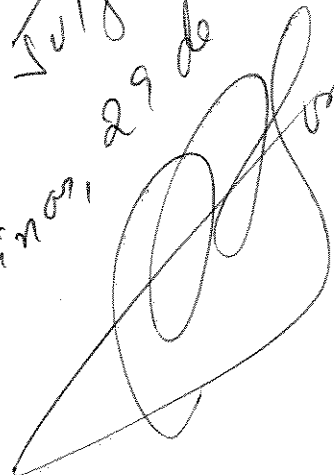


- or redação final de Tese defendida pelo
candidato Francisco Langone e aprovada
pela Comissão Julgadora, 29 de setembro de 1986



EFEITO DO TIOPENTAL SOBRE A ATIVIDADE ELÉTRICA
DA CÉLULA BETA E O EFLUXO DE ^{45}Ca EM ILHOTAS
DE LANGERHANS.

1986

FRANCESCO LANGONE

EFEITO DO TIOPENTAL SOBRE A ATIVIDADE ELÉTRICA DA CÉLULA
BETA E O EFLUXO DE ^{45}Ca EM ILHOTAS DE LANGERHANS.

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biológicas - área de
Concentração em Fisiologia.

ORIENTADOR: Dr. Antonio Ari Gonçalves

CAMPINAS

-1986-

Aos meus queridíssimos pais

ROCCO e

CAROLINA,

que de fadigas, lutas e amor
muito sabem, de coração,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Antonio Ari Gonçalves, pela amizade, ensinamentos, orientação segura e dedicada no decorrer da elaboração deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero, pela amizade, apoio constante e criteriosas sugestões na elaboração dos experimentos - realizados em seu laboratório.
- Ao Prof. Antonio Celso Ramalho, pelo carinho, respeito e confiança depositada no nosso trabalho.
- Ao Prof. Dr. Ernesto José Dottaviano, pela amizade, ensinamen-
tos e incentivos constantes ao longo de nossa carreira univer-
sitária.
- Ao Prof. Miguel Arcanjo Areas, pelo incentivo e inseparável com
parheirismo nas nossas lides acadêmicas.
- Ao Prof. Dr. Pedro Paulo Barros, por estes anos de dedicada co
laboração na carreira docente, pela sincera amizade e aguerri
do espírito de luta com que nos enriqueceu.
- Ao Prof. Dr. Rui Errerias Maciel, pelo exemplo e experiência -
didática que nos transmitiu.
- Ao Prof. Dr. Ângelo Rafael Carpinelli pelo estímulo e suges-
tões apresentadas durante o exame de pré-banca.

- À Profa. Olga Narcisa Petroni Paschoini e Prof. Wilson Roberto Paschoini, pela amizade e colaboração nas atividades didáticas desenvolvidas no Departamento de Ciências Fisiológicas da PUCCAMP.
- Ao Prof. Dr. Armando Mancio de Camargo, pela compreensão e colaboração na execução deste trabalho.
- À Profa. Dra. Vilma Cloris de Carvalho, pelo entusiasmo e vibração, com que gratamente nos contagiou, nestes anos de convívio universitário.
- Aos queridos colegas, Prof. Ademir de Marco, Prof. Humberto Santos Neto, Prof. Dr. Luiz Alberto Magna e Prof. Roberto de Oliveira Levy, pelas sempre prontas e criteriosas sugestões que nos deram na elaboração desta dissertação.
- À Profa. Oneida Dias de Carvalho e ao Prof. Everardo Magalhães Carneiro, pelo auxílio prestado na execução dos experimentos.
- Ao Prof. Sidney Ragazzi, pela orientação prestada no tratamento estatístico.
- À Sra. Silvia Helena Burghi Kallaf, à Sra. Inez Zenaide Miotti Valim, à Sra. Eunice Chirman Andreoli e à Srta. Maria Elídia dos Santos, pelos pacientes serviços de datilografia.
- Àqueles que nos incentivaram e apoiaram, mas que involuntariamente omitimos seus nomes,

NOSSA GRATIDÃO

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. Considerações Gerais	1
2. Participação do K^+ na Secreção de Insulina	3
3. Participação do Ca^{2+} na Secreção de Insulina	6
4. Atividade Elétrica da Célula Beta	9
4.1. Atividade elétrica e secreção de insulina	9
4.2. Características da atividade elétrica das células betas, induzida por glicose	10
4.3. Participação dos íons na atividade elétrica da célula beta	14
5. Compostos Barbitúricos	18
5.1. Características gerais	18
5.2. Efeitos dos barbitúricos sobre o sistema nervoso	19
5.2.1. Efeitos dos barbitúricos sobre a liberação de neurotransmissores	20
5.2.2. Efeitos pós-sinápticos dos barbitúricos	22
5.2.3. Efeitos dos barbitúricos sobre a condução do impulso nervoso	24
5.2.4. Efeitos dos barbitúricos sobre a porção lipídica da membrana plasmática	25
6. Efeitos dos Barbitúricos sobre a Célula Beta do Pâncreas	26
PROPOSIÇÃO DO TRABALHO	29

MATERIAL E MÉTODOS	30
1. Eletrofisiologia	30
1.1. Animais	30
1.2. Métodos	30
1.2.1. Microdissecção das ilhotas de Langerhans	30
1.2.2. Sistema de perfusão das ilhotas de Langerhans	31
1.2.3. Registros eletrofisiológicos na célula beta	32
2. Efluxo de ^{45}Ca	33
2.1. Animais	33
2.2. Métodos	36
2.2.1. Isolamento de ilhotas de Langerhans	36
2.2.2. Marcação de ilhotas de Langerhans com ^{45}Ca	37
2.2.3. Perfusão das ilhotas de Langerhans	37
3. Radioisótopos e Reagentes	40
4. Soluções	40
5. Tratamento Estatístico	42
RESULTADOS	43
1. Caracterização da Atividade Elétrica da Célula Beta de Ilhota Pancreática de Camundongo Induzida por 11,1 mM de Glicose	43
2. Efeito do Tiopental sobre o Potencial de Membrana da Célula Beta	51
3. Efeito do Tiopental sobre o Potencial de Membrana da Célula Beta na Presença de Concentrações Sublimiares de Glicose	55

4. Efeito do Tiopental sobre a Atividade Elétrica da Célula Beta Induzida por 11,1 mM Glicose	63
5. Efeito do 2,4-Dinitrofenol (DNP) sobre a Atividade Elétrica da Célula Beta Induzida por 11,1 mM de Glicose e 0,5 mM de Tiopental	63
6. Efeito do Tiopental sobre a Resistência da Membrana de Célula Beta à Injeção de Corrente	69
7. Efeito de 0,5 e 2,0 mM de Tiopental sobre o Efluxo de ^{45}Ca de ilhotas de Langerhans Isoladas de Ratos	72
DISCUSSÃO.....	83
RESUMO E CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

I. INTRODUÇÃO

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os conceitos propostos por Claude Bernard sobre meio interno e a necessária constância deste para a sobrevivência dos organismos num meio extremamente variável, foram um marco decisivo para o desenvolvimento da fisiologia moderna.

Particularmente, suas descobertas sobre a existência e o funcionamento de um sistema glicorregulador nos animais, têm sido objeto de estudo de inúmeros pesquisadores nas últimas décadas.

A insulina tem papel singular no processo homeostático da glicose. Esse hormônio tem a função de reduzir a concentração da glicose sanguínea, promovendo a sua captação por diversos tecidos e inibindo sua liberação pelo fígado.

A concentração de insulina no plasma é determinada exclusivamente por sua taxa de secreção, e não por seu catabolismo em outros tecidos (CAHILL, 1976 apud HEDESKOV, 1980). Portanto, é necessário que as células beta sejam altamente sensíveis às variações da glicemia. Consequentemente, o estudo dos eventos relacionados ao acoplamento estímulo-secreção de insulina, reveste-se de particular importância para a compreensão da pronta e eficaz glicorregulação, realizada por esse hormônio. A importância destes estudos pode ser realçada ainda mais, se tivermos presente que sérios distúrbios observados no diabetes melito, ou em síndromes hipoglicêmicas, estão relacionados à perda de sensibilidade das células beta em detectar as variações do estado glicêmico do indivíduo (HEDESKOV,

1980; ATWATER, ROSÁRIO, ROJAS, 1983; MALAISSE, 1984).

O estudo do mecanismo de secreção de insulina pe la célula beta, tem enfrentado uma série de dificuldades técni cas relacionadas com a pequena massa tecidual das ilhotas de Langerhans, com a posição estratégica ocupada por estas no pân creas e com a presença de outros tipos de células secretoras nesses microórgãos. Não obstante, progressos significativos tem si do alcançados nos estudos "in vitro", a partir do desenvolvi - mento das técnicas de isolamento das ilhotas de Langerhans e de radioimunoensaio (para revisão veja HEDESKOV, 1980).

Sabe-se hoje que embora o mais potente estímulo fisiológico para a secreção de insulina no homem, seja dado pe la glicose, ela também pode ser induzida por outros substratos energéticos, tais como aminoácidos, ácidos graxos e corpos ce tônicos. Além disso, tem sido atribuída aos hormônios do tubo digestivo, e a neurotransmissores, como acetilcolina e cateco laminas uma função moduladora da secreção (GERICH, CHARLES & GRODSKY, 1976).

Ainda, para a perfeita regulação do mecanismo de secreção, tem sido proposta também a participação de um contro le parácrino, exercido pela própria insulina, pelo glucagon e pela somatostatina, e de um controle através de comunicações intercelulares, via "gap junctions", nas ilhotas de Langerhans (UNGER, DOBBS & ORCI, 1978; EDDLESTONE, GONÇALVES, BANGHAN & ROJAS, 1984; MEDA, ATWATER, GONÇALVES, BANGHAN, ORCI & ROJAS, 1984; SANTOS, MEDA & ROJAS, 1986).

No que tange à secreção de insulina induzida por glicose, sabe-se que o aumento da concentração deste secretago go no meio extracelular provoca uma série de alterações na fi siologia da célula beta, que culmina com a liberação do hormô-

nio. Tais alterações envolvem: a metabolização da glicose, o consumo de O_2 , o estado redox, a produção de calor, o pH intracelular, a biossíntese de proteínas, a formação de "gap junctions", a produção de AMP cíclico, o "turnover" de fosfolípidos, a fosforilação e desfosforilação de proteínas, os fluxos de certos íons e a atividade elétrica na célula beta (HEDSKOV, 1980; BOSCHERO, DELATTRE & GONÇALVES, 1984; MALAISSE, 1984).

Entretanto, ainda é motivo de controvérsia qual é a sequência cronológica desses eventos e quais são as relações de causa e efeito existentes entre eles, que levam à ativação do sistema efetor, formado pelos microtúbulos, microfilamentos e pela própria membrana celular.

2. PARTICIPAÇÃO DO K^+ NA SECREÇÃO DE INSULINA

Desde a década de 1960 ficou demonstrada a importância da composição iônica do meio extracelular para o desencadeamento do processo de secreção de insulina. GRODSKY & BENNET (1966), perfundindo pâncreas de rato na ausência de glicose, verificaram que a elevação da concentração de K^+ extracelular aumentava a secreção de insulina. HALES & MILNER (1968a, b) estudando o efeito de meios com diferentes composições iônicas sobre a secreção de insulina, em fragmentos isolados de pâncreas de coelho, confirmaram os resultados de GRODSKY & BENNET (1966). Observaram ainda, que o máximo de estimulação da secreção ocorreu em presença de 55,5 mM de K^+ .

HOWELL & TAYLOR (1968), utilizando ilhotas isoladas de coelho, estudaram o influxo e o efluxo de K^+ na célula

beta (utilizando ^{42}K como traçador) durante a secreção de insulina estimulada por glicose e/ou tolbutamida. Verificaram que ocorreu um aumento da incorporação do radioisótopo pela célula beta, quando a concentração de glicose foi elevada de 2,8 mM para 14,0 mM. Porém o mesmo não foi observado quando foram adicionados 0,2 mg/ml de tolbutamida a um meio contendo 2,8 mM de glicose. Sugeriram então, que o aumento de incorporação de ^{42}K pelas células beta, observado em presença de 14 mM de glicose, seria uma consequência do metabolismo do secretagogo, mas sem estar relacionada diretamente à secreção de insulina.

As observações de SEHLIN & TÄLJEDAL (1974, 1975), sobre a retenção de maiores quantidades de K^+ (usando ^{86}Rb como traçador) pelas células beta em presença de glicose, levou-os a sugerir que esta retenção contribuiria para a despolarização da membrana. Esta é uma importante etapa para a secreção de insulina (MEISSNER & SCHMELZ, 1974; BOSCHERO et alii, 1984).

BOSCHERO, KAWAZU, DUNCAN & MALAISSE (1977) e HENQUIN (1978) mostraram que a retenção de K^+ provocada pela glicose em ilhotas isoladas de rato, era acompanhada da redução do efluxo deste íon. Este evento ocorreu de uma maneira rápida e duradoura, sendo também rapidamente revertido pela retirada da glicose do meio perfusor. BOSCHERO et alii (1977) verificaram também que a redução do efluxo de K^+ ocorria tanto na presença quanto na ausência de Na^+ e /ou Ca^{2+} . Tal observação levou-os a propor que a glicose possui uma ação bloqueadora da permeabilidade ao K^+ , na membrana da célula beta.

A correlação existente entre redução do efluxo de K^+ e secreção de insulina, em presença de diferentes con

centrações de glicose, foi evidenciado por HENQUIN (1978) e MALAISSE, BOSCHERO, KAWAZU & HUTTON (1978a). Corroborando estas observações, CARPINELLI & MALAISSE (1980) mostraram que além da glicose, outras substâncias tais como tetraetilamônia (TEA) e quinina, bloqueadores da PK(V) e da PK(Ca²⁺)_i, potencializam a secreção de insulina.

Por outro lado, BOSCHERO, KAWAZU, SENER, HERCHUELZ & MALAISSE (1979) observaram que a valinomicina, conhecido ionóforo de K⁺, aumentou o efluxo deste íon na célula beta e inibiu completamente a secreção de insulina induzida por 16,7 mM de glicose.

Ainda é motivo de controvérsia, o mecanismo exato pelo qual a glicose afeta a permeabilidade ao K⁺ e induz a secreção de insulina. Entretanto diversos autores têm demonstrado ser necessária a metabolização do secretagogo, para que tais efeitos sejam produzidos (ASHCROFT, 1976; MALAISSE, SENER, KOSEK & HERCHUELZ, 1976b; BOSCHERO & MALAISSE, 1979; HENQUIN, 1980).

TALJEDAL (1981) sugeriu que as alterações da permeabilidade da célula beta ao K⁺ dependeriam da redução de grupos S-S de proteínas, do tipo tiorredoxinas, existentes na membrana. Este evento por sua vez, dependeria da doação de H⁺ pelo NAD(P)H₂ gerado durante a metabolização da glicose. Neste sentido PACE, TARVIN & SMITH (1983) propuseram um modelo onde a variação do pH intracelular, decorrente do processo glicolítico, seria responsável pela oscilação da permeabilidade ao K⁺ e, consequentemente, pelas características da atividade elétrica padrão da célula beta.

Recentemente, reforçando a hipótese da necessidade da

PK(V): permeabilidade ao K⁺ controlada pelo valor do potencial de membrana.

PK(Ca²⁺)_i: permeabilidade ao K⁺ controlada pela concentração citosólica do cálcio.

metabolização da glicose para o controle da permeabilidade ao K^+ , ASHCROFT, HARRISON & ASHCROFT (1984) e COOK & HALES (1984) evidenciaram a existência de uma permeabilidade ao K^+ bloqueável por ATP intracelular.

3. PARTICIPAÇÃO DO Ca^{2+} NA SECREÇÃO DE INSULINA

O íon cálcio desempenha importante papel regulador, em grande número de mecanismos fisiológicos celulares. Dentre estes, destacam-se os processos de acoplamento excitação contração em células musculares e os processos de acoplamento estímulo-secreção, em neurônios e células glandulares (PETERSEN, 1980).

Os primeiros trabalhos "in vitro" que evidenciaram a importância do Ca^{2+} na secreção de insulina, foram realizados por GRODSKY & BENNETT em 1966. Estes autores observaram que a ausência de Ca^{2+} no meio extracelular, inibiu a secreção de insulina induzida por glicose, o que foi confirmado posteriormente por outros autores (MILNER & HALES, 1967; MALAISSE, BRISSON & MALAISSE-LAGAE, 1970; MALAISSE, BRISSON & BIRD, 1973).

