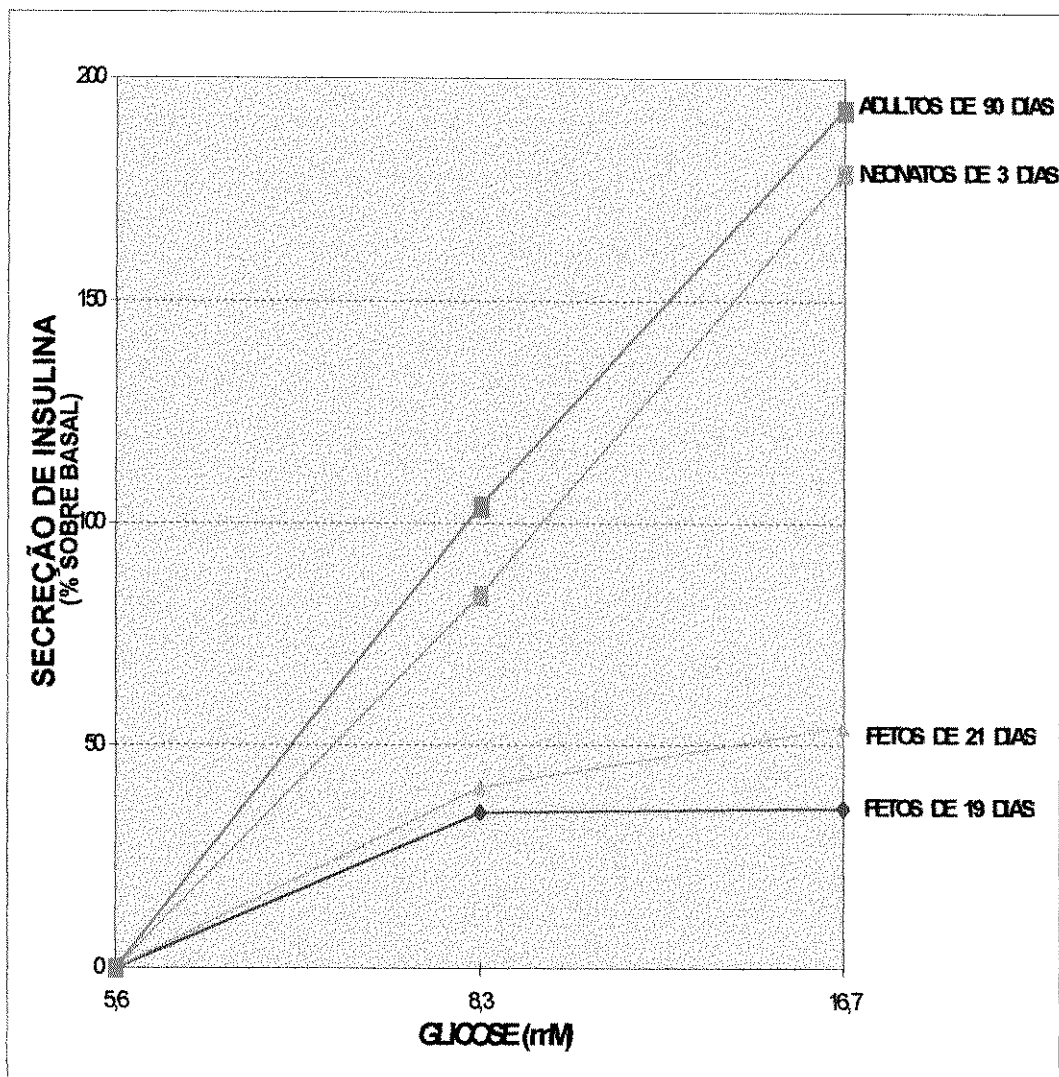


Fig 3. Incremento na secreção de insulina induzido por diferentes concentrações de glicose.

Fragmentos de pâncreas de ratos em idade fetal (19 e 21 dias), neonatal (3 dias) e ilhotas de adultos (90 dias), foram incubados por 1 hora em solução de Krebs contendo 2,8; 5,6; 8,3 ou 16,7 mM de glicose. Os resultados, indicados anteriormente (Fig 2) em percentagem do conteúdo/hora, estão representados como percentagem de secreção basal. Os valores respectivos à fetos de 19 e 21 dias, neonatais e adultos foram de: 35, 41, 84 e 104% com G 8.3 mM e 36, 54, 179 e 193% com G 16,7 mM.