Comprovação inequívoca da importância do Ca^{2+} extracelular foi obtida por DEVIS; SOMERS & MALAISSE em 1977, ao demonstrarem que altas concentrações de Ca^{2+} (acima de 10 mM) estimulam "perose" a secreção de insulina de ilhotas isoladas de rato.

Há evidências que permitem supor que nas células beta, o Ca^{2+} participe numa etapa final do processo secretório. Essa participação diz respeito à redução da carga elétrica na região subjacente à membrana plasmática, facilitando a fusão das vesículas com esta, e/ou ativando as proteínas contráteis dos microtúbulos e microfilamentos, que são os responsáveis pela movimentação dos grânulos no citoplasma (MALAISSE, MALAISSE-LAGAE, WALKER & LACY, 1971; PIPELEERS, MARICHAL & MALAISSE, 1973; DAHL & GRATZL, 1976).

A análise da distribuição do cálcio pelos diferentes compartimentos da célula beta, realizada através de diversas técnicas, mostrou que os principais depósitos deste íon localizam-se nas mitocôndrias, retículo endoplasmático, vesículas secretórias e membrana plasmática (WOLLHEIM & SHARP, 1981). PRENTKI & WOLLHEIM (1984), analisando a capacidade de organelas isoladas de insulinomas de rato em tamponarem o Ca^{2+} , sugeriram que as mitocôndrias e o retículo endoplasmático, controlam a curto prazo, a concentração de Ca^{2+} citosólico.

Em 1971, MALAISSE-LAGAE e MALAISSE observaram que concentrações insulinoatrópicas de glicose, promovem incorporação de Ca^{2+} pela célula beta. Observaram também que a relação entre a incorporação do íon e a concentração de glicose é sigmoidal, semelhante à que se verifica entre secreção de insulina e diferentes concentrações desse secretagogo.

Demonstrou-se ainda, que a secreção de insulina é estimulada por ionóforos do Ca^{2+} , do tipo A-23187 e X-537A, (HELLMAN, 1975; KARL, ZAWALICH, FERRENDELLI & MATSCHINSKY, 1975) e é inibida, por antagonistas inorgânicos e orgânicos desse íon, tais como: La^{3+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Verapamil, D-600, nifedipina e antibióticos aminoglicosídicos (HENQUIN & LAMBERT, 1975; HELLMAN; SEHLIN & TALJEDAL, 1976a; MALAISSE, DEVIS, HERCHUELS, SENER & SOMERS, 1976a; MALAISSE & BOSCHERO, 1977; BOSCHERO, DELATTRE & SANTOS, 1981; DELATTRE, SANTOS & BOSCHERO, 1982).

É consenso entre os autores, que a finalidade do acúmulo de cálcio na célula beta, induzido por glicose, é de elevar a concentração intracelular desse íon aos níveis necessários à efetuação da secreção de insulina (nesse sentido revisões foram apresentadas por HEDESKOV, 1980 e WOLL-

HEIM & SHARP, 1981). Para tanto, este secretagogo deve promover alterações na dinâmica dos mecanismos celulares, responsáveis pela homeostase do cálcio (MALAISSE, HERCHUELZ, DEVIS, SOMERS, BOSCHERO, HUTTON, KAWAZU, SENER, ATWATER, DUNCAN, RIBALLET, ROJAS, 1978b; TÄLJEDAL, 1981; PRENTKI & WOLLHEIM, 1984).

Tem sido proposto que alterações tais como: aumento da afinidade ionoforética da membrana para o cálcio, inibição do contratransporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e ativação de uma permeabilidade ao Ca^{2+} voltagem-sensível, observados durante a secreção de insulina, são decorrências diretas do metabolismo da glicose (MALAISSE et alii, 1973; HELLMAN, SEHLIN & TÄLJEDAL, 1976b; MALAISSE et alii, 1978b).

Além disso, vem se firmando nos últimos anos, a hipótese de uma ação coadjuvante e moduladora do AMP cíclico, Calmodulina e Fosfoinositol, no aumento do cálcio citosólico e na secreção de insulina induzida por glicose (MALAISSE & MALAISSE-LAGAE, 1984; VALVERDE & MALAISSE, 1984; BEST, DUNLOP & MALAISSE, 1984; HARRISON, ASHCROFT, CHRISTIE & LORD, 1984).

Estudando o efluxo de ^{45}Ca em ilhotas isoladas e perfundidas HERCHUELZ (1980), mostrou que a glicose em concentrações sublimares induziu redução do efluxo. Entretanto, em concentrações limiaries ou supralimiaries, a glicose promove um efeito bifásico, isto é, após aproximadamente 60 segundos da introdução da glicose, observa-se uma queda brusca do efluxo, seguida após poucos minutos, de uma elevação igualmente rápida (MALAISSE et alii, 1973; HERCHUELZ, 1980).

Considerando o padrão bifásico da secreção de insulina e a correspondência temporal entre a dinâmica da captação e efluxo de ^{45}Ca , induzidos por glicose na célula beta, WOLLHEIM, KIKUCHI, RENOLD & SHARP (1978), propuseram que a pri

meira fase de secreção seja ativada por Ca^{2+} prontamente disponível no citosol, enquanto que a segunda fase, depende do Ca^{2+} mobilizado dos estoques subcelulares e daquele proveniente do meio extracelular.

4. ATIVIDADE ELÉTRICA DA CÉLULA BETA

4.1. Atividade Elétrica e Secreção de Insulina.

Sabe-se que a distribuição de íons através da membrana das células, gera uma diferença de potencial, cujo valor é função da permeabilidade relativa de cada íon. Variações deste potencial de membrana, estão associados a funções específicas das células, tal como se pode observar em fibras musculares, fibras nervosas e células glandulares (PETERSEN, 1980; PACE, 1984).

As observações relativas à dependência iônica do mecanismo de secreção de insulina, levaram a suspeitar que as primeiras etapas do acoplamento estímulo-secreção, poderiam envolver alterações da permeabilidade iônica da célula beta e consequentemente de seu potencial de membrana.

DEAN & MATTHEWS (1968), através da técnica de registro intracelular com microeletrodos ultrafinos, observaram pela primeira vez variações características de potencial de membrana, induzidas por glicose, em células beta de ilhotas isoladas de pâncreas de camundongo. A hipótese de uma íntima relação entre o fenômeno elétrico e o fenômeno secretor, foi reforçada ao se verificar que o primeiro só ocorre em presença de concentrações insulinoatrópicas de glicose, isto é, acima de 5,6 mM (DEAN & MATTHEWS, 1968; DEAN & MATTHEWS, 1970; PACE & PRICE, 1972; MEISSNER & SCHMELZ, 1974).

MEISSNER & ATWATER (1976), comparando a cinética da atividade elétrica das células beta, induzida por glicose e por glibenclamida, com a cinética da secreção de insulina induzida por estes secretagogos, relatada por outros autores, encontraram sugestivas evidências de uma direta correlação temporal entre os dois fenômenos. Recentemente, tais evidências foram confirmadas, através de registros simultâneos da atividade elétrica e da secreção de insulina, induzidas por glicose, numa mesma ilhota isolada de camundongo (SCOTT, ATWATER & ROJAS, 1981; SCOTT, ROSÁRIO & ATWATER, 1983; SCOTT, DAWSON & GONÇALVES, 1985).

Vários pesquisadores tem demonstrado, que outros secretagogos da insulina tais como: gliceraldeído, leucina, arginina, cetoisocaproato, 3-fenilpiruvato e tolbutamida, potencializam a atividade elétrica provocada por glicose, ou induzem uma atividade elétrica similar em células beta (DEAN, MATTHEWS & SAKAMOTO, 1975; HUTTON, SENER, HERCHUELZ, ATWATER, KAWAZU, BOSCHERO, SOMERS, DEVIS, MALAISSE, 1980; HENQUIN & MEISSNER, 1981, 1982).

4.2. Características da atividade elétrica das células beta, induzida por glicose.

A célula beta, na ausência ou em presença de concentrações sublimiares de glicose para a secreção de insulina, apresenta um potencial de membrana estável em torno de -60 a -70 mV (ATWATER, RIBALET & ROJAS, 1978; MEISSNER, HENQUIN & PREISLER, 1978). À súbita elevação da concentração da glicose a valores insulinoatrópicos (acima de 5,6 mM), a célula passa a exibir uma atividade elétrica de natureza bifásica, anã-

loga àquela observada na secreção de insulina (MEISSNER & PREISSLER, 1979; ATWATER, 1980a; SCOTT et alii, 1981). Esta atividade caracteriza-se na sua primeira fase, por uma despolarização lenta e gradual (5-10 mV em cerca de 1 minuto após a adição de 10 mM de glicose), seguida de uma despolarização rápida até um potencial de aproximadamente -45 mV, a partir do qual são deflagrados sucessivos potenciais de ação. Após aproximadamente 1 minuto, esta atividade cessa e tem lugar uma repolarização de 5 a 10 mV, que é seguida da geração de sucessivas ondas lentas, às quais se superpõem surtos de potenciais de ação ("bursts"). Este padrão de atividade, caracteriza a segunda fase da atividade elétrica da célula beta, que persiste enquanto a glicose estiver presente. A análise da segunda fase revela que cada onda lenta é constituída de uma despolarização de poucos milivolts, até um potencial limiar (semelhante aos pré-potenciais cardíacos). A partir desse segue-se uma despolarização rápida até um potencial em platô, cujo valor varia entre -40 e -35 mV (fase ativa). Os potenciais de ação superpostos ao platô, apresentam amplitude e duração variáveis entre 3 e 30 mV e entre 50 e 150 ms, respectivamente. Sua frequência, elevada no início, decai exponencialmente à medida que o platô se aproxima do seu final. O final do platô é determinado, por uma repolarização rápida até um potencial ligeiramente mais negativo que o potencial limiar. Entre duas ondas lentas sucessivas, ocorre um período no qual o potencial de membrana permanece estável (-50 a -45 mV) sendo denominado fase silente (MEISSNER & PREISSLER, 1979; ATWATER, 1980a; BOSCHERO et alii, 1984).

Tem se verificado, que à medida que a concentração da glicose é aumentada, a partir do seu valor limiar, a du

ração da fase ativa também aumenta e a fase silente diminui. Sendo que, em concentrações de glicose acima de 16,7 mM, a célula permanece despolarizada ao nível do potencial do platô , disparando continuamente potenciais de ação (BEIGELMAN, RIBALET & ATWATER, 1977; MEISSNER & PREISSLER, 1979; ATWATER, 1980a; BOSCHERO et alii, 1984).

A duração do período de platô, em função da concentração externa de glicose, obedece uma curva sigmoideal, semelhante à curva dose-resposta da secreção de insulina induzida por glicose. Entretanto, cumpre salientar que a amplitude dos potenciais de ação, não sofre mudanças com o aumento da concentração do secretagogo (MEISSNER, 1976a; MEISSNER & ATWATER, 1976; MEISSNER & PREISSLER, 1979; ATWATER, 1980a).

Fato importante, também, é que o padrão da atividade elétrica induzido por glicose, no que diz respeito à frequência de ondas lentas e dos potenciais de ação, é igual em todas as células beta de uma mesma ilhota. Entretanto entre células beta de ilhotas diferentes, o ritmo da atividade pode diferir (MEDA et alii, 1984).

Paralelamente às variações de potencial, a glicose induz também alterações no valor da resistência elétrica da membrana. Embora os valores absolutos registrados por diferentes autores, apresentem certa variação, tem-se verificado que no decorrer da atividade elétrica induzida por 11,1 mM de glicose, a resistência é significativamente mais elevada que na ausência do secretagogo. Entretanto, ocorrem oscilações que acompanham as flutuações do potencial de membrana (ATWATER, DAWSON, RIBALET & ROJAS, 1979a; RIBALET & BEIGELMAN, 1979; ATWATER, GONÇALVES & ROJAS, 1982).

ATWATER et alii (1978), observaram que durante

a fase silente, a resistência eleva-se lentamente no início e mais rapidamente ao final, até um valor máximo, reduzindo - se a seguir de maneira brusca, concomitantemente à despolarização rápida da onda lenta. Durante o período de platô, a resistência se reduz até atingir um valor mínimo, momentos antes de ocorrer a repolarização da onda lenta.

RIBALET & BEIGELMAN (1979), obtiveram resultados semelhantes para a fase silente, mas não no que se refere ao comportamento da resistência durante o período de platô. Estes autores mostraram, que após a queda brusca da resistência no início da fase ativa, ela torna a se elevar rapidamente até valores próximos aos do final da despolarização da onda lenta. No início da repolarização da onda lenta, sofre uma nova queda brusca.

Entretanto, deve-se observar que o valor médio da resistência da membrana durante a fase silente, registrada por estes autores, foi sempre superior ao da fase ativa.

Além destes efeitos da glicose, também foi demonstrado que ela afeta a comunicação entre as células da ilhota. MEISSNER (1976b), realizando registros simultâneos da atividade elétrica em duas células beta de uma mesma ilhota, verificou que a glicose induz um aumento da sincronia entre elas. O mesmo foi observado por EDDLESTONE et alii (1984) e MEDA et alii (1984). Além disso, EDDLESTONE et alii (1984) observaram uma redução da resistência juncional entre as células da ilhota, quando exposta à glicose e/ou à glibenclamida, o que possibilita maior acoplamento elétrico entre elas. O aumento na comunicação elétrica nas ilhotas, tem sido atribuído ao aumento do número de "gap junctions" entre as células promovido por glicose ou glibenclamida (MEDA, PERRELET & ORCI, 1979).

4.3. Participação dos íons na atividade elétrica da célula beta.

Embora o potencial de repouso da célula beta, seja determinado principalmente pela alta permeabilidade da membrana ao K^+ , ele é menos negativo que o potencial de equilíbrio deste íon (ATWATER et alii, 1978; MEISSNER et alii, 1978; BOSCHERO, GONÇALVES, DAWSON, ATWATER & ROJAS, 1983a). Isto pode ser devido ao efeito despolarizante do influxo basal de sódio e possivelmente também, à ação eletrogênica de um contratransporte Na^+/Ca^{2+} (MATTHEWS & SAKAMOTO, 1975; RIBALET & BEIGELMAN, 1982; HENQUIN & MEISSNER, 1984a).

A despolarização da membrana da célula beta, induzida pela introdução da glicose no meio perfusor, bem como o pré-potencial e a despolarização rápida da onda lenta, tem sido interpretada como sendo uma gradual redução da permeabilidade ao K^+ . Esta hipótese é apoiada principalmente pelos seguintes fatos:

a) a glicose reduz a taxa de efluxo de K^+ nas células beta, de maneira dose dependente (HENQUIN, 1978; BOSCHERO & MALAISSE, 1979);

b) bloqueadores da permeabilidade ao K^+ , tais como, quinina, 9-aminoacridina e tetraetilamônia (TEA) induzem atividade elétrica na ausência de glicose, ou em presença de concentrações sublimiares desse secretagogo (ATWATER et alii, 1979a; ATWATER et alii, 1979b; HENQUIN, MEISSNER & PREISSLER, 1979; MEISSNER & PREISSLER, 1979);

c) a atividade elétrica e a secreção de insulina, induzidas por glicose, são inibidas pelo ionóforo de K^+ , valinomicina (HENQUIN & MEISSNER, 1978; BOSCHERO et alii, 1983a); e finalmente,

d) tem sido observado que a despolarização da membrana induzida por glicose, está associada ao aumento da sua resistência elétrica (ATWATER et alii, 1978; RIBALET & BEIGELMAN, 1979; ATWATER et alii, 1982).

Há claras evidências da existência de três tipos de permeabilidade ao K^+ na membrana da célula beta. O primeiro deles é sensível à voltagem e é bloqueado farmacologicamente pela tetraetilamônia (HENQUIN, 1977; ATWATER et alii (1979b). O segundo é ativado pelo aumento da concentração intracelular do Ca^{2+} e é bloqueado farmacologicamente pela quinina (ATWATER et alii, 1979a) e glibenclamida (FERRER, ATWATER, OMER, GONÇALVES, CROGHAN & ROJAS, 1984). O terceiro, recentemente demonstrado por ASHCROFT et alii (1984) e por COOK & HALES, (1984), através da técnica de "patch clamp", é bloqueado por ATP intracelular.

A despolarização da onda lenta, parece decorrer da inativação da permeabilidade de K^+ sensível ao Ca^{2+} (WOLHEIM & SHARP, 1981; ATWATER et alii, 1982; ATWATER et alii, 1983) ou depender de um aumento da permeabilidade ao Ca^{2+} , sensível à voltagem (HENQUIN & MEISSNER, 1984a).