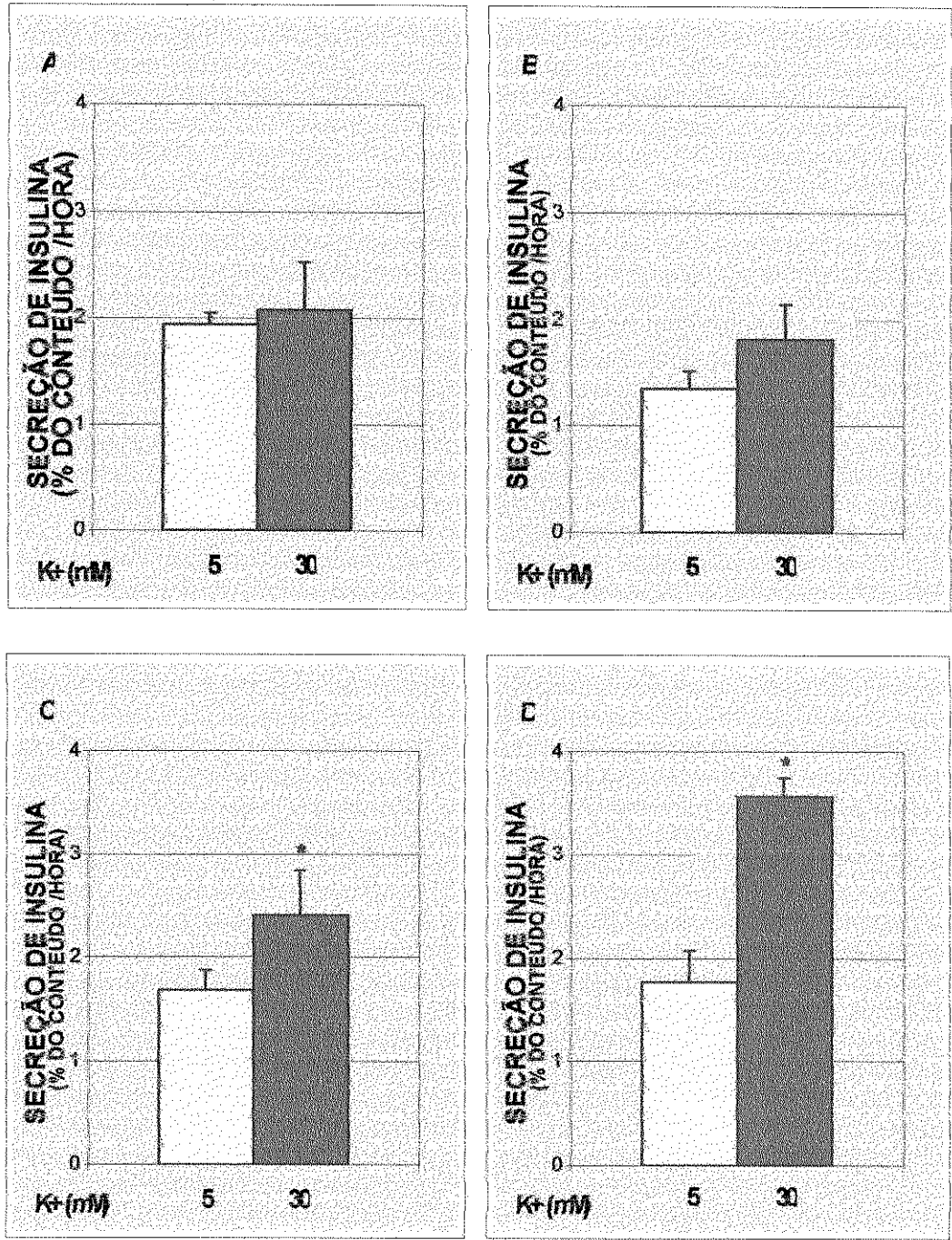


Fig 4. Efeito do K⁺ (30 mM) sobre a secreção de insulina. Fragmentos de pâncreas fetais com 19 (A) e 21 dias (B), neonatais de 3 dias (C) e ilhotas isoladas de adultos com 90 dias (D) foram incubados por 1 hora à 37°C, em atmosfera de carbogênio, na presença de 5,6 mM de glicose e 5 mM de K⁺. Os valores, correspondentes à percentagem do conteúdo secretado em 1 hora, estão representados pela média ± EP. O valor de n variou de 4 a 9.

* p< 0,05 (teste de Wilcoxon)

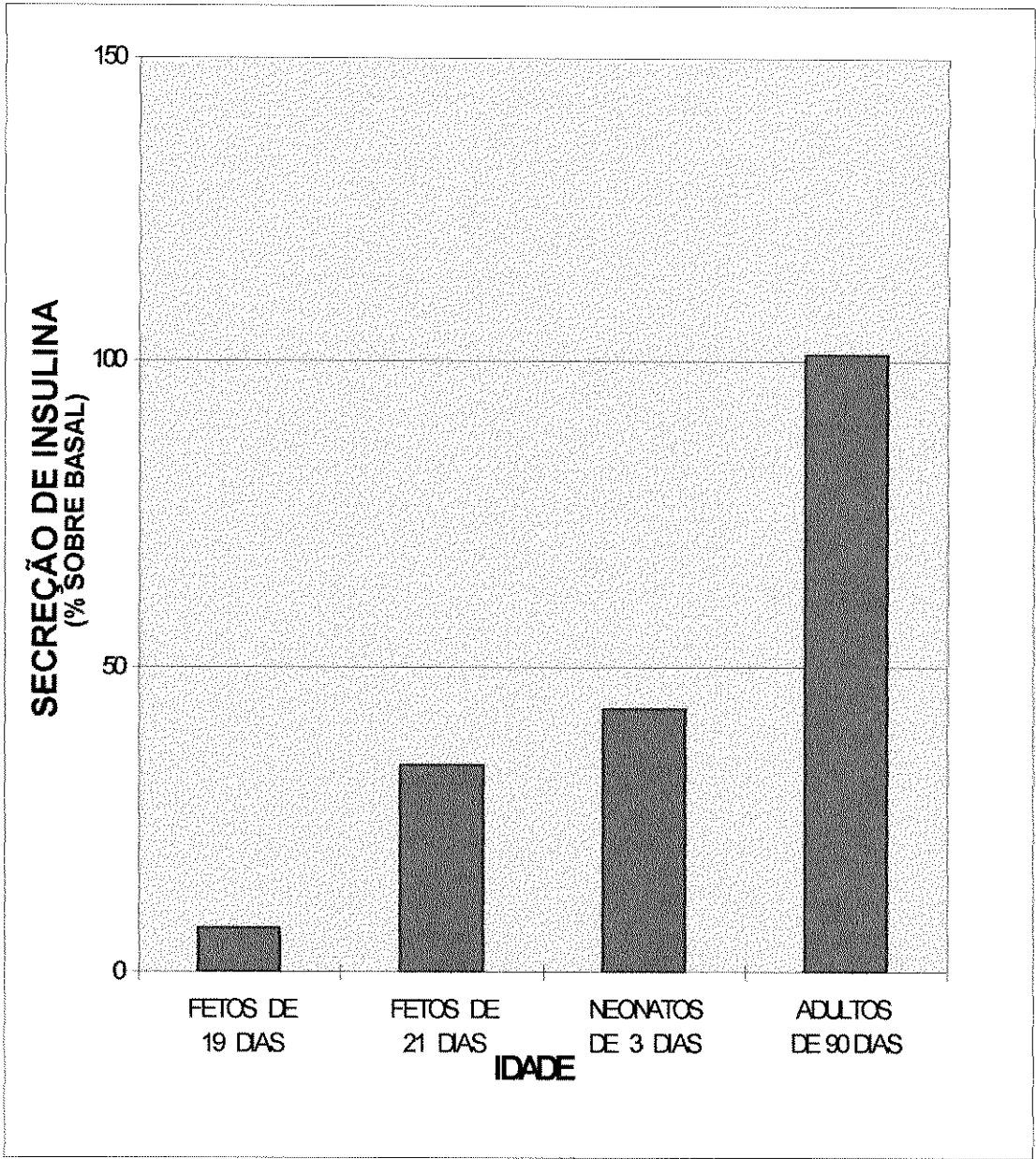


Fig 5. Incremento na secreção de insulina induzido por K⁺ (30 mM)

Fragmentos de pâncreas de ratos com 19 e 21 dias de vida intrauterina, neonatos de 3 dias e adultos de 90 dias, foram incubados por 1 hora à 37°C, em atmosfera de carbogênio na presença de 5,6 mM de glicose e 5 mM de K⁺. Estão representados os resultados percentuais de secreção sobre o basal, extrapolados da Fig 4.