Os potenciais de ação deflagrados durante o platô das ondas lentas, tem sido interpretados como potenciais lentos de Ca^{2+} , gerados pelo influxo do íon através de canais sensíveis à voltagem (DEAN & MATTHEWS, 1970; RIBALET & BEIGELMAN, 1980; ATWATER, DAWSON, EDDLESTONE & ROJAS, 1981; MEISSNER & SCHMEER, 1981; DAWSON, ATWATER & ROJAS, 1984).

A ausência do íon cálcio no meio de perfusão, inibe a deflagração dos potenciais de ação, ao passo que o aumento de sua concentração, eleva a frequência e a amplitude dos mesmos, o que tem sido interpretado como uma indicação do in-

fluxo de Ca^{2+} (ATWATER & BEIGELMAN, 1976; MEISSNER & SCHMELZ, 1974; MEISSNER & PREISSLER, 1980; RIBALET & BEIGELMAN, 1980).

A participação do Ca^{2+} na geração dos potenciais de ação, tem sido demonstrado também pelos efeitos do seu ionóforo A23187 e dos seus antagonistas: Co^{2+} , Mn^{+} e D-600 (ATWATER, 1980b; MEISSNER & PREISSLER, 1980; MEISSNER, PREISSLER & HENQUIN, 1979; RIBALET & BEIGELMAN, 1980). Os efeitos dos ionóforos são análogos aos da elevação da concentração de Ca^{2+} extracelular e os dos antagonistas, assemelham-se aos da omissão do íon do meio de perfusão.

A hipótese de que a deflagração dos potenciais de ação, é consequência da ativação de uma permeabilidade de Ca^{2+} sensível à voltagem, foi recentemente corroborada por ATWATER et alii (1982). Estes autores confirmaram que os potenciais de ação podem ser estimulados ou suprimidos, por injeção de corrente despolarizante ou hiperpolarizante, respectivamente. Observaram também, que com a inibição dos potenciais de ação, a resistência da membrana permanece elevada durante o platô.

Quanto à repolarização da onda lenta, tem sido apresentadas evidências a favor de um aumento da permeabilidade da membrana ao K^{+} , resultante da ativação de canais de K^{+} sensíveis ao aumento da concentração do cálcio citosólico, que ocorreu durante o período de platô (ATWATER et alii, 1979a; HENQUIN, 1979; HENQUIN, MEISSNER & PREISSLER, 1979; RIBALET & BEIGELMAN, 1979; ATWATER, 1980a; ATWATER et alii, 1983).

Entretanto, tem sido proposta também a possível ação cooperativa, da ativação de canais de K^{+} sensíveis à voltagem e da inativação de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem, para o desenvolvimento desta etapa da atividade elétrica da

célula beta (HENQUIN & MEISSNER, 1984a).

O efeito de crescentes concentrações de glicose sobre a duração das ondas lentas, tem sido atribuído a mudanças do potencial redox do citosol e/ou a um aumento da geração de prótons (H^+), decorrente do metabolismo da glicose, que antagonizariam a ativação de canais de K^+ sensíveis ao cálcio (HENQUIN, 1979; EDDLESTONE & BEIGELMAN, 1983; PACE et alii, 1983).

Por outro lado, RIBALET & BEIGELMAN (1979), ATWATER (1980a) e ATWATER et alii (1983) sugeriram que o aumento da concentração de glicose, aumenta a capacidade da célula beta em tamponar o cálcio, que nela penetra durante a onda lenta e a deflagração dos potenciais de ação. Isto retardaria o momento no qual, o cátion atingiria a concentração citoplasmática necessária para ativar os canais de K^+ e consequentemente, induzir a repolarização da onda lenta.

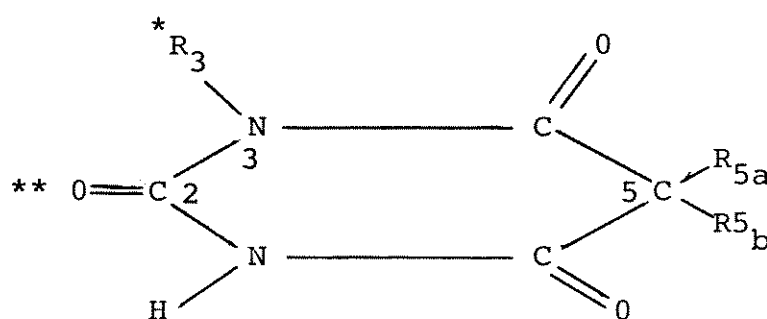
Recentemente foi atribuído ao AMP cíclico importante papel na regulação do padrão da atividade elétrica. O aumento da concentração intracelular deste nucleotídeo na célula beta, acelera marcadamente a despolarização durante o pré-potencial, levando a um aumento da frequência das ondas lentas, sem contudo alterar significativamente sua duração (HENQUIN, SCHMEER & MEISSNER, 1983; HENQUIN & MEISSNER, 1984b).

Quanto às diferenças da frequência das ondas lentas, exibidas por célula beta de diferentes ilhotas, elas parecem depender do estado metabólico da célula, o que implica em diferentes velocidades de tamponamento do cálcio intracelular (ILLANI J. ATWATER, comunicação pessoal).

5. COMPOSTOS BARBITÚRICOS

5.1. Características Gerais

Os compostos barbitúricos são derivados do ácido barbitúrico, uma ureída cíclica de núcleo hexagonal (2, 4, 6-trioxihexapirimidina), sintetizada pela primeira vez em 1864 por ADOLPH von BAYER, a partir da combinação de ureia e ácido malônico dicarboxílico (HARVEY, 1980).



FÓRMULA GERAL

O grupamento carbonil na posição 2, confere à molécula um caráter ácido, devido à tautomerização lactam ("ce-to") lactim ("enol") que pode sofrer, favorecida por sua localização entre dois nitrogênios eletronegativos. Em soluções alcalinas predomina a forma lactim, produzindo sais. Na prática médica, os sais sódicos são os mais frequentemente usados (CORBETT, 1977; HARVEY, 1980).

O termo "barbitúrico" tem sido aplicado a todos os compostos derivados da malonilureia; aqueles que apresentam

* R_3 = H exceto no hexabarbital, mefobarbital, metarbital e metoxihexital, onde ele é substituído por CH_3

** O , exceto no tiamital e tiopental onde ele é substituído por S (HARVEY, 1980).

um átomo de oxigênio ligado ao carbono da posição 2, são denominados oxibarbitúricos e aqueles onde o oxigênio é substituído por enxôfre, tiobarbitúricos.

Em geral, os barbitúricos são pouco hidrossolúveis e bastante solúveis em meios não polares, sendo que os tiobarbitúricos apresentam coeficientes de participação óleo-água, mais elevados que os oxibarbitúricos (HARVEY, 1980).

Tem se verificado que os efeitos farmacológicos produzidos pelos barbitúricos, resultam da ação de suas espécies não ionizadas, e que em geral, sua potência farmacológica está diretamente relacionada à sua lipossolubilidade. Entretanto, as diferenças de lipossolubilidade não explicam certas diferenças qualitativas e quantitativas, observadas entre os efeitos produzidos pelos barbitúricos. Por exemplo, doses mínimas, sedativas, de certos barbitúricos, como fenobarbital, podem apresentar potente ação anticonvulsivante. Outros, como pentobarbital, além de uma ação depressora geral, podem provocar excitação pré-anestésica, caracterizada às vezes por fortes convulsões. Outros ainda, como o CHEB^{*}, apresentam ação predominantemente convulsivante (HO & HARRIS, 1981).

5.2. Efeitos dos Barbitúricos Sobre o Sistema Nervoso

Dentre os efeitos dos barbitúricos em diversos tecidos, os mais estudados são aqueles observados no sistema nervoso, sendo que os mais significativos se manifestam ao nível sináptico (HO & HARRIS, 1981).

* CHEB - Ácido barbitúrico 5-(2-ciclohexilidene-etil)-5-etil

Sabe-se que as concentrações destas substâncias capazes de afetar a transmissão sináptica, são muito inferiores àsquelas necessárias para alterar a condução axonal (LARRABE & POSTERNAK, 1952; BARKER & GAINER, 1973).

5.2.1. Efeitos dos barbitúricos sobre a liberação de neurotransmissores

WEAKLY (1969), confirmando achados de SOMJEN (1963) e LØYNING, OSHIMA & YOKOTA (1964), verificou que o tiopental e o pentobarbital, reduzem o conteúdo quantal médio, liberado pelos terminais axônicos de fibras Ia, nas suas sinapses com motoneurônios da medula de gato.

Em outras sinapses do Sistema Nervoso Central, com postos barbitúricos também inibiam a liberação de neurotransmissores tais como: acetilcolina, catecolaminas, GABA e glutamato (KALANT & GROSE, 1967; CUTLER & DUDZINSKI, 1974, 1975; CARMI-CHAEI & ISRAEL, 1975; HAYCOK, LEVY & COTMAN, 1977; RICHTER & WALLER, 1977; CUTLER & YOUNG, 1979; RICHTER & WERLING, 1979; COLLINS, 1980).

Por outro lado, evidências eletrofisiológicas tem sugerido que barbitúricos sedativos e anticonvulsivantes, em baixas concentrações, bem como barbitúricos convulsivantes, promovem o aumento tanto da liberação espontânea de neurotransmissores quanto daquela induzida por despolarização (THOMSON & TURKANIS, 1973; SEYAMA & NARAHASHI, 1975; PROCTOR & WEAKLY, 1976; WILLOW, BORNSTEIN & JOHNSTON, 1980; SKERRIT, WILLOW & JOHNSTON, 1983).

Tem sido postulado, que os efeitos produzidos pelos barbitúricos, se devem primordialmente à sua ação sobre os fluxos de cálcio no terminal nervoso (veja revisão de HO &

HARRIS, 1981), interferindo assim no processo de acoplamento excitação-secreção. Muitos investigadores têm reportado, que diversos compostos barbitúricos, inibiram o acúmulo de cálcio induzido por despolarização em sinaptossomos cerebrais, gânglios autônomos e células nervosas "in vitro" (BLAUSTEIN & ECTOR, 1975; BLAUSTEIN, 1976; FRIEDMAN, COLEMAN & LESLIE, 1979; ONDRUSEK, BELKNAP & LESLIE, 1979; LESLIE, FRIEDMAN, WILCOX & ELROD, 1980; PERCY, LAMM & TALJAARD, 1981; HARRIS & STOKES, 1982).

Porém, dependendo do tipo de barbitúrico empregado, efeitos divergentes tem sido observados.

Através de estudos eletrofisiológicos, foi demonstrado que o influxo de cálcio, induzido por despolarização dos terminais sinápticos, de neurônios gigantes de lula e de neurônios de camundongo em cultura, foi inibido por barbitúricos não convulsivantes (MORGAN & BRYANT, 1977; HEYER & MACDONALD, 1982). Sugeriram, então, que esses compostos seriam capazes de bloquear canais de cálcio sensíveis à voltagem.

Por outro lado, SKERRIT & MACDONALD (1984) mostraram que barbitúricos convulsivantes, tais como 3M2B*, 1,3MLTB** e CHEB, despolarizam a membrana de neurônios de camundongos, em cultura. Atribuíram este efeito ao aumento da condutância da membrana a um cátion, a qual é sensível ao cálcio.

Com relação ao efluxo de cálcio, dependente de transporte ativo, também se observou comportamento diverso entre barbitúricos con

* 3M2B - Ácido barbitúrico, trans-5-etil-5-(3'-metil-but-2'-enil)

**1,3MLTB - Ácido barbitúrico, trans-5-etil-5-(1',3'-dimetil-but-1'-enil).

vulsivantes e não convulsivantes.

Tem-se verificado, que compostos barbitúricos, com propriedades anestésicas, são capazes de estimular a atividade Ca^{2+} -ATPase da membrana de sinaptossomos (WILLOW & JOHNSTON, 1979; HARRIS & STOKES, 1982; YAMAMOTO & HARRIS, 1983). Este efeito potencializaria a inibição do acúmulo de cálcio pelos terminais nervosos, tal como observado por outros autores.

Por sua vez, os barbitúricos convulsivantes, 1,3MB*, 3M2B e CHEB, inibiram a atividade da Ca^{2+} ATPase em sinaptossomos (WILLOW & JOHNSTON, 1979).

5.2.2. Efeitos pós-sinápticos dos barbitúricos.

Pós-sinapticamente, os barbitúricos parecem atuar sobretudo, modificando as ações específicas dos neurotransmissores (SEEMAN, 1972; HO & HARRIS, 1981).

Estudos desenvolvidos por vários autores, empregando diversas preparações, mostraram que barbitúricos sedativos e anticonvulsivantes, deprimiam as respostas pós-sinápticas excitatórias, mediadas pelos neurotransmissores acetilcolina e ácido glutâmico e intensificavam as respostas inibitórias mediadas pelo GABA (BARKER & GAINER, 1973; BARKER, 1975; BARKER & RANSON, 1978; MACDONALD & BARKER, 1979; NICOLL & WOJTOWICZ, 1980; SAWADA & YAMAMOTO, 1985; STEEL & SCHOLFIELD, 1985).

BARKER (1975) sugeriu que boa parte da depressão da resposta pós-sináptica, causada pelo pentobarbital, se deve a uma seletiva inibição dos eventos excitatórios relacionados às condutâncias de Na^+ e K^+ , dependentes da ação dos neurotransmissores. Também, SEYAMA & NARAHASHI (1975) demonstraram, através da técnica de fixação de voltagem, que o pentobarbital

* 1,3MB-Ácido barbitúrico, 5-etil-5-(1',3'-dimetilbutil).

reduz as condutâncias de Na^+ e K^+ , ativadas pela acetilcolina.

Recentemente GAGE & McKINNON (1985), estudando o efeito do pentobarbital sobre canais ativados pela acetilcolina, na junção neuromuscular do rato, através da técnica de "patch clamp", mostraram que essa droga retarda a cinética de ativação dos canais e reduz o tempo em que ficam abertos. Sugeriram então, que a molécula do pentobarbital deve ocupar um sítio alostérico no complexo receptor-canal.

Diversos autores tem apresentado evidências, que confirmaram a ação dos barbitúricos sobre a condutância do cloro mediada por GABA. Tem-se sugerido ainda, que provavelmente, a ação dos barbitúricos não seja através da interação das suas moléculas, diretamente com o receptor do GABA, mas com componente do canal de cloro a ele acoplado (para revisão veja HO & HARRIS, 1981).

Reforçando esta hipótese, recentemente SCHWARTZ, SKOLNICK, HOLLINGWORTH & PAUL (1984) obtiveram fortes evidências de que, pentobarbital e hexobarbital aumentam a condutância do cloro em sinaptoneurosomas, independentemente da ação do GABA.

As sinapses purinérgicas têm sido objeto de intensos estudos nos últimos anos (para revisão veja STONE, 1981 e SU, 1983). PHILLIS, EDSTRON, KOSTOPOULOS & KIRKPATRICK (1979) mostraram que a adenosina é capaz de inibir a atividade elétrica espontânea de neurônios do sistema nervoso central, através de sua interação com receptores específicos.

Interessante modo de ação pós-sináptico dos compostos barbitúricos, foi reportado por LOHSE, LENSCHOW & SCHWABE (1984). Estes autores verificaram que pentobarbital, hexobarbital e mefobarbital interagem como receptores de adenosina do tipo R_i (inibitórios), em membranas de neurônios de cérebro de rato. Esta interação é particularmente interessante, se considerarmos a semelhança existente entre as bases nitrogenadas e os componentes barbitúricos.

5.2.3. Efeito dos barbitúricos sobre a condução do impulso nervoso

Outro efeito característico dos barbitúricos, constitui-se no bloqueio da condução do impulso nervoso. Desde os primeiros trabalhos, tem sido atribuído aos barbitúricos a capacidade de reduzir a permeabilidade aos íons Na^+ (THESLEFF, 1956).

BLAUSTEIN (1968) pode comprovar esta hipótese ao demonstrar, através das técnicas de registro intracelular e fixação de voltagem, que a redução da amplitude e o aumento da duração do potencial de ação, em axônio gigante de lula, induzidos por pentobarbital ou tiopental, estão associados à redução dos valores de condutâncias de Na^+ e K^+ .

Efeitos semelhantes de outros compostos barbitúricos, foram relatados em axônio gigante de lagosta (NARAHASHI; MOORE & POSTON, 1969), em axônio gigante de lula (FRAZIER, MURAYAMA, ABBOTT & NARAHASHI, 1975) e em fibras mielinizadas de rã (NEUMAN & FRANK, 1977; SCHWARZ, 1979).

Realizando um estudo comparativo das ações do pentobarbital e do tiopental sobre axônios gigantes de lula, SEVCIK (1980) confirmou os resultados de BLAUSTEIN (1968) e verificou que o tiopental prolongou mais acentuadamente, o período de repolarização do potencial de ação. Analisando as correntes iônicas, demonstrou que a redução da corrente de potássio, foi maior na presença de tiopental do que de pentobarbital.

Observou também, que o pentobarbital não alterou o potencial de repouso da membrana, ao passo que o tiopental induziu despolarizações dependentes das concentrações aplica

das. Em 0,5 mM, este barbitúrico provocou a deflagração repetitiva de potenciais de ação, a qual pôde ser suprimida pelo pentobarbital. Entretanto, 100 nM de tetrodotoxina (TTX) não bloqueou as despolarizações induzidas pelo tiopental. Verificou ainda, que o tiopental elevou a resistência elétrica da membrana, de maneira dose dependente. Sugeriu então, que tiopental promove seus efeitos predominantemente, através do bloqueio de uma permeabilidade ao K^+ , não dependente da voltagem.

ÖRHEM & KRISTBJARNARSON (1981), estudando o efeito do tiopental sobre permeabilidade ao potássio em fibras mielinizadas de sapo, confirmaram as observações de SEVCIK (1980).

5.2.4. Efeitos dos barbitúricos sobre a porção lipídica da membrana plasmática

A capacidade de alterar as propriedades físicas da porção lipídica da membrana plasmática, é uma das características do modo de ação dos barbitúricos (SEEMAN, 1972; ROTH, 1979; HO & HARRIS, 1981; GOLDSTEIN, 1984).

NOVAK & SWIFT (1972) mostraram que pentobarbital e fenobarbital, penetram na membrana plasmática de neurônios e estabelecem pontes de hidrogênio com fosfatidilcolina, o fosfolípídeo mais abundante aí presente.

LEE (1976b) observou ainda, que a interação de pentobarbital, tiopental e fenobarbital com fosfatidilcolina e fosfatidiletolamina, diminui a temperatura da fase de transição gel-cristal líquido destes fosfolípídeos, indicando que esses compostos aumentam a fluidez das membranas lipídicas.

HARRIS & SCHROEDER (1980) trabalhando com pentobarbital e secobarbital em membranas sinápticas, preparadas a par

tir de cérebro de camundongo, corroboraram estas observações.

LEE (1976a) propôs um modelo onde os canais de sódio da membrana, circundados por um anel lipídico rígido, sofreriam alterações configuracionais, quando da fluidização deste anel, promovida por anestésicos locais. LEE (1976b) propôs que o mesmo deve ocorrer, quando da ação de compostos barbitúricos.

Ainda, ROWLETT, WASSERBERG & WAKELY (1985), constataram que o pentobarbital reduziu a adesão intercelular, rompendo em certa extensão a organização epitelial em placódio de cristalino e placódio ótico de pintos. Estes autores atribuíram tais alterações a um aumento de fluidez da membrana plasmática, induzida pelo composto barbitúrico.

6. EFEITOS DOS BARBITÚRICOS SOBRE A CÉLULA BETA DO PÂNCREAS

Em indivíduos sob anestesia barbitúrica, frequentemente, tem sido observada a ocorrência de hiperglicemia e redução da tolerância à glicose. Entretanto, é ainda muito controverso o efeito destas drogas sobre o nível de glicose sanguínea (CORBETT, 1977).

RENAULD & SVERDLIK (1974, apud HELLMAN, 1977) verificaram, que infusões intravenosas de glicose em cães anestesiados por pentobarbital, produziam acentuada hiperglicemia e eram acompanhadas apenas de um ligeiro aumento dos níveis de insulina.

PANTEN, CHRISTIANS, KRIEGSTEIN, POSER & HASSEL-BLATT (1973) mostraram que ilhotas de camundongos obesos (ob/ob), expostos a 3 mM de pentobarbital, apresentaram uma redu-

ção da secreção de insulina induzida por glicose. Observaram ainda, que este fenômeno foi acompanhado de um aumento do conteúdo de NAD(P)H nas ilhotas.

HELLMAN (1977) também observou, que 3 mM de pentobarbital inibiu a secreção de insulina induzida por glicose, em ilhotas isoladas de camundongos obesos (ob/ob). Entretanto, na ausência de cálcio extracelular, esse oxibarbitúrico aumentou o efeito do secretagogo. Verificou ainda, que o pentobarbital foi capaz de reduzir o conteúdo de AMP cíclico das ilhotas, medido na presença de 3-isobutilmetilxantina. Nestas condições, o pentobarbital foi capaz de estimular a secreção de insulina induzida por 3 mM de glicose, quer na presença, quer na ausência de cálcio extracelular, sugerindo uma possível ação do pentobarbital sobre a distribuição intracelular de cálcio.

Evidências de uma ação do pentobarbital sobre as permeabilidades de K^+ e Ca^{2+} da célula beta, envolvidas no mecanismo de secreção de insulina, foram apresentadas por GONÇALVES, ROJAS, ATWATER & BANGHAN (1982). Na ausência de glicose, o pentobarbital induziu despolarização das células beta de ilhotas de camundongo. Este efeito foi associado a um aumento da resistência, equivalente ao induzido por 11 mM de glicose, sem contudo deflagrar potenciais de ação. Verificaram ainda, que os potenciais de ação, induzidos por 11 mM de glicose, foram suprimidos quando pentobarbital foi adicionado à solução perfusora.

Recentemente, DIAS (1984) verificou que o tiopental promoveu um aumento da secreção de insulina, induzida por 6,0 mM de glicose, em ilhotas isoladas de rato. Verificou tam

bém, uma inibição reversível do efluxo de ^{86}Rb na presença do tiopental. Este efeito persistiu, mesmo na presença de menadione, sugerindo que o tiopental atue a nível de membrana, bloqueando a permeabilidade ao K^+ . Por outro lado, DIAS (1984) observou que em presença de alta concentração de glicose (16,6 mM) o tiopental (0,2 mM) não afetou a dinâmica do efluxo de ^{86}Rb das ilhotas.

Resultados preliminares deste trabalho foram apresentados em congressos (BOSCHERO, GONÇALVES & LANGONE, 1983b; BOSCHERO, DIAS, REIS, LANGONE & GONÇALVES, 1985).

II. PROPOSIÇÃO DO TRABALHO

Para um maior conhecimento do acoplamento estímulo-secreção de insulina, se faz necessária uma compreensão mais detalhada dos mecanismos de controle das permeabilidades iônicas, na membrana de células beta.

São conhecidos os efeitos dos compostos barbitúricos, em particular do tiopental, sobre as permeabilidades a K^+ e Ca^{2+} na membrana das células nervosas.

Portanto, consideramos interessante o emprego desta substância como instrumento para o estudo do mecanismo de secreção de insulina. Assim, nos propusemos investigar, através da análise da atividade elétrica e do efluxo de ^{45}Ca , quais os efeitos do tiopental sobre a permeabilidade a K^+ e Ca^{2+} nas células beta.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. ELETROFISIOLOGIA

1.1. Animais

Foram utilizados camundongos albinos, de ambos os sexos, de 3 a 4 meses de idade, pesando entre 25 e 30 gramas, os quais foram alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*.

Imediatamente antes da realização do experimento os animais foram mortos por concussão cerebral, decapitados para sangria e laparotomizados para acesso e remoção do pâncreas.

1.2. Métodos

O procedimento para a microdissecção, fixação das ilhotas na câmara de perfusão, bem como, para o registro do potencial de membrana das células beta, foi de acordo com o descrito por ATWATER & BEIGELMAN (1976). A resistência elétrica da membrana foi registrada conforme descrito por ATWATER et alii (1978).

1.2.1. Microdissecção das ilhotas de Langerhans

O pâncreas foi removido e a seguir fixado ao fundo de uma cuba contendo solução de KREBS.

Procedeu-se então à microdissecção sob lupa (10-20x) utilizando-se pinças de ponta fina e tesoura para íris. Cada ilhota foi removida com uma pequena porção de pâncreas exócri

no ao redor (aproximadamente 1 mm^3). O fragmento recém dissecado foi imediatamente transferido para a câmara de perfusão e fixado, pela sua porção exócrina, com de alfinetes de aço ao fundo da mesma (Fig. 1). Para facilitar a realização dos registros, os alfinetes forma colocados de modo a expor a superfície da ilhota, deixando-a livre de tecido exócrino. Esta etapa também foi desenvolvida sob lupa.

1.2.2. Sistema de perfusão das ilhotas de Langerhans

Os frascos de solução perfusora (KREBS-bicarbonato) foram mantidos durante todo o período experimental em banho-maria a 38°C . Este último foi colocado 60 cm acima da câmara de perfusão, de modo a garantir o escoamento contínuo da solução por gravidade. Os frascos comunicavam-se com câmara de perfusão através de tubos de polietileno de 1,5 mm de diâmetro interno. Por intermédio de uma válvula, posicionada a 3 cm da câmara, mudava-se a procedência da solução perfusora. O fluxo foi mantido constante em $1,4 \text{ ml/min}$, sendo que o tempo necessário para troca total da solução na câmara foi de aproximadamente 15 segundos. Para ajudar a manter a temperatura no interior da câmara a 37°C , a cânula proveniente dos frascos contendo a solução perfusora, percorria uma câmara trocadora de calor, pela qual circulava água a 38°C , continuamente (Fig. 1).

As soluções foram gaseadas constantemente com carbogênio ($95\% \text{ O}_2$; $5\% \text{ CO}_2$), sendo o pH mantido em 7,4.

1.2.3. Registros eletrofisiológicos na célula beta.

Com o auxílio de um estirador vertical, foram construídos micropipetas de vidro a partir de tubos de 5 cm de comprimento, 2,0 mm de diâmetro externo e 0,7 mm de diâmetro interno, que continham no seu interior uma fibra capilar. Imediatamente após o estiramento, as micropipetas foram preenchidas com solução de citrato de potássio (3M), ou cloreto de potássio (3M).

Para realizar os registros eletrofisiológicos a micropipeta de vidro foi fixada ao micromanipulador (da W.R. Prior & Co. LTD.) e um eletrodo de prata, recoberto por uma camada de AgCl depositada eletroliticamente, foi introduzido no seu interior. O eletrodo de referência (Ag-AgCl) foi mergulhado na solução perfusora da câmara, próximo à ilhota.

Os dois eletrodos foram ligados às duas unidades de ganho de alta impedância de entrada ($10^{14} \Omega$), cuja saída foi ligada de modo convencional a um osciloscópio, marca IWATSU, modelo SS 5702, e a um registrador potenciométrico de dois canais para o acompanhamento gráfico de protocolo experimental (Fig. 1).

Antes de cada experimento mediu-se a resistência elétrica dos microeletrodos, e utilizou-se apenas aqueles que apresentavam resistência da ordem de 180 a 300 M Ω .

O reconhecimento da célula beta foi realizada em presença de 11,1 mM de glicose, através da sua atividade característica, manifestada após a penetração do microeletrodo. Uma vez reconhecida a célula, se esperou um período de 10 a 15 minutos para a estabilização da atividade elétrica, iniciando-se a seguir o período de experimentação.

Para realizar as medidas de resistência elétrica da membrana, foram injetados pulsos de corrente de 0,05 nA ou 0,1 nA, com duração de 900 ms, através do mesmo microeletrodo utilizado para o registro do potencial de membrana.

O valor da resistência (R) foi calculado a partir do valor da variação do potencial de membrana (V), provocada pelos pulsos hiperpolarizantes (I), de modo que $R = V/I$. Para medir a deflexão do potencial de membrana utilizou-se um registro expandido do experimento.

Antes do impalamento da célula beta, com os dois eletrodos mergulhados na solução perfusora da câmara, foram aplicados pulsos de corrente, e a diferença de potencial registrada foi anulada utilizando-se um circuito eletrônico ("null bridge") acoplado ao amplificador. Assim, uma vez impalada a célula, a deflexão do potencial de membrana, devido à aplicação de pulsos de corrente, foi diretamente proporcional à resistência da membrana à entrada de corrente ("input resistance"). Ao final do experimento, com os eletrodos mergulhados novamente na solução perfusora da câmara, repetiu-se o programa de pulsos de corrente. Quando ocorriam pequenas deflexões de potencial, estes valores eram subtraídos ou adicionados (conforme o sentido da deflexão) aos valores registrados na célula.

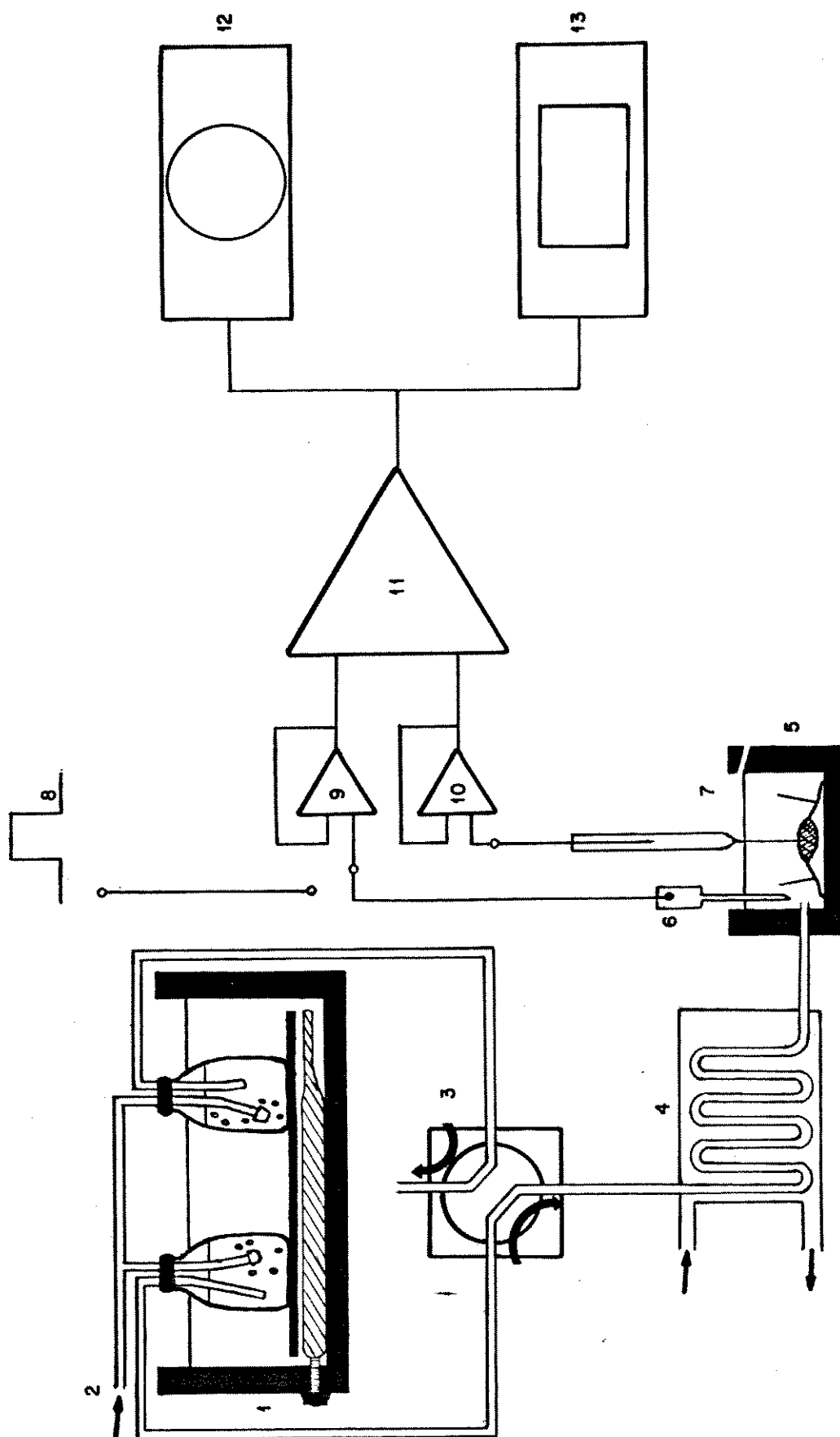
2. EFLUXO DE ^{45}Ca

2.1. Animais

Foram utilizadas ratas de 3 a 6 meses de idade, pesando entre 150 a 300 gramas, as quais foram alimentadas com ração balanceada e água *ad libitum*.