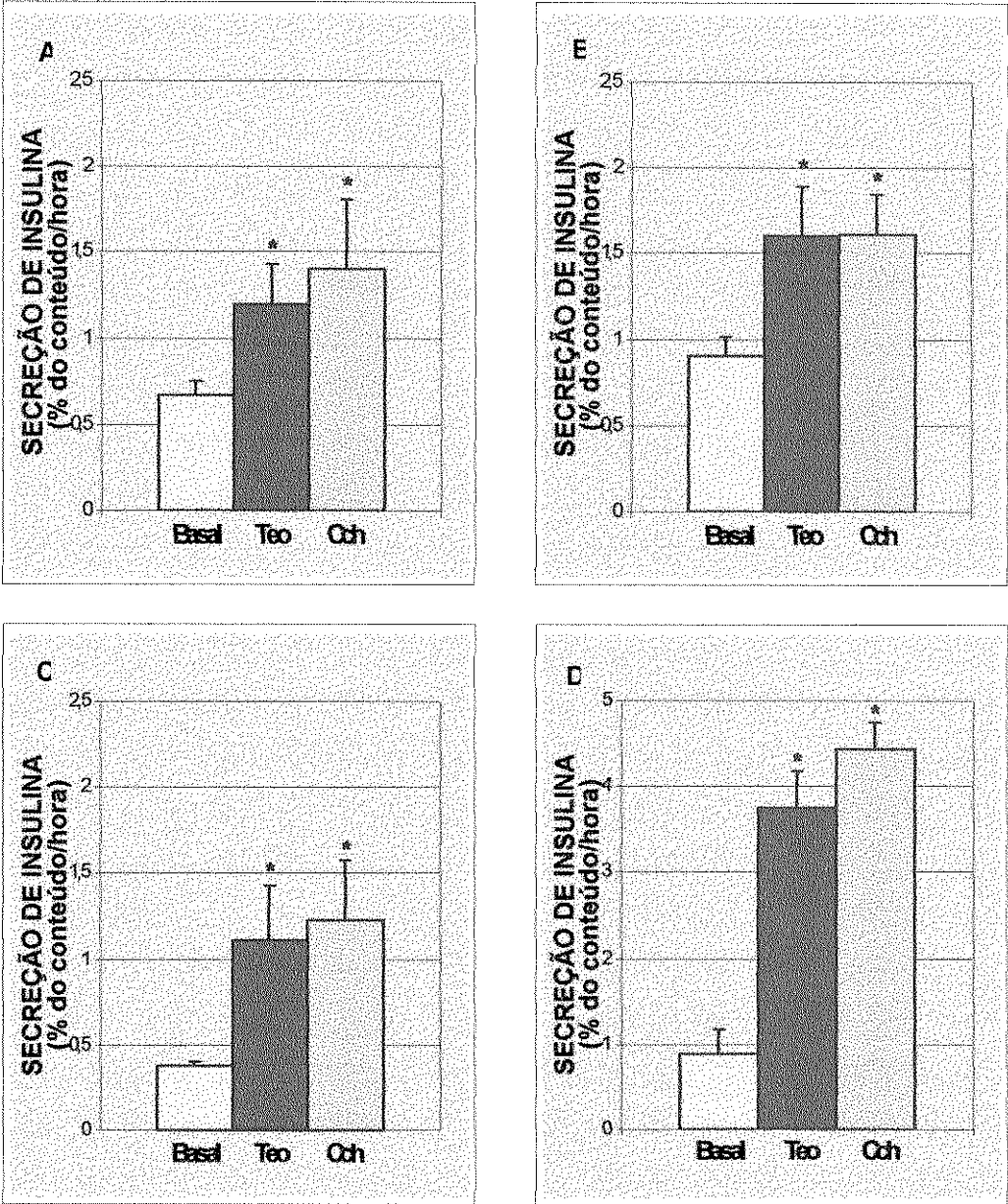


Fig 6. Efeito da teofilina (5mM) e da carbamilcolina (200 μ M) sobre a secreção de insulina.
Estão indicadas as médias da percentagem de conteúdo total de insulina e os respectivos erros padrões das médias para fetos de 19 dias e 21 dias (Figs A e B), neonatos de 3 dias (Fig C) e adultos com 90 dias de vida (Fig D). Ilhotas (adultos) ou fragmentos de pâncreas (fetos e neonatos), foram incubados por 1 hora à 37°C em atmosfera de carbogênio, na presença de 5,6 mM de glicose (basal). Para animais adultos utilizou-se uma escala diferente (valores de 0 a 5) para representar a percentagem de secreção de insulina. n variou de 4 a 14.

* $p < 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis seguido por comparações múltiplas)