FIGURA 1. MONTAGEM UTILIZADA PARA PERFUSÃO DE ILHOTAS DE LANGERHANS E REGISTRO DA ATIVIDADE ELÉTRICA DE CÉLULAS BETA DE CAMUNDONGOS (esquemática).

1. Banho-maria e frascos de solução perfusora.
2. Sistema de distribuição de carbogênio para as soluções perfusoras.
3. Válvula para mudar a procedência da solução perfusora.
4. Câmara trocadora de calor.
5. Câmara de perfusão, em corte longitudinal, contendo uma ilhota microdissecada.
6. Eletrodo de referência (Ag-AgCl).
7. Eletrodo intracelular (micropipeta e eletrodo de Ag-AgCl).
8. Pulso proveniente de uma fonte de voltagem de baixa impedância de saída. Para a compensação de capacitância, o amplificador 9 foi aterrado e o eletrodo de referência foi ligado à fonte de voltagem.
- 9 e 10. Amplificadores operacionais de alta impedância de entrada (seguidores catódicos).
11. Unidade de amplificação.
12. Osciloscópio.
13. Registrador potenciométrico para registro em papel.



Imediatamente antes da realização do experimento os animais foram mortos por concussão cerebral, decapitados para sangria e laparatomizados para acesso e remoção do pâncreas.

2.2. Métodos

Para o isolamento de ilhotas de Langerhans foi utilizada a técnica descrita por LACY-KOSTIANOVSKY (1967) ligeiramente modificada por BOSCHERO, DELATTRE & SANTOS (1980). Para a determinação e análise do efluxo de cálcio utilizou-se técnica descrita por HERCHUELZ & MALAISSE (1978).

2.2.1. Isolamento de ilhotas de Langerhans

Antes da remoção do pâncreas, fez-se a canulação do ducto biliar comum, próximo ao hilo hepático, ocluindo-se sua porção distal, adjacente ao duodeno. Pela cânula foram injetados 15,0 ml de solução de HANKS, enriquecida com 2,8 mM de glicose, para divulsionar o tecido acinar.

O pâncreas foi então removido livre de nódulos linfáticos e gordura e reduzido a fragmentos de aproximadamente $0,5 \text{ mm}^3$ cada um, com o auxílio de uma tesoura. Os fragmentos provenientes de 3 ou 4 pâncreas, foram incubados a 37°C em solução de HANKS, contendo de 6 a 8 mg de collagenase, durante 15 minutos sob agitação constante. Nos 10 minutos iniciais o conteúdo foi agitado por borbulhamento com carbogênio (95% O_2 ; 5% CO_2) e no período restante, essa agitação

foi feita manualmente.

Em seguida, o material foi submetido a cinco lavagens consecutivas em solução de HANKS, para a remoção da colagenase, das enzimas digestivas e dos fragmentos celulares liberados durante a incubação. Para reduzir o tempo de lavagem, o material foi centrifugado a baixa rotação (500-700 rpm) entre uma lavagem e outra.

Finalmente, as ilhotas, completamente separadas do tecido acinar, foram coletadas sob lupa (10x) com auxílio de uma pipeta Pasteur estirada e previamente siliconizada.

2.2.2. Marcação de ilhotas de Langerhans com ^{45}Ca

Grupos de 80 a 150 ilhotas foram incubados a 37°C durante 90 minutos em recipientes contendo 150 μl de solução de KREBS, onde o CaCl_2 foi substituído por $^{45}\text{CaCl}_2$ (40-50 $\mu\text{C}/\text{ml}$) e enriquecida com albumina bovina (1,0 mg/ml) e glicose (16,7 mM). O pH (7,4) foi equilibrado durante os 10 minutos iniciais com carbogênio (95% O_2 ; 5% CO_2).

2.2.3. Perfusão das ilhotas de Langerhans

Findo o período de incubação, as ilhotas foram lavadas quatro vezes com solução KREBS enriquecida com albumina bovina (1,0 mg/ml) e glicose (16,7 mM), e imediatamente transferidas para as câmaras (volume = 0,3 ml) do sistema de perfusão. Cada câmara foi forrada com filtro de acetato de celulose (diâmetro dos poros = 5,0 μm), sobre o qual as ilhotas foram depositadas. Às câmaras foram conectadas a dois reservatórios (A e B) de solução perfusora, mantidos em banho-maria a 38°C . A

um deles (B) foi adicionado tiopental na concentração desejada. Ambas soluções foram continuamente gaseadas com carbogênio (95% O_2 ; 5% CO_2).

A perfusão das ilhotas começou imediatamente após a sua transferência para a câmara, com a solução perfusora percorrendo o sistema na razão de 0,6 ml/min, impelida por uma bomba peristáltica (Holter pump S-900 Extracorporeal Med. Spec. Inc. - King Prussia, Pa). O período de adaptação das ilhotas na câmara foi de 30 minutos, a partir do que teve início a coleta de amostras do efluente. Até o 44º minuto, inclusive, e do 65º até o final, a perfusão foi realizada com solução proveniente do reservatório A. Entre o 45º e 64º minuto, inclusive, a solução perfusora proveio do reservatório B.

As amostras foram coletadas a cada dois minutos em frascos de 20 ml. À cada amostra foi adicionado 6 ml de líquido de cintilação. A radioatividade foi medida num contador de radiação beta (BECKMAN - LS 7.000).

Os cálculos da fração de efluxo de ^{45}Ca , correspondente a cada amostra (E_j), foram realizadas de acordo com a indicação abaixo.

Amostra	Radioatividade (cpm)	$r_j - r_b$	$r_f + \sum_j^a r_j - (a + 2 - j)r_b$
1	r_1	$r_j - r_b$	$r_f - r_b + r_{26} - r_b + \dots + r_1 - r_b$
2	r_2	$r_2 - r_b$	
.			
.			
.			
25	r_{24}	$r_{25} - r_b$	$r_f - r_b + r_{26} - r_b + r_{25} - r_b$
26	r_{26}	$r_{26} - r_b$	$r_f - r_b + r_{26} - r_b$
Filtro	r_f	$r_f - r_b$	
BKG	r_b	-	

sendo que:
$$E_j = \frac{r_j - r_b}{r_f + \sum_j^a r_j - (a + 2 - j)r_b}$$

onde:

j = número da amostra

a = número total de amostras

r_f = radioatividade do filtro e das ilhotas do final da per fusão

r_b = radioatividade de fundo (BKG = background)

3. RADIOISÓTOPOS E REAGENTES

Todos os sais que compuseram as soluções empregadas, bem como glicose e demais substâncias a elas adicionadas, foram de grau analítico de pureza (PA). A albumina bovina fração V, a colagenase (260 U/mg), o Dimetil Sulfoxida (DMSO) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.); o Tiopental da Abbot Laboratories (Chicago, Ill.); o 2,4 dinitrofenol (DNP) da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ). O ^{45}Ca e frascos de polietileno para contagem de radiação foram adquiridos da New England Nuclear Corp. (Boston, Mass.). O agente tensioativo purificado (Tinovetin) da Ciba Geigy (São Paulo, SP). O filtro foi da Millipore Corp. (Bedford, Mass.).

4. SOLUÇÕES

Eletrofisiologia

Para a microdissecação e perfusão das ilhotas durante os registros eletrofisiológicos foi utilizada a solução de KREBS (tampão bicarbonato) com a seguinte composição:

NaCl	110,0 mM
NaHCO ₃	25,0 mM
KCl	5,0 mM
MgCl ₂	1,1 mM
CaCl ₂	2,5 mM

Glicose, Tiopental e DNP foram acrescentados à solução de acordo com o protocolo experimental.

Efluxo de ^{45}Ca

Para o isolamento das ilhotas foi empregada a solução de Hanks com a seguinte composição:

NaCl	136,7 mM
KCl	5,4 mM
CaCl_2	1,3 mM
MgSO_4	0,8 mM
Na_2HPO_4	0,3 mM
KH_2PO_4	0,4 mM
NaHCO_3	4,1 mM

No momento do uso, foram adicionados 2,8 mM de glicose.

Para os meios de incubação, lavagem e perfusão das ilhotas foi utilizada solução de KREBS (tampão bicarbonato) com a seguinte composição:

NaCl	115,0 mM
NaHCO_3	24,0 mM
KCl	5,0 mM
MgCl_2	1,0 mM
CaCl_2	1,0 mM

Para a incubação e lavagem, no momento do uso foi adicionado 1 mg/ml de albumina bovina e 16,7 mM de glicose. Para a perfusão, glicose (4,0 e 5,6 mM) e tiopental (0,5 e 2,0 mM) foram adicionados à solução, conforme requerido pelo protocolo experimental.

Para a contagem da radiação emitida pelo ^{45}Ca , foi preparado o líquido de cintilação com a seguinte composição:

Tolueno	66,66 ml
Tinovetin	33,33 ml
(agente tensioativo purifica- do)	
Omnifluor	200 mg/100 ml

5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para avaliação estatística dos resultados relativos à resistência de membrana utilizou-se o teste "t" de Student.

Os resultados relativos ao efluxo de ^{45}Ca foram avaliados estatisticamente calculando-se para cada experimento a diferença entre os valores registrados depois da alteração da condição experimental (46° min.) e os esperados, calculados pela extrapolação da curva exponencial baseada nos dados obtidos antes da alteração (30° ao 44° min.).

A significância estatística foi avaliada através do teste "t" de Student.

IV. RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ELÉTRICA DA CÉLULA BETA DE ILHOTA PANCREÁTICA DE CAMUNDONGO INDUZIDA POR 11,1 mM DE GLICOSE.

A figura 2 mostra a resposta bifásica apresentada por uma célula beta quando foi adicionado 11,1 mM de glicose à solução perfusora. Na ausência de glicose, esta célula apresentou um potencial de membrana estável em -70mV. Durante 1 minuto e 30 segundos, após a adição de 11,1 mM do secretagogo, ocorreu uma lenta e gradual despolarização até -64 mV, seguida de uma despolarização rápida até -50 mV. A partir deste valor, potenciais de ação passaram a ser deflagrados de maneira contínua (primeira fase).

A célula manteve este tipo de atividade elétrica durante 1 minuto, sendo substituída a seguir por uma sucessão de oscilações rítmicas do potencial de membrana (segunda fase), que caracterizam a atividade elétrica padrão destas células, a qual será descrita a seguir.

A figura 3 mostra a atividade elétrica típica da célula beta. As oscilações rítmicas do potencial de membrana, denominadas "bursts" (DEAN & MATTHEWS, 1968), constituem-se de ondas lentas de despolarização às quais se sobrepõem potenciais de ação.

De acordo com ATWATER & BEIGELMAN (1976) e MEISNER (1976a), os "bursts" apresentados por esta célula constituíram-se das seguintes fases:

a) Fase de Despolarização: caracterizada por uma rápida redução do potencial de membrana a partir de um poten-

FIGURA 2. Mudanças do potencial de membrana da célula beta pela introdução de 11,1 mM de glicose no meio perfusor. A introdução de glicose é indicada pela barra horizontal acima do traçado. Observe-se a resposta bifásica, consistente, inicialmente pela deflagração de potenciais de ação e seguida, após 1 minuto, pela sucessão de oscilações ritmicas do potencial de membrana denominadas "bursts" (atividade elétrica padrão). Esta célula apresentou a frequência de 4 "bursts" por minuto.

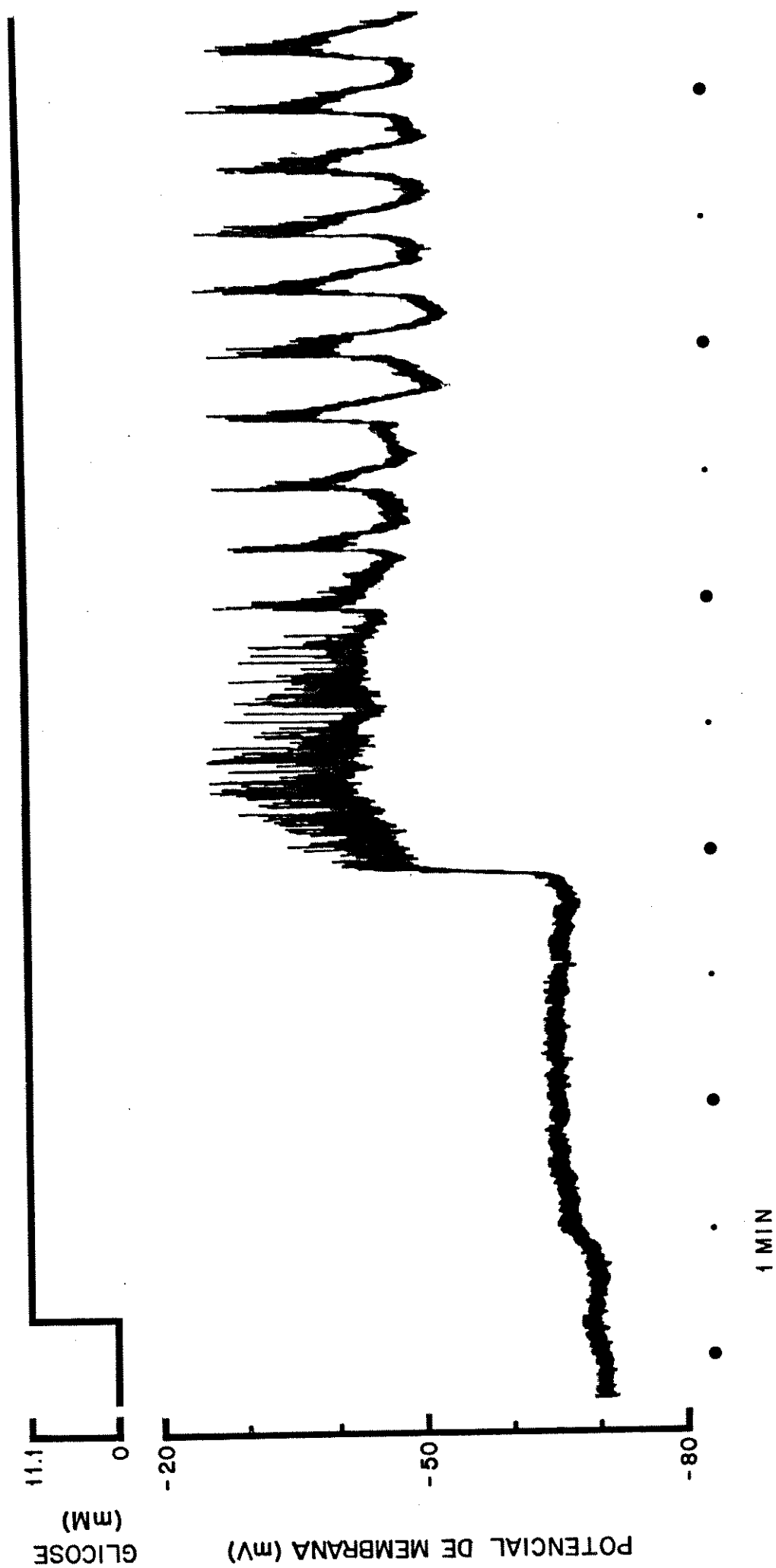
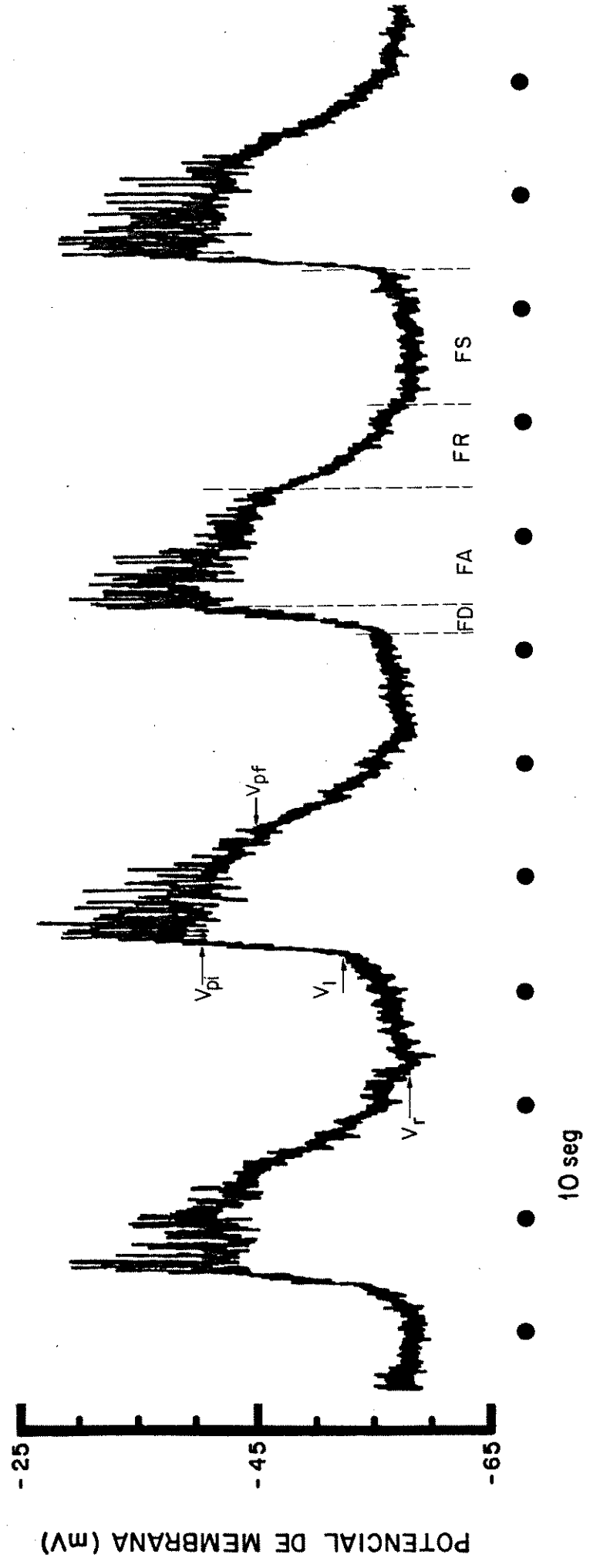


FIGURA 3. Sucessão de "bursts", correspondente à atividade elétrica padrão exibida pela célula beta em presença de 11,1 mM de glicose. Esta célula apresentou a frequência de 2,5 "bursts" por minuto. (V_l = potencial limiar ; V_{pi} = potencial inicial do platô; V_{pf} = potencial final do platô; V_r = potencial de repolarização máxima do "burst"; FD = fase de despolarização; FA = fase ativa; FR = fase de repolarização; FS = fase silente.