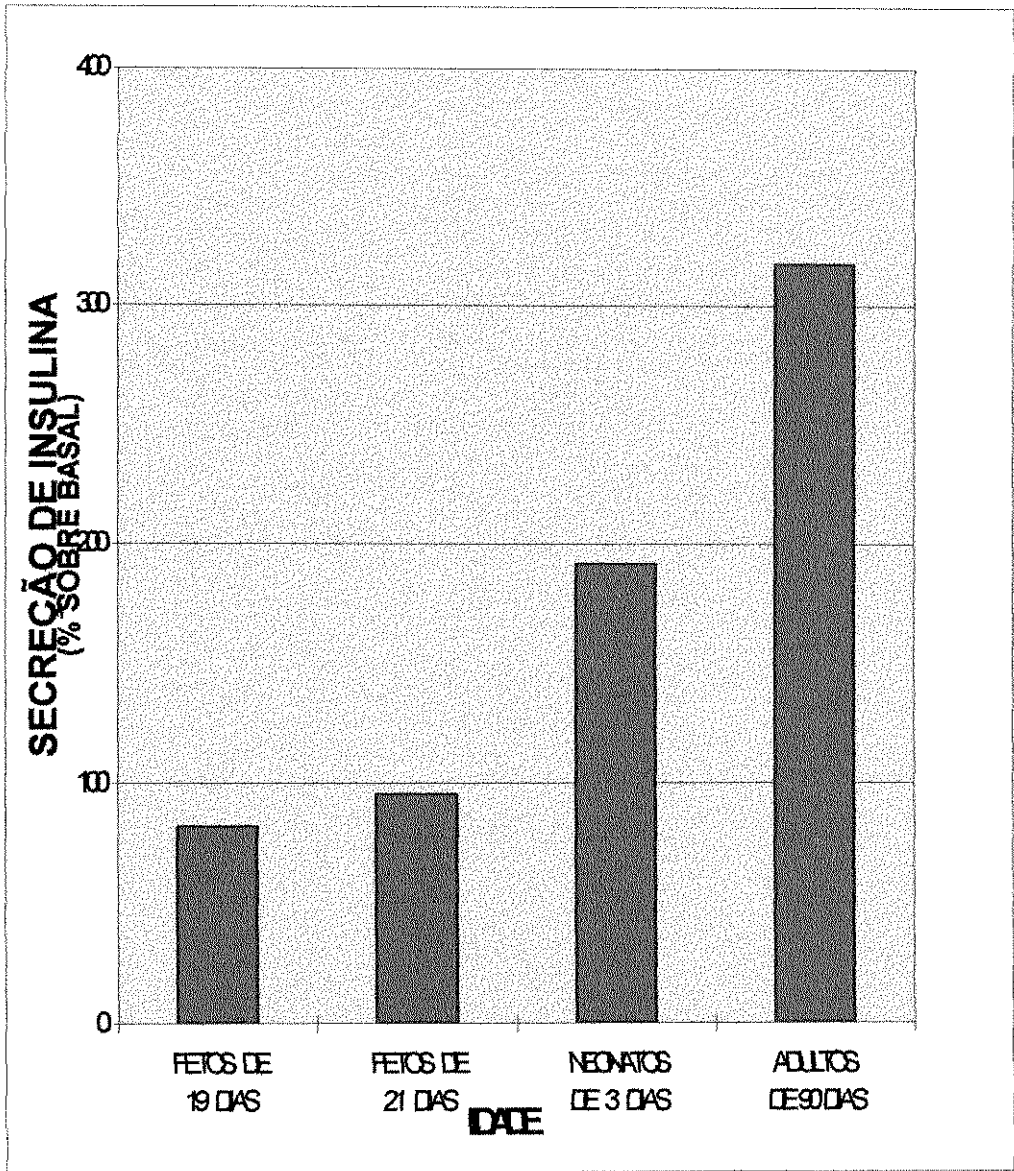


Fig 7. Incremento na secreção de insulina induzido por teofilina (5 mM).
Fragmentos de pâncreas de fetos (19 e 21 dias), neonatos (3 dias) e ilhotas de adultos (90 dias), foram incubados por 1 hora à 37°C, com solução de glicose 5,6 mM acrescida com teofilina, por 1 hora. Os valores, extrapolados da Fig 6, correspondem à percentagem de secreção sobre o valor basal (glicose 5,6 mM sem teofilina). n variou de 4 a 14.

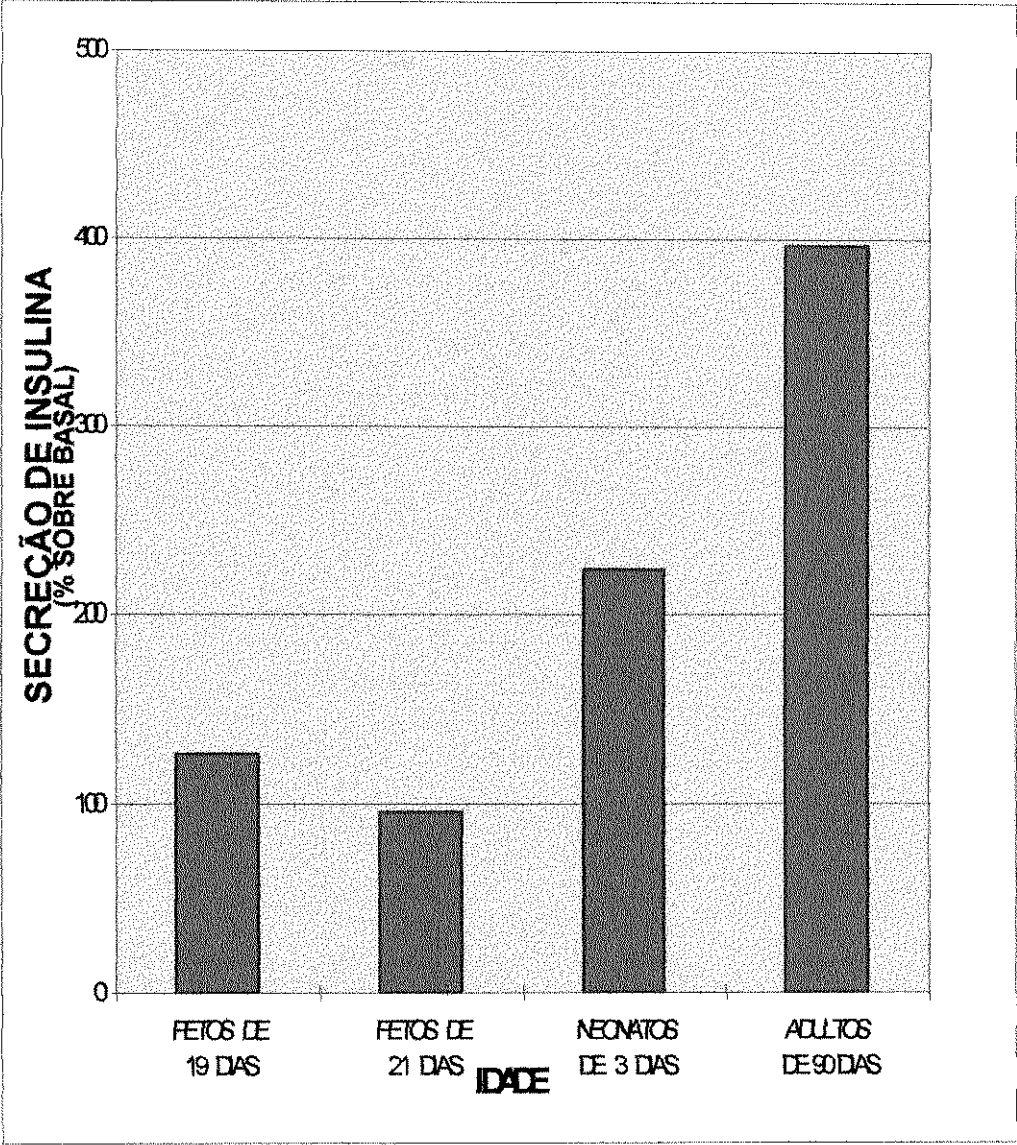


Fig 8. Incremento na secreção de insulina induzido por carbamilcolina (200 μ M Cch).

Fragments of pancreas of fetuses (19 and 21 days), neonates (3 days) and islets of adults (90 days), were incubated with solution of glucose 5,6 mM increased with carbamylcholine for 1 hour. The results, extrapolated from Fig 5, are expressed in percentage of secretion over the basal value (glucose 5,6 mM without Cch). The increase found was 127 and 96 % for 19 and 21 days fetuses, 224 % in neonates and 396 % in adults, in relation to basal secretion. n varied from 5 to 14.

5- DISCUSSÃO

Durante o período perinatal, os principais eventos envolvidos no estabelecimento da resposta insulínica adulta passam por uma fase decisiva de maturação funcional (BOSCHERO *et al.*, 1993; BLISS & SHARP, 1994b).