GLUCOSE 11.1 mM



cial limiar (V_l) de -55 mV a um potencial de platô (V_p) de -40 mV.

b) Fase Ativa: caracterizada pela deflagração de potenciais de ação a partir do V_p , cuja frequência e amplitude foi se reduzindo gradativamente. Observamos também uma ligeira elevação do V_p no decorrer da fase ativa (V_p inicial = -40 mV; V_p final = -45 mV). A duração dos potenciais de ação frequentemente foi maior ao final do platô.

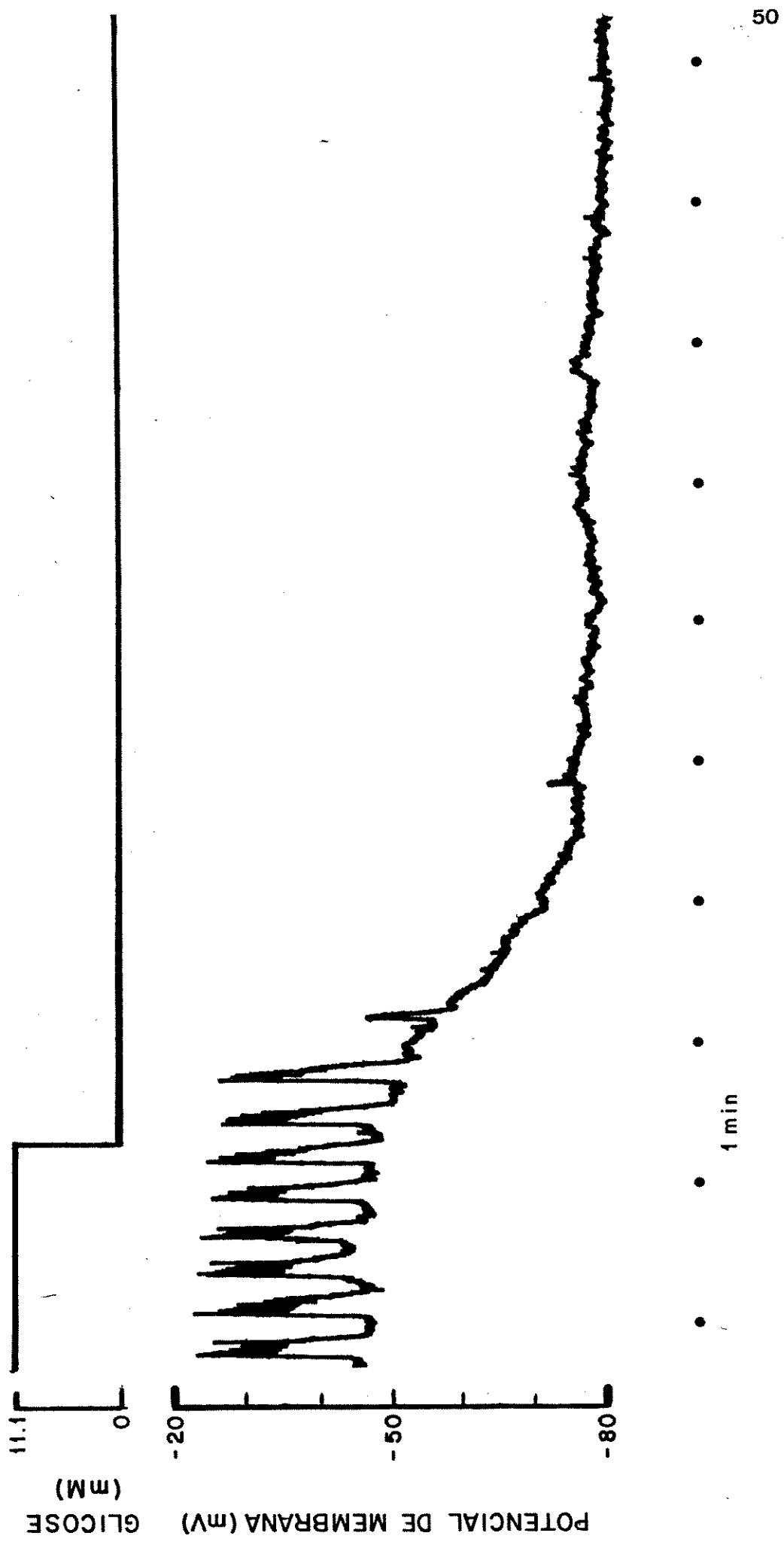
c) Fase de Repolarização: caracterizada por uma elevação do potencial de membrana a partir de -45 mV até -58 mV. Este valor é denominado potencial de repolarização máxima do "burst" (V_r).

d) Fase Silente: caracterizada pela ausência de flutuações do potencial de membrana, embora tenha ocorrido uma lenta e gradual despolarização a partir do V_r até o V_l do próximo "burst".

Esta célula apresentou uma frequência de 2,5 "bursts" por minuto, sendo que a duração de cada fase apontada acima correspondeu respectivamente a 7%, 34%, 27%, 32% da duração do ciclo todo. Entretanto, é conveniente ressaltar que as durações da fase silente e da fase ativa, principalmente, apresentaram variações entre células beta de diferentes ilhotas. Consequentemente, a frequência de "bursts" exibida pelas células por nós estudadas variou entre 2 a 5 por minuto.

A figura 4 é representativa do efeito da remoção da glicose do meio perfusor sobre o potencial de membrana. A célula em questão apresentou uma atividade elétrica padrão, com frequência de 3,5 "bursts" por minuto, em presença de 11,1 mM de glicose (V_r = -47,5 mV; V_p = -35 mV). A remoção do secretago provocou a interrupção da atividade elétrica em 50 segun-

FIGURA 4. Efeito da remoção da glicose do meio perfusor sobre a atividade elétrica da célula beta. A remoção da glicose é indicada pela mudança do nível da barra horizontal. A célula apresentou a frequência de 3,5 "bursts" por minuto.



dos e crescente aumento do potencial de membrana, até atingir -76 mV, após 1 minuto e 10 segundos, mantendo-se estável a seguir.

2. EFEITO DO TIOPENTAL SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DA CÉLULA BETA.

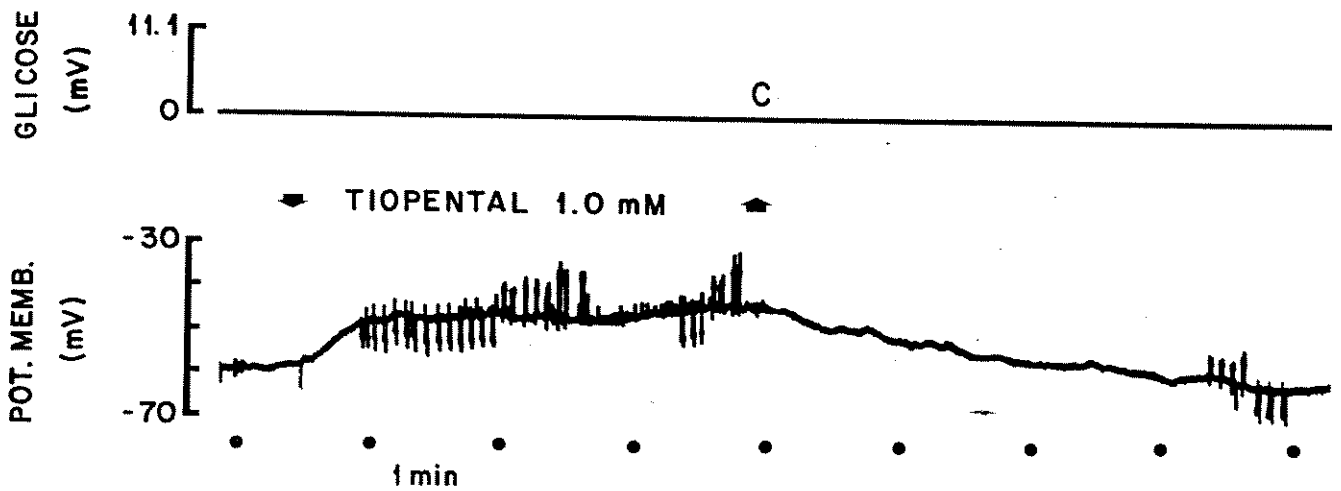
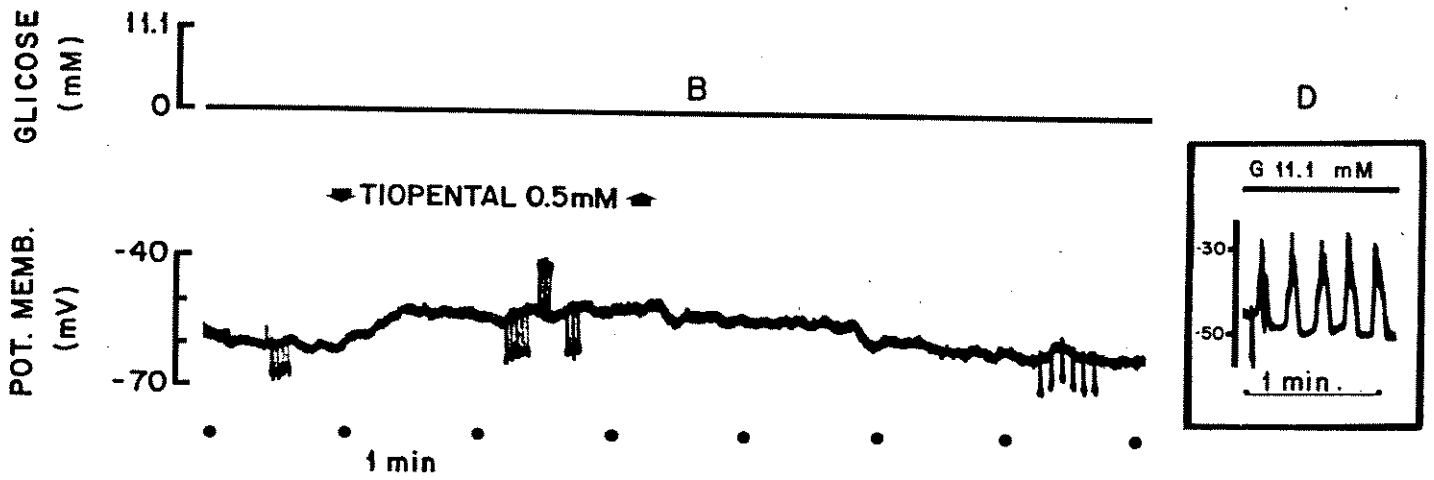
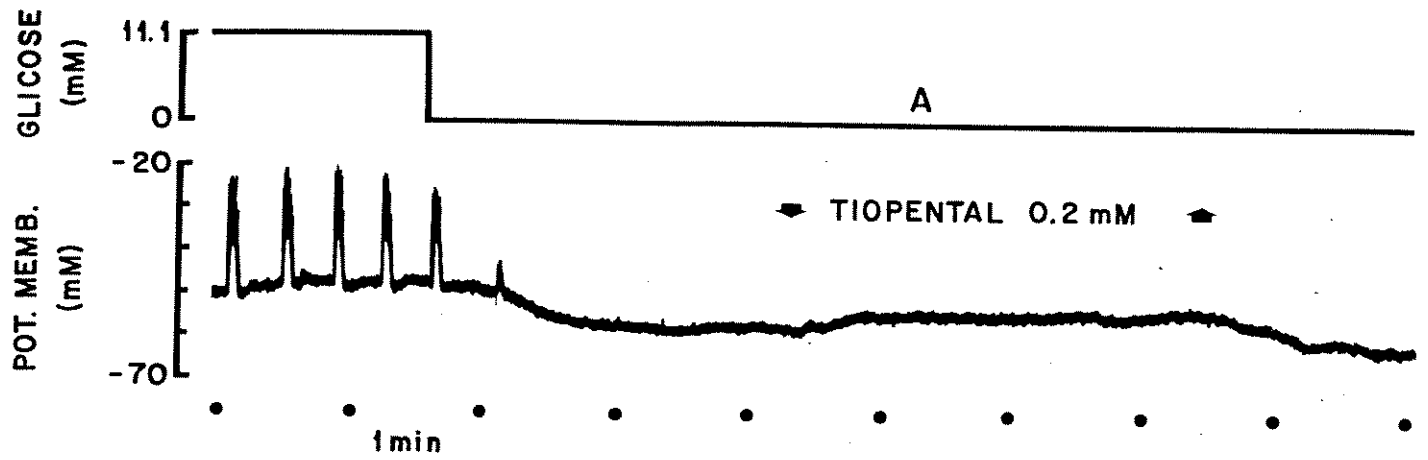
A figura 5 mostra o efeito da adição do tiopental (0,2; 0,5 e 1,0 mM) à solução perfusora sobre o potencial de membrana da célula beta.

As células foram impaladas em presença de 11,1 mM de glicose e a atividade elétrica registrada permitiu o seu reconhecimento. Em seguida, a glicose foi removida da solução perfusora e se aguardou a estabilização do potencial de membrana, que normalmente ocorreu entre 1 minuto e 1 minuto e 30 segundos nas células estudadas.

A figura 5a é ilustrativa do efeito despolarizante de 0,2 mM de tiopental sobre o potencial de membrana da célula beta. Na ausência de glicose a célula apresentou um potencial de membrana de -59 mV. A adição de 0,2 mM de tiopental provocou, em 32 segundos, a despolarização da membrana até -55 mV, permanecendo assim enquanto a droga esteve presente (3 minutos). A remoção do tiopental causou repolarização da membrana até -60 mV, em 48 segundos, estabilizando-se neste valor.

A figura 5b mostra o efeito da adição de 0,5 mM de tiopental à solução perfusora sobre o potencial de membrana da célula. Na ausência de glicose a célula apresentava um potencial de membrana de -60 mV. A introdução de 0,5 mM de tiopental provocou a despolarização da membrana até -52 mV, 32 segundos após, permanecendo neste valor enquanto a droga esteve

FIGURA 5. Efeito de 0,2 , 0,5 e 1,0 mM de tiopental sobre o potencial de membrana da célula beta na ausência de glicose (painéis A, B e C, respectivamente). As setas $\downarrow$ e $\uparrow$ indicam a introdução e a remoção do tiopental do meio perfusor. O painel D mostra a atividade elétrica padrão induzida por 11,1 mM de glicose (G) após a remoção de 1,0 mM de tiopental (a barra horizontal corresponde a 1 min.). Foram omitidos os períodos de recuperação da atividade elétrica em 11,1 mM de glicose após os tratamentos com 0,2 e 0,5 mM de tiopental. As deflexões do traçado dos painéis 5b e 5c se devem à injeção de pulsos de corrente (0,1 nA, 900 ms e 0,05 nA, 900 ms, respectivamente ao painéis 5b e 5c). Para a avaliação da resistência da membrana foi utilizado apenas o valor das deflexões do potencial de membrana provocados pelos pulsos hiperpolarizantes.



presente na solução perfusora (2 minutos de 15 segundos). As deflexões que aparecem no traçado, se devem à injeção de pulsos de corrente (0,1 nA), para a realização de medidas de resistência da membrana à entrada de corrente ("input resistance"). A remoção do tiopental provocou repolarização e estabilização do potencial de membrana em -63 mV, após 3 minutos.