Embora fisiologicamente normal para o período de vida em questão, a secreção de insulina por fetos e neonatos é comprovadamente reduzida comparada à de adultos (ASPLUND *et al.*, 1969; HEINZE & STEINKE, 1972; AMMON *et al.*, 1989). Além disso, durante a fase perinatal a resposta secretória apresenta um padrão monofásico similar ao observado no estágio inicial do diabetes, ou seja, baixo pico inicial e atraso da segunda fase de secreção (ASPLUND, 1973; KOSAKA *et al.*, 1977; BERGMAN, 1989; BOSCHERO *et al.*, 1993). Sabe-se também, que alterações morfológicas e funcionais das células B pancreáticas, ocorridas na fase de vida intrauterina, podem comprometer a sensibilidade do sistema secretor no período pós-natal (HOLE *et al.*, 1988; PETTITT *et al.*, 1988; BOSCHERO *et al.*, 1993). Por essas razões, a análise comparativa da secreção de insulina, durante as fases perinatal e adulta, permite melhor compreensão dos mecanismos celulares envolvidos no acoplamento estímulo/secreção. Pode contribuir também para o esclarecimento de possíveis relações o processo de maturação do sistema secretor de insulina e a origem de disfunções metabólicas.

A redução da permeabilidade ao potássio, é uma das principais etapas envolvidas no acoplamento estímulo-secreção de insulina (BOSCHERO *et al.*, 1977; HENQUIN, 1978). Esse evento, desencadeado pelo bloqueio dos canais de K^+ sensíveis a ATP (DUNNE & PETERSEN, 1986), gera despolarização da membrana da célula B promovendo a entrada de Ca^{2+} pelos canais L (HOLE, *et al.*, 1988). Apesar desses canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem terem sido detectados em ilhotas fetais e neonatais (COOK *et al.*, 1986; HOLE, *et al.*, 1988) com propriedades semelhantes aos das células adultas (RORSMAN *et al.*, 1989), estudos com radioisótopos têm sugerido a não funcionalidade dos mesmos no referido período (AMMON *et al.*, 1985; AMMON *et al.*, 1989). Por outro lado, a insensibilidade dos canais K^+ /ATP no período perinatal, tem sido atribuída à imaturidade do metabolismo da glicose (ANDERSSON, 1975; RORSMAN, *et al.*, 1989) ou a um processo de sinalização inadequado entre a produção de ATP e a capacidade de induzir o bloqueio dos mesmos (ASPLUND & FREINKEL, 1978). Contudo é possível ainda, que o “defeito” da resposta secretória, nessa fase, seja decorrente de um número reduzido ou do comportamento diferenciado dos canais K^+ /ATP em relação aos adultos (BOSCHERO *et al.*, 1990; BOSCHERO *et al.*, 1993).

Para melhor avaliar essas questões, foram realizados dois tipos de procedimentos: o estudo da secreção de insulina mediante administração de solução de Krebs acrescida de potássio ou de concentrações crescentes de glicose. Em ilhotas de

animais adultos, ambos promovem a despolarização da membrana celular (SMITH, 1990; MISLER *et al.*, 1992) resultando no influxo de Ca^{2+} pelos canais L (ASHCROFT *et al.*, 1980; RORSMAN *et al.*, 1988; FOURNIER *et al.*, 1993), acúmulo de Ca^{2+} no citoplasma (WOLLHEIM & SHARP, 1981) e consequente extrusão dos grânulos de insulina. Porém, permitem discriminar a atuação de dois eventos diferentes: o efeito direto do aumento da concentração de íons K^+ sobre o potencial de membrana das células B (despolarização) e a ação do ATP, proveniente do metabolismo da glicose, sobre os canais K^+/ATP que em última análise, também causa a despolarização (RORSMAN *et al.*, 1988). Os resultados obtidos com altas concentrações de potássio permitem conjecturar sobre várias alternativas, ou seja, é possível: a) que a membrana plasmática de células B fetais não esteja adequadamente preparada para a despolarização promovida por altas concentrações de K^+ no meio, como ocorre em células de adultos; b) que o número de canais L esteja reduzido à tal ponto que mesmo após despolarização adequada, não ocorre influxo de Ca^{2+} suficiente; c) que ambos os canais, embora presentes nas células fetais, estejam temporariamente inativos. Em suma, é provável que uma ou mais destas 3 alternativas explique a menor secreção de insulina produzida por potássio (30mM) em pâncreas de fetos. Aparentemente, esse problema é progressivamente resolvido à medida que o animal envelhece (Figs 4 e 5).

Em relação à resposta obtida por glicose, pode-se observar que a secreção basal por pâncreas de fetos, quando representada

em percentagem do conteúdo total, foi maior que a encontrada em neonatos e adultos (Fig 2), confirmando descrição de outros autores (BLÁZQUEZ *et al.*, 1970; KERVRAN & RANDON, 1980). A partir de 21 dias fetais, ocorreu um aumento significativo na secreção de insulina induzida por glicose (comparada à basal) nas concentrações de 8,3 mM e 16,7 mM. Esse incremento parece significar que ocorre uma melhora na capacidade de produzir ATP, bloquear um número maior de canais de K^+ e/ou abrir um maior número de canais de Ca^{2+} , à medida que o animal envelhece.

A secreção de insulina também pode ser modulada por sistemas de segundos mensageiros. Tem sido considerado que o aumento celular de AMPc não é, *per se*, um estímulo suficiente para promover a liberação de insulina (HEDESKOV, 1980). Embora haja certa discordância em relação à essa informação (MILNER *et al.*, 1971; HOFFMAN *et al.*, 1982), não há dúvidas quanto ao efeito de potencialização que esse nucleotídeo exerce sobre a secreção induzida por glicose (MALAISSE *et al.*, 1984). Tem sido sugerido que, em fetos, a baixa efetividade da glicose em promover secreção de insulina pode ser causada por uma inadequada concentração de AMPc (BURR, *et al.*, 1971; LAMBERT, *et al.*, 1971). Em nossos experimentos, a participação de eventos relacionados com o acúmulo celular de AMPc foi verificada pelo estímulo com teofilina, inibidora da fosfodiesterase (MILNER *et al.*, 1971; LAMBERT *et al.*, 1971). A Fig 6 mostra que esse sistema já está presente e atuante em fetos de

19 dias (Fig 6A), pois ocorreu um aumento significativo de secreção de insulina em relação à basal quando da estimulação por Teo. Embora, o incremento da secreção de insulina tenha sido maior no período pós-natal. Esses resultados estão de acordo com os relatados por KERVRAN & RANDON, (1980), e sugerem que a resposta fetal depende mais dessa via do que do metabolismo da glicose.

Outra importante componente de membrana que participa da amplificação da resposta secretória de insulina é a fosfolipase C (TUCH *et al.*, 1988; KELLEY *et al.*, 1994). O estudo desse sistema, cujos segundos mensageiros são inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) (BERRIDGE, 1987; LAYCHOCK, 1990) e diacilglicerol (DAG) (BELL & BURNS, 1991), possibilita uma avaliação do efeito de agentes colinérgicos sobre o pâncreas endócrino, como por exemplo a carbamilcolina. A ativação da fosfolipase C, em última análise, induz produção de IP₃ (que mobiliza Ca²⁺ estocado no retículo endoplasmático) e do DAG, responsável pela ativação da proteína kinase C. Segundo nossos resultados (Fig 8), ocorreu aumento significativo na secreção de insulina quando em presença de carbamilcolina no meio, em pâncreas provenientes de fetos de 19 e 21 dias. Isto indica que a via da fosfolipase C já está atuante no período fetal. Contudo, o incremento promovido por Cch foi mais marcante em neonatos e adultos que em fetos. Esses dados corroboram com aqueles relatados por FLETCHER & WAYS (1991), os quais verificaram o aparecimento da isoforma α da proteína quinase C, importante no estabelecimento da

Cch foi mais marcante em neonatos e adultos que em fetos. Esses dados corroboram com aqueles relatados por FLETCHER & WAYS (1991), os quais verificaram o aparecimento da isoforma α da proteína quinase C, importante no estabelecimento da segunda fase secretória, somente em ilhotas de neonatos à partir de 3 dias.

Concluindo, os resultados obtidos sugerem que o período perinatal representa uma fase crítica para a maturação de etapas envolvendo canais K^+ /ATP e a resposta modulada por AMPc, IP_3 e DAG.

6- CONCLUSÃO

No rato, o período perinatal parece representar uma fase decisiva para a maturação de eventos envolvidos com os canais de K^+ /ATP e a resposta secretória de insulina modulada por AMPc, IP_3 e DAG.

7- RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar a maturação do sistema secretor de insulina em ratos, através de um estudo temporal da resposta secretória frente à diferentes estímulos.

Para isso, fragmentos de pâncreas ($0,5$ à 1 mm^3) de fetos e neonatos e ilhotas adultas, foram incubados por 1 hora à 37°C em atmosfera de $95\%\text{ O}_2/5\%\text{ CO}_2$. As incubações foram realizadas em solução de Krebs-Ringer contendo diferentes concentrações de glicose, potássio, teofilina e carbamilcolina. Após o período de incubação, a insulina secretada no meio, bem como, a extraída dos fragmentos de pâncreas ou de ilhotas isoladas, foram medidas por radioimunoensaio, sendo a secreção expressa como percentagem do conteúdo total de insulina.

Os resultados obtidos mostraram que:

- 1- Não houve diferença significativa entre a secreção de insulina em resposta à $2,8$ e $5,6\text{ mM}$ de glicose dentro de cada grupo estudado,, sendo maior nos grupos fetais.
- 2- A melhora na resposta secretória, induzida por concentrações crescentes de glicose ou de potássio, foi mais acentuada durante o período pós-natal.
- 3- Teofilina potencializou a secreção de insulina em todos os grupos analisados, sendo que a resposta adulta foi a mais expressiva.

4- Em todas as idades estudadas, a resposta secretória de insulina obtida por 5,6 mM de glicose foi amplificada por carbamilcolina, sendo contudo, mais acentuada em neonatos e adultos.

8- ABSTRACT

The aim of this work was to study, in rats, the maturation process of the secretory response of insulin following several stimuli. For that, pieces of pancreas ($0,5-1 \text{ mm}^3$) from rat fetuses and newborns or isolated adults islets, were incubated for 1 hour at 37°C in $95\% \text{ O}_2/5\% \text{ CO}_2$ atmosphere with different concentrations of glucose, potassium, theophylline and carbamylcholine. Following the incubation, the insulin secreted into the medium and extracted from the tissues, were measured by radioimmunoassay, and were expressed as percentage of total insulin content.

The results obtained showed that:

- 1- The basal secretion of insulin in response to 2.8 or 5.6 mM of glucose was similar within each group studied. The basal insulin secretion was higher in the foetal groups compared to the other experimental groups.
- 2- The enhancement in the insulin secretory response, induced by increasing concentrations of glucose or potassium, was more pronounced in the post-natal period.
- 3- Theophylline potentiated the insulin secretion in all groups, however the adult response was the most expressive.
- 4- The insulin secretory response obtained by 5,6 mM of glucose was amplified by carbamylcholine in all ages studied, however, it was more marked in newborns and adults.

In conclusion, the perinatal period of life (19-day-old fetus and 3-day-old newborn) appears to be decisive for the maturation of events related to K^+ /ATP channels. In addition, the secretory response modulated by cyclic AMP, inositol triphosphate, and diacylglycerol, observed in neonatal and adult rats, also indicates that other components of the secretory mechanism undergo maturation.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AMMON, H.P.T.; FAHMY, A. MARK, M.; STROLIN, W.; WAHL, M.A. Failure of glucose to affected $^{86}\text{Rubidium}$ efflux and $^{45}\text{calcium}$ uptake of fetal rat pancreatic islets. *J. Physiol.*, 358: 365-72, 1985.

AMMON, H.P.T.; GLOKER, C.; WALDNER, R.G.; WAHL, M.A. Insulin release from pancreatics islets of fetal rats mediated by leucine b-BCH, tolbutamide, gibenclamide, arginine, potassium chloride and theophylline does not require stimulation of Ca^{2+} net uptake. *Cell Calcium*, 10: 441-50, 1989.

ANDERSSON, A. Synthesis of DNA in isolated pancreatic islets maintained in tissue culture. *Endocrinology*, 96 (4): 1051-4, 1975.

* Segundo 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.

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

ASHCROFT, S.J.H. Glucorreceptor mechanism and the control of insulin release and biosynthesis. *Diabetologia*, **18**: 5-15, 1980.

ASHCROFT, F.M. & ASHCROFT, S.J.H. Properties and functions of ATP-sensitive K^+ -channels. *Cellular signaling*, **2**: 197-214, 1990.

ASHCROFT, F.M.; HARRISON, D.E.; ASHCROFT, S.J.H. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic B-cells. *Nature*, **312**: 446-8, 1984.

ASPLUND, K. Dynamics of insulin release from the fetal and neonatal rat pancreas. *Eur. J. Clin. Invest.*, **3**: 338-44, 1973.

ASPLUND, K. & FREINKEL, N. Phosphate metabolism and glucose initiated efflux of phosphate ions in islets of fetal pancreas. *Diabetes*, **27**: 611-19, 1978.