A figura 5c mostra o efeito da adição de 1,0 mM de tiopental à solução perfusora sobre o potencial de membrana da célula beta. Na ausência de glicose o potencial de membrana era de -60 mV. A introdução de 1,0 mM de tiopental provocou a despolarização da membrana até 47 mV em 36 segundos, permanecendo neste valor até a retirada da droga (3 minutos e 20 segundos). Alguns potenciais de ação de pequena amplitude (aproximadamente 6 mV) foram deflagrados a intervalos irregulares durante esta fase. Nos últimos 50 segundos de tratamento ocorreu uma ligeira despolarização, levando o potencial de membrana a -45 mV. Observando-se então, um aumento da frequência de deflagração dos potenciais de ação de pequena amplitude. A remoção do tiopental provocou a repolarização da membrana até -61 mV, 3 minutos e 20 segundos após, estabilizando-se neste valor. Pode-se observar também nesta figura, variações do potencial de membrana com uma duração de 900 ms, que correspondem à injeção de pulsos de corrente (0,05 nA) a fim de se medir a resistência da membrana à entrada da corrente.

Em todas as ocasiões, a reintrodução de 11,1 mM de glicose, promoveu o reaparecimento da atividade elétrica padrão como está mostrado na figura 5 d, que corresponde à recuperação após o tratamento com 1,0 mM de tiopental. Resultados semelhantes aos apresentados acima, foram obtidos em cinco outras células de diferentes ilhotas.

3. EFEITO DO TIOPENTAL SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DA CÉLULA BETA NA PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES SUBLIMIARES DE GLICOSE

Em presença de 2,8 e 5,6 mM de glicose, 0,5 e 2,0 mM de tiopental induziram despolarização e atividade elétrica da célula beta. As figuras 6, 7 e 8 mostram três registros representativos deste efeito do tiopental. Efeitos similares foram observados em três outras células. Os registros mostrados nas figuras 6 e 7 foram obtidos da mesma célula.

A figura 6 mostra que em presença de 11,1 mM de glicose a célula desenvolvia atividade elétrica padrão, cuja frequência era de 3 "bursts" por minuto ($V_r = -56$ mV). Após a redução da concentração de glicose para 2,8 mM ocorreram dois "bursts", seguindo-se então a hiperpolarização da membrana até -67 mV, cessando a atividade elétrica. Dois minutos após a estabilização, 0,5 mM de tiopental foi introduzido na câmara de perfusão, o que provocou gradativa despolarização da membrana até -47 mV, em 3 minutos e 30 segundos, permanecendo neste nível enquanto a droga esteve presente (4 minutos e 50 segundos). A remoção do tiopental provocou o retorno do potencial de membrana ao valor de -70 mV, 2 minutos e 20 segundos após. A seguir, a ilhota foi novamente perfundida com 11,1 mM de glicose, e a célula voltou a apresentar atividade elétrica padrão, com $V_r = -50$ mV.

Na figura 7 pode-se observar que, com a redução da concentração de glicose de 11,1 mM para 5,6 mM, ocorreram dois "bursts", cujos potenciais de ação apresentaram menor amplitude que em 11,1 mM, seguidos de uma hiperpolarização da membrana até -70 mV. A introdução de 0,5 mM de tiopental pro

FIGURA 6. Efeito de 0,5 mM de tiopental sobre o potencial de membrana da célula beta na presença de 2,8 mM de glicose. A barra horizontal indica a mudança de 11,1 mM para 2,8 mM de glicose no meio perfusor. As setas e $\uparrow$ indicam respectivamente a introdução e a remoção de 0,5 mM de tiopental do meio perfusor. As deflexões do traçado se devem à injeção de pulsos de corrente (0,1 nA; 900 ms) para a avaliação da resistência elétrica da membrana. Note-se que alguns pulsos despolarizantes induziram a deflagração de potenciais de ação (*). Foram utilizados apenas o valor das deflexões do potencial de membrana provocados pelos pulsos hiperpolarizantes para a avaliação da resistência da membrana. Foram omitidos 4 minutos e 20 segundos do traçado entre a remoção do tiopental e a recuperação da atividade elétrica induzida por 11,1 mM de glicose.

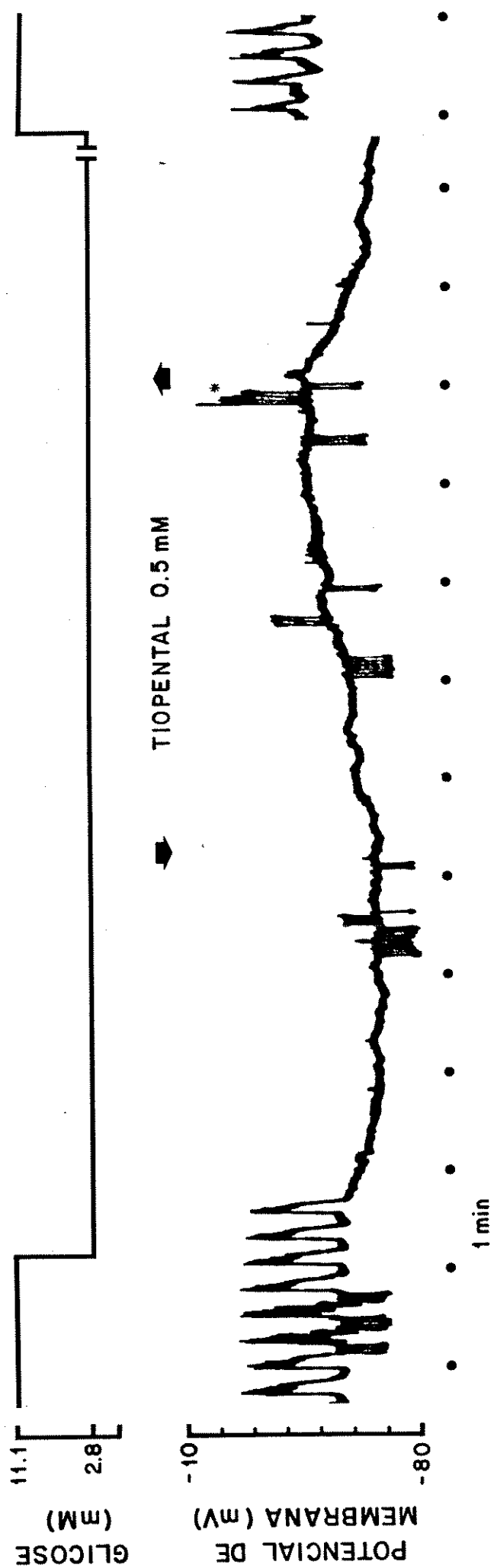
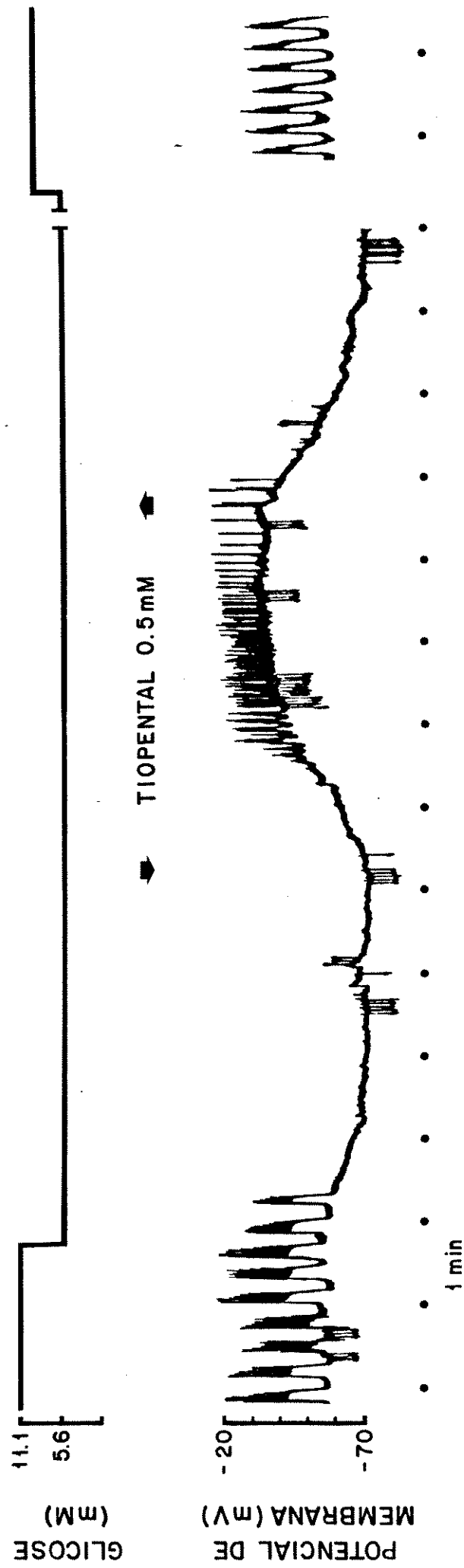


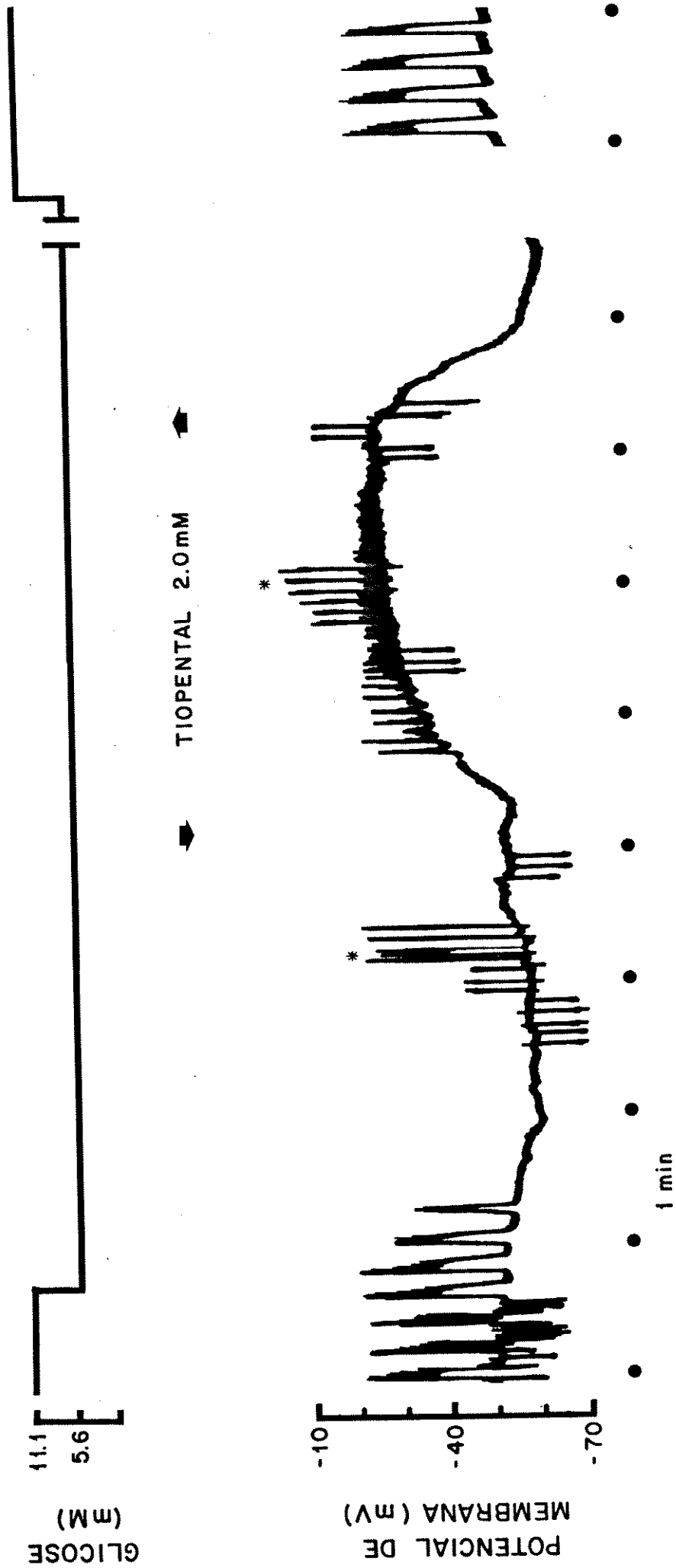
FIGURA 7. Efeito de 0,5 mM de tiopental sobre o potencial de membrana da célula beta na presença de 5,6 mM de glicose. Os níveis da barra horizontal indicam os valores da concentração de glicose na solução perfusora durante o experimento. As setas $\uparrow$ e $\uparrow$ indicam, respectivamente, a introdução e a remoção de 0,5 mM de tiopental do meio perfusor. Foram omitidos dos 9 minutos de traçado entre a remoção do tiopental e a recuperação da atividade elétrica padrão induzida por 11,1 mM de glicose. As deflexões do traçado se devem à injeção de pulsos de corrente (0,05 nA; 900 ms) para a avaliação da resistência da membrana.



vocou uma lenta e progressiva despolarização da membrana que, após 1 minuto e 20 segundos, atingiu aproximadamente -47 mV. A partir de então, ocorreram sucessivos surtos de potenciais de ação, que lembram os "bursts". Porém, a membrana continuou a ser despolarizada e, aproximadamente no potencial de -40 mV, os potenciais de ação passaram, inicialmente, a ser deflagrados com elevada frequência (durante 1 minuto e 20 segundos), reduzindo-se gradativamente até a retirada da droga. Após a retirada do tiopental do meio perfusor a célula hiperpolarizou, atingindo -70 mV, em 2 minutos e 30 segundos. Quando foi reintroduzido $11,1$ mM de glicose na câmara de perfusão, a célula exibiu novamente sua atividade elétrica padrão.

Na figura 8 se observa que a redução de concentração de glicose provocou a hiperpolarização da membrana -50 mV para -60 mV. A introdução de $2,0$ mM de tiopental promoveu uma contínua despolarização da membrana, sendo que, 36 segundos após, o potencial de membrana era de -44 mV. Ocorreram então surtos de potenciais de ação semelhantes aos "bursts". O potencial de repolarização máximo, ocorrido após cada surto de potenciais de ação, teve valor cada vez menos negativo. Aos 68 segundos da introdução de tiopental, atingiu aproximadamente -32 mV, e os potenciais de ação passaram a ser deflagrados de forma contínua. A despolarização, entretanto, continuou até atingir -27 mV. Observe-se que, o potencial de reversão dos potenciais de ação manteve o mesmo valor, durante todo o período em que a célula esteve eletricamente ativa (2 minutos e 10 segundos), na presença do tiopental. O valor do potencial de reversão foi semelhante ao dos potenciais de ação de maior amplitude induzidos por $11,1$ mM de glicose.

FIGURA 8. Efeito de 2,0 mM de tiopental sobre o potencial de membrana da célula beta na presença de 5,6 mM de glicose. As variações na concentração de glicose na solução perfusora estão indicadas pela barra horizontal acima do traçado. As setas $\uparrow$ e $\downarrow$ indicam, respectivamente, a introdução e a remoção de 2,0 mM de tiopental do meio perfusor. Foram omitidos 6 minutos do traçado entre a remoção do tiopental e a recuperação da atividade elétrica padrão induzida por 11,1 mM de glicose. As deflexões do traçado se devem à injeção de pulsos de corrente (0,05 e 0,1 nA; 900 ms). Note - se que alguns pulsos despolarizantes promoveram a deflagração de potenciais de ação (*). Para a avaliação da resistência da membrana foi utilizado apenas o valor das deflexões hiperpolarizantes do potencial de membrana (0,05 nA, 900 ms).



4. EFEITO DO TIOPENTAL SOBRE A ATIVIDADE ELÉTRICA DA CÉLULA BETA INDUZIDA POR 11,1 mM DE GLICOSE.

A figura 9 mostra que 2,0 mM de tiopental modificou a atividade elétrica padrão induzida por 11,1 mM de glicose. Esta célula gerava 5 "bursts" por minuto, com $V_r = 48$ mV e $V_p = -40$ mV. Com a introdução de 2,0 mM de tiopental, a sucessão de "bursts" foi substituída pela deflagração contínua de potenciais de ação, cujo potencial de repolarização máximo foi gradualmente menos negativo. Após 1 minuto e 30 segundos da introdução da droga, o potencial de membrana na base dos potenciais de ação se estabilizou em -20 mV. O potencial de reversão manteve-se no mesmo nível que o dos potenciais de ação de maior amplitude, durante o período controle.