- 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.
- BELL, R.M. & BURNS, D.J. Lipid activation of protein kinase C. **J. Biol. Chem.**, **266**: 4661-4, 1991.
- BERGMAN, R.N. Toward physiological understanding of glucose intolerance. **Diabetes**, **38**: 1512-27, 1989.
- BERRIDGE, M.J. Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. **Ann. Rev. Biochem.**, **56**: 159-94, 1987.
- BLACK, M.A; MEALING, G.A.R.; WHITFIELD, J.F.; SCHATZ, J.L.; BÉGIN-HEICK, N. Insulin secretion and intracellular Ca^{2+} rises in monolayer cultures of neonatal rat B-cells. **Cellular Signalling**, **6** (8): 897-904, 1994.
- BLÁZQUEZ, E.; MONTOYA, E.; QUIJADA, C.L. Relationship between insulin concentrations in plasma and pancreas of foetal and weanling rats. **J. Endocrinol.**, **48**: 553-61, 1970.
- BLISS, C.R. & SHARP, G.W.G. A critical period in the development of the insulin secretory response to glucose in fetal rat pancreas. **Life Sci.**, **55** (6): 423-7, 1994a.

BLISS, C.R. & SHARP, G.W.G. Development of glucose responsiveness from the fetal to the adult B-cell. In: *FRONTIERS of insulin secretion and pancreatic B-cell research*. Eds. P.R. FLAT, S. LENZEN. UK, Smith-Gordon, 1994b, p. 69-76.

BOSCHERO, A.C. Acoplamento excitação-secreção nas células B pancreáticas (review). *Arqu. Bras. Endocrinol. Metabol.*, 40 (3): 149-55, 1996.

BOSCHERO, A.C.; KAWAZU, S.; DUNCAN, G.; MALAISSE, W.J. Effect of glucose on K^+ handling by pancreatic islets. *Febs. Lett.*, 83: 151-4, 1977.

BOSCHERO, A.C.; BORDIN, S.; SENER, A.; MALAISSE, W.J. D-Glucose and L-leucine metabolism and neonatal and adult cultured rat pancreatic islets. *Mol. Cel. Endocrinol.*, 73: 63-71, 1990.

BOSCHERO, A.C.; TOMBACCINI, D.; CARNEIRO, E.M.; ATWATER, I.J. Differences in K^+ permeability between cultured adult and neonatal rat islets of Langerhans in response to glucose, tolbutamide, diazoxide and theophylline. *Pancreas*, 8 (1): 44-9, 1993.

- BURR, I.M.; KANAZAWA, Y.; MARLISS, E.B.; LAMBERT, A.E.
Biphasic insulin release from perifused cultured fetal rat pancreas. Effects of glucose, pyruvate and theophylline. *Diabetes*, **20**: 592-7, 1971.
- CERASI, E.; LUFT, R. Insulin response to glucose infusion in diabetic and non-diabetic monozygotic twin pairs. Genetic control of insulin response? *Acta Endocr.*, **55**: 330, 1967. apud ASPLUND, K., 1973.
- CHARLES, M.A.; FANSKA, R.; SCHMID, F.G.; FORSHAM, P.H.; GRODSKY, G.M. Adenosine 3',5'-monophosphate in pancreatic islets: Glucose-induced insulin release. *Science*, **179**: 561-71, 1973.
- COOK, D.L. & HALES, C.N. Intracellular ATP directly blocks K⁺-channels in pancreatic B-cells. *Nature*, **311**: 271-3, 1984.
- 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.
- CURRY, D.L.; BENNETT, L.L.; GRODSKY, G.M. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology*, **83**: 572-84, 1968.

- DUNNE, M.J. & PETERSEN, O.H. Intracellular ADP activates K⁺-channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line. *FEBS Lett.*, **208**: 59-62, 1986.
- FLETCHER, D.J. & WAYS, D.K. Age-dependent expression of protein kinase C isoforms in rat islets. *Diabetes*, **40**: 1496-503, 1991.
- FORNIER, L.; WHITFIELD, J.F.; XIANG, H.; SCHWARTZ, J-L.; BÉGIN-HEICK, N. K⁺-channel and α_2 -adrenergic effects on glucose-induced [Ca²⁺]_i surges: aberrant behavior in ob/ob mice. *Am. J. Physiol.*, **264** (6): 1458C-65, 1993.
- FREIE, H.M.P.; PASMA, A.; BOUMAN, P.R. Quantitative analysis of pancreatic islets development and insulin storage in the foetal and newborn rat. *Acta Endocrinol.*, **80** (4): 657-66, 1975.
- FREINKEL, N.; LEWIS, N.J.; JOHNSON, R.; SWENNE, I.; BONE, A.; HELLERSTROM, C. Differential effects of age versus glycaemic stimulation on the maturation of insulin stimulus-secretion coupling during culture of fetal rat islet. *Diabetes*, **33**: 1028-38, 1984.
- GILON, P & HENQUIN, J.C. Influence of membrane potential changes on cytoplasmic Ca²⁺ concentration in an electrically

excitable cell, the insulin-secreting pancreatic B-cells. **J. Biol. Chem**, **267**: 20713-20, 1992.

GRILL, V. & CERASI, E. Stimulation by D-glucose of cyclic adenosine 3'5'-monophosphate accumulation and insulin release in isolated pancreatic islets of the rat. **J. Biol. Chem.**, **249**: 4196-201, 1974.

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.

HANKS, J.H. & WALLACE, P.B. Regulation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, **71**: 196-200, 1949,. apud HERCHUELZ, A., 1980.

HEDESKOV, C.J. Mechanism of glucose-induced insulin secretion. **Physiol. Rev**, **60** (2): 442-509, 1980.

HEIZE, E. & STEINKE, J. Glucose metabolism of isolated pancreatic islets: difference between fetal, newborn and adult rats. **Endocrinology**, **88**: 1259-63, 1971.

HEIZE, E. & STEINKE, J. Insulin secretion during development, response of isolated pancreatic islets of fetal, newborn and

adult rats to theophylline and arginine. **Horm. Metab. Res.**, **4**: 234-6, 1972.

HELLERSTROM, C. & SWENNE, I. Functional maturation and proliferation of fetal pancreatic B-cells. **Diabetes**, **40** (suppl.2): 89-93, 1991

HENQUIN, J.C. Relative importance of extracellular and intracellular calcium for the two phases of glucose-stimulated insulin release studies with theophylline. **Endocrinology**, **102** (3): 723-30, 1978.

HERCHUELZ, A. **Regulation des flux calciques dans les ilots des Langerhans**. Bruxelles, 1980, 336p. (Tese - Univ. Libre de bruxeles).

HOFFMAN, L.; MANDEL, T.E.; CARTER, W.M.; KOULMANDDA, M.; MARTIN, F.I.R. Insulin secretion by fetal human pancreas in organ culture. **Diabetologia**, **23** (5): 426-30, 1982.

HOLE, R.L.; PIAN-SMITH, M.C.M.; SHARP, G.W.G. Development of the biphasic response to glucose in fetal and neonatal rat pancreas. **Am. J. Physiol.**, **254**: 167E -74, 1988.

KELLEY, G.G.; ZAWALICH, K.C.; ZAWALICH, W.S. Calcium and a mitochondrial signal interact to stimulate phosphoinositide hydrolysis and insulin secretion in rat islets. *Endocrinology*, **134** (4): 1648-54, 1994.

KERVAN, A. & GIRARD, J.R. Glucose-induced increase of plasma insulin in the rat foetus *in utero*. *J. Endocrinol.*, **62**: 545-51, 1974.

KERVAN, A. & RANDON, J. Development of insulin release by foetal rat pancreas *in vitro*: effects of glucose, amino-acids, and theophylline. *Diabetes*, **29**: 673-8, 1980.

KOSAKA, K.; HAGURA, R.; KUZUYA, T. Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes. *Diabetes*, **26**: 944-52, 1977.

KREBS, H.A. & HENSELETT, k. Untersuchungen uber die Hanstoffbildung in Tierkoper. *Hoppe-Seyler 's Z. Physiol.-Chem.*, **210**: 33-66, 1932. apud HERCHUELZ, A., 1980.

LAMBERT, A.E.; LAMBERT, A.E.; JEANRENAUD, B.; ROUILLER, C. Organo-culture de pancréas foetal de rat. Etude morphologique et libération d'insuline *in vitro*.

LAMBERT, A.E.; KANAZAWA, Y.; BURR, I.M.; LAMBERT, A.E.; RENOLD, A.E. On the role of cyclic AMP in insulin release. Overall effects in cultured fetal rat pancreas. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **185**: 232-44, 1971.

LAYCHOCK, S.G. Glucose metabolism, second messengers and insulin secretion. *Life Sci.*, **47**: 2307-16, 1990.

MALAISSE, W.J.; GARCIA-MORALES, P.; DUFRANE, S.P.; SENER, A.; VALVERDE, I. Forskolin-induced activation of adenylate cyclase cyclic adenosine, monophosphate production and insulin release in rat pancreas islets. *Endocrinology*, **115** (5): 2015-20, 1984.

MATSCHINSKY, F.M.; GHOSH, A.K.; MEGLASSON, M.D.; PRENTKI, M.; JUNE, V.; VON ALLMAN, D. J. *Biol. Chem.*, **261**: 14057-61, 1986. apud LAYCHOCK, S.G., 1990.

MILNER, R.D.G.; BARSON, A.J.; ASHWORTH, M.A. Human fetal pancreatic secretion in response to ionic and other stimuli. *J. Endocrinol*, **51**: 323-32, 1971.

MISLER, S.; BARNETT, D.W.; PRESSEL, D.M.; GILLIS, K.D.; SCHARP, D.W.; FALKE, L.C. Stimulus-secretion coupling in B-cells of transplantable human islets of Langerhans evidence for a critical role for Ca^{2+} entry. *Diabetes*, **41**: 662-70, 1992.

PETTITT, D.J.; ALECK, K.A.; BAIRD, H.R.; CARRAHER, M.J.; BENNETT, P.H.; KROWLER, W.C. Congenital susceptibility to NIDDM: role of intrauterine environment. **Diabetes**, **37**: 622-28, 1988.

PRENTKI, M. & MATSCHINSKY, F.M. Ca^{2+} , AMPc , and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. **Physiol. Rev.**, **67**: 1185-248, 1987.

RORSMAN, P.; BOKVIST, K.; ARKHAMMAR, P.; BERGGREN, P-O.; HELLERSTROM, C.; NILSSON, T.; WELSH, M.; WELSH, N.. Defective regulation of glucose and ATP-regulated K channels results in disturbed glucose sensitivity in fetal B-cells. **Diabetologia**, **31 (7)**: A 424, 1988. p.537A.

RORSMAN, P.; 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. **Procl. Nat. Acad. Sci. USA.**, **86**: 4505-9, 1989.

SCOTT, A.M.; ATWATER, I.; ROJAS, E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell

membrane potential in single mouse islets of Langerhans. **Diabetologia**, 21 (5): 470-5, 1981.

SMITH, P.A.; ASCHCROFT, F.M.; RORSMAN, P. Simultaneous recordings of glucose dependent electrical activity and ATP-regulated K⁺ current in isolated mouse pancreatic B-cells. **FEBS Lett.**, 261: 187-90, 1990.

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

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.

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 (2): 121-3, 1979.

TUCH, B.E.; PALAVIDIS, Z.; TURTLE, J.R. Activators of protein kinase C stimulate insulin secretion from the human fetal pancreas. **Pancreas**, 3: 675-80, 1988.

WAHL, M.A.; WALDNER, R.G.; AMMON, H.T.P. Potassium permeability of fetal rat pancreatic islets abnormal sensitivity to glucose. *Life Sciences*, **51**: 1631-37, 1992.

WOLLHEIM, C.B. & SHARP, G.W.G. Regulation of insulin release by calcium. *Physiol. Rev.*, **61** (4): 914-73, 1981.

APÊNDICE

Tabela - Secreção de insulina (% do conteúdo total) por fragmentos de pâncreas fetais de 19 e 21 dias, neonatais de 3 dias e ilhotas isoladas de ratos adultos com 90 dias, submetidos à estímulo com glicose (G), teofilina (Teo), carbamilcolina (Cch) e potássio (K⁺).

ESTÍMULO	IDADE			
	19 DIAS	21 DIAS	3 DIAS	90 DIAS
G 2,8 mM	0,66±0,13 (10)	0,71±0,14 (11)	0,38±0,07(8)	0,88±0,32 (5)
G 5,6 mM	0,67±0,11 (10)	0,91±0,1 (14)	0,38±0,03 (9)	0,89±0,30 (9)
G 8,3 mM	0,89±0,14 (8)	1,16±0,09 (8)*	0,70±0,17 (11)*	1,83±0,22 (5)*
G 16,7 mM	0,90±0,13 (6)	1,26±0,13 (13)*	1,06±0,23 (6)*	2,62±0,15 (4)*
Teo 5 mM	1,2±0,23 (6)*	1,60±0,29 (6)*	1,11±0,32 (9)*	3,75±0,44 (4)*
Cch 200µM	1,4±0,41 (5)*	1,61±0,24 (6)*	1,23±0,35 (9)*	4,43±0,31 (5)*
G 5,6 mM	1,94±0,11 (5)	1,35±0,17 (8)	1,68±0,2 (5)	1,77±0,30 (9)
K ⁺ 30 mM	2,08±0,44 (4)	1,81±0,33 (4)	2,41±0,43 (4)**	3,56±0,18 (5)**

Estão representados a média ± EP. Os números entre parenteses indicam o valor de n.

*p<0,05 - teste de Krushkal Wallis seguido por comparações múltiplas
 ** p<0,05- teste de Wilcoxon