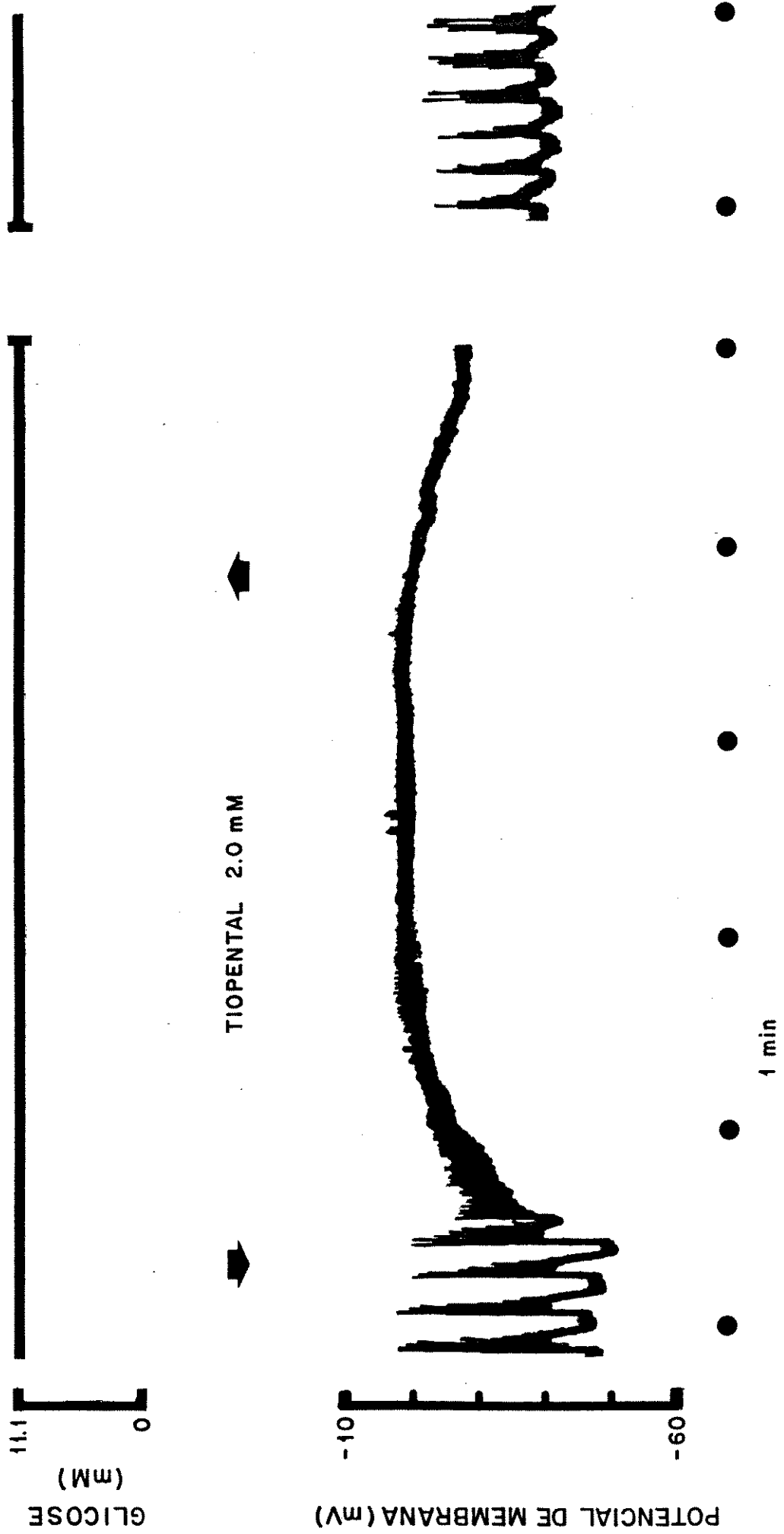
Após a remoção do barbitúrico do meio perfusor, teve início uma lenta repolarização da célula. A atividade elétrica padrão voltou a ser exibida após 9 minutos, com frequência de 5,5 "bursts" por minuto ($V_r = -42$ mV e $V_p = -38$ mV). A figura 9 é representativa das observações realizadas em duas células beta.

5. EFEITO DO 2,4-DINITROFENOL (DNP) SOBRE A ATIVIDADE ELÉTRICA DA CÉLULA BETA INDUZIDA POR 11,1 mM DE GLICOSE E 0,5 mM DE TIOPENTAL.

A figura 10 ilustra o efeito do DNP sobre a atividade elétrica induzida por 11,1 mM de glicose na ausência e na presença de 0,5 mM de tiopental, em três células beta de diferentes ilhotas.

Pode-se observar que o 2,4-DNP inibiu a ativi-

FIGURA 9. Efeito de 2,0 mM de tiopental sobre a atividade elétrica da célula beta induzida por 11,1 mM de glicose. As setas $\downarrow$ e $\uparrow$ indicam, respectivamente, a introdução e a remoção de 2,0 mM de tiopental do meio perfusor. Foram omitidos 10 minutos do traçado entre a remoção do tiopental e a recuperação da atividade elétrica padrão induzida por 11,1 mM de glicose.

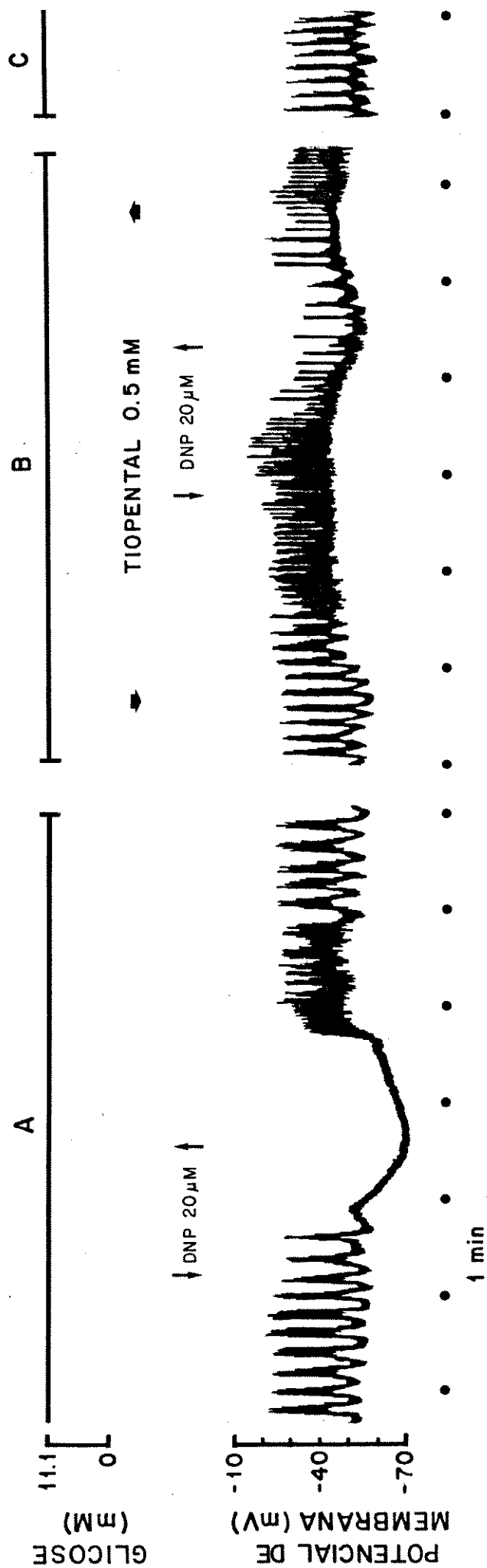


dade elétrica padrão induzida por 11,1 mM de glicose e provocou hiperpolarização da membrana de -56 mV para -70 mV, em 1 minuto e 20 segundos, período este em que a droga foi mantida na solução perfusora. Entretanto, antes da hiperpolarização ocorreram ainda dois "bursts", cuja duração foi aproximadamente igual aos anteriores. Contudo os potenciais de ação foram de menor amplitude e menor frequência. A seguir, ocorreu ainda uma onda de despolarização, com uma amplitude de 8 mV, sucedida por uma crescente hiperpolarização de membrana. Removido o DNP da câmara de perfusão, teve lugar uma lenta e progressiva despolarização; após 1 minuto e 10 segundos o valor do potencial de membrana atingiu -55 mV. A seguir, a célula exibiu uma resposta bifásica, análoga àquela que se observa quando 11,1 mM de glicose é introduzida na câmara de perfusão (cfr. fig. 2).

Depois de 6 minutos de atividade estável, 0,5mM de tiopental foi introduzido na perfusão, alterando a atividade elétrica padrão, induzida por 11,1 mM de glicose (frequência = 5 "bursts"/minuto; $V_r = 52$ mV; $V_p = 45$ mV), para uma atividade contínua após 1 minuto, o potencial de membrana, ao pé dos potenciais de ação, era de -42 mV.

Com a introdução no meio perfusor de DNP ocorreu um aumento do potencial de membrana de -42 mV para -50 mV, 50 segundos após. Entretanto, potenciais de ação continuaram a ser deflagrados, embora com menor frequência. A remoção do DNP da solução perfusora permitiu a despolarização da célula beta. Esta exibiu inicialmente, potenciais de ação agrupados à semelhança de "bursts". Após 1 minuto e 30 segundos da remoção do DNP, instalou-se uma atividade contínua, análoga à existente antes da introdução do inibidor metabólico. O retorno à ati-

FIGURA 10. Efeito de 20 μ M de 2,4-dinitrofenol sobre a atividade elétrica da célula beta induzida por 11,1 mM de glicose e por 11,1 mM de glicose mais 0,5 mM de tiopental. As setas $\uparrow$ e $\uparrow$ indicam, respectivamente, a introdução e a remoção de 20 μ M de DNP e 0,5 mM de tiopental do meio perfusor. Foram omitidos, respectivamente, 3 e 6 minutos de traçado, entre os segmentos A e B e B e C do registro.



vidade padrão, em 11,1 mM de glicose, está representada no segmento C da figura 10. Esta se iniciou 5 minutos após a retirada do tiopental da solução perfusora.

6. EFEITO DO TIOPENTAL SÔBRE A RESISTÊNCIA DA MEMBRANA DE CÉLULA BETA À INJEÇÃO DE CORRENTE.

A figura 11 mostra o efeito de 0,5 e 1,0 mM de tiopental sobre a resistência da membrana na ausência de glicose. Os resultados apresentados são representativos do que foi observado em três células nessas condições experimentais.

A célula, cujo registro do potencial de membrana é mostrado na figura 5b, apresentou uma resistência de $86,4 \pm 0,98 \text{ M}\Omega$, quando a aplicação de pulsos de corrente (0,1 nA, 900 ms), durante o período em que o potencial de membrana se encontrava estável em -60 mV. Após 1 minuto e 20 segundos da adição de 0,5 mM de tiopental ao meio perfusor, a resistência aumentou para $97 \pm 1,0 \text{ M}\Omega$. Durante a aplicação dos pulsos o potencial de membrana era de -52 mV. Em seguida à remoção do barbitúrico e à estabilização do potencial de membrana em -63 mV, a resistência foi novamente medida (pulsos de 0,1 nA e 900 ms), apresentando o valor de $73,3 \pm 1,3 \text{ M}\Omega$. Após 6 minutos de perfusão na ausência de glicose, foi introduzido 1,0 mM de tiopental ao meio perfusor (não mostrado na figura 5b), sendo novamente medida a resistência da membrana (pulsos de 0,1 nA e 900 ms), a qual apresentou o valor de $124,9 \pm 2,1 \text{ M}\Omega$. Durante este período o potencial de membrana encontrava-se estável em -47 mV.

A figura 12 apresenta o aumento percentual da resistência da membrana em três células (período de 0,05 e 0,1 nA ,

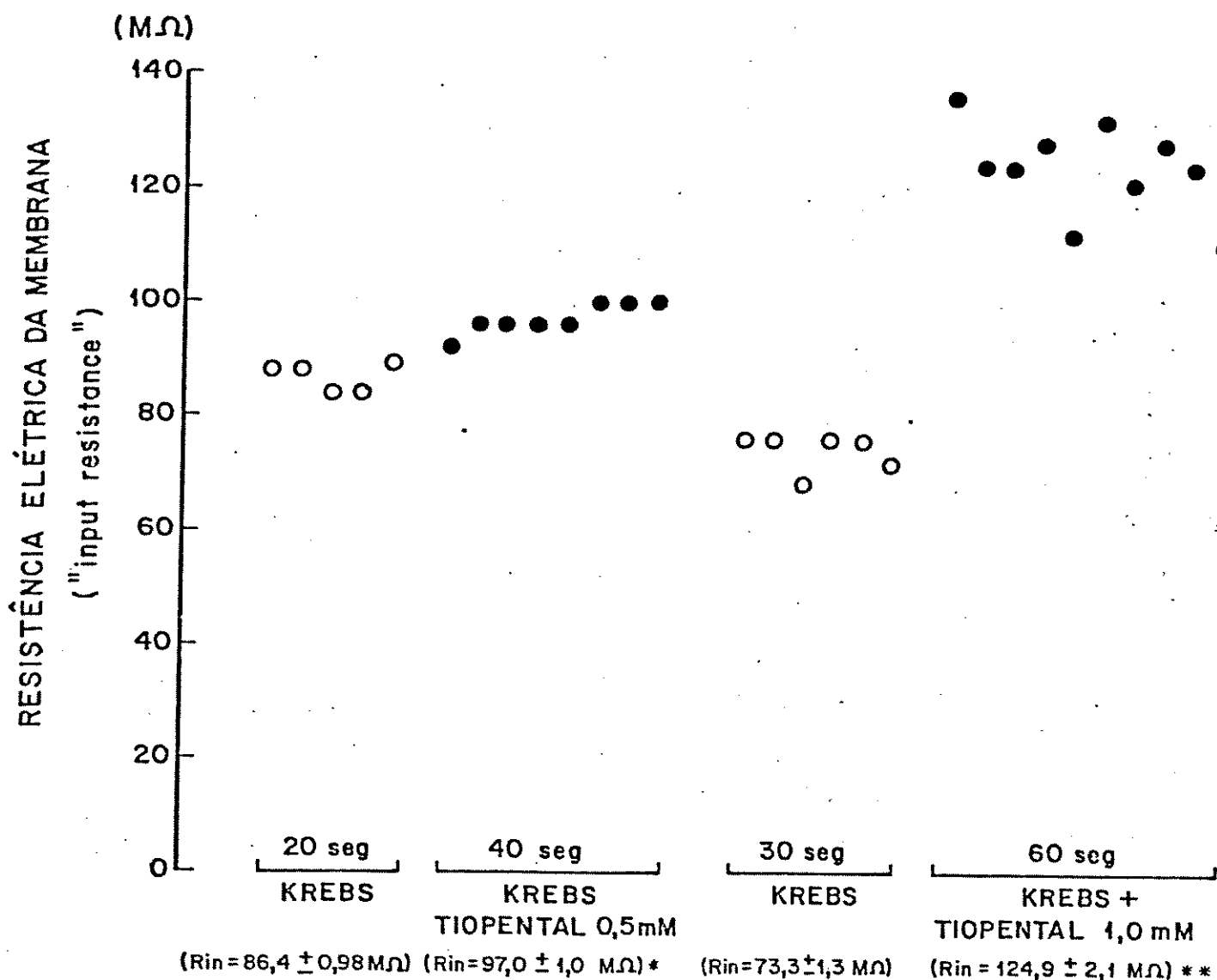


FIGURA 11. Efeito de 0,5 e 1,0 mM de tiopental sobre a resistência da membrana ("input resistance") da célula beta, na ausência de glicose. Cada valor de resistência representado, corresponde à resistência da membrana calculada a partir da variação do potencial de membrana, provocada pela injeção de pulsos de corrente (0,1 nA; 900 ms). O tempo anotado para cada situação experimental se refere ao período em que foram realizadas as medidas da resistência da membrana. Rin corresponde ao valor da resistência da membrana e respectivo erro padrão, para cada situação experimental. A resistência da membrana induzida por tiopental foi comparada à da respectiva situação controle (KREBS). * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$.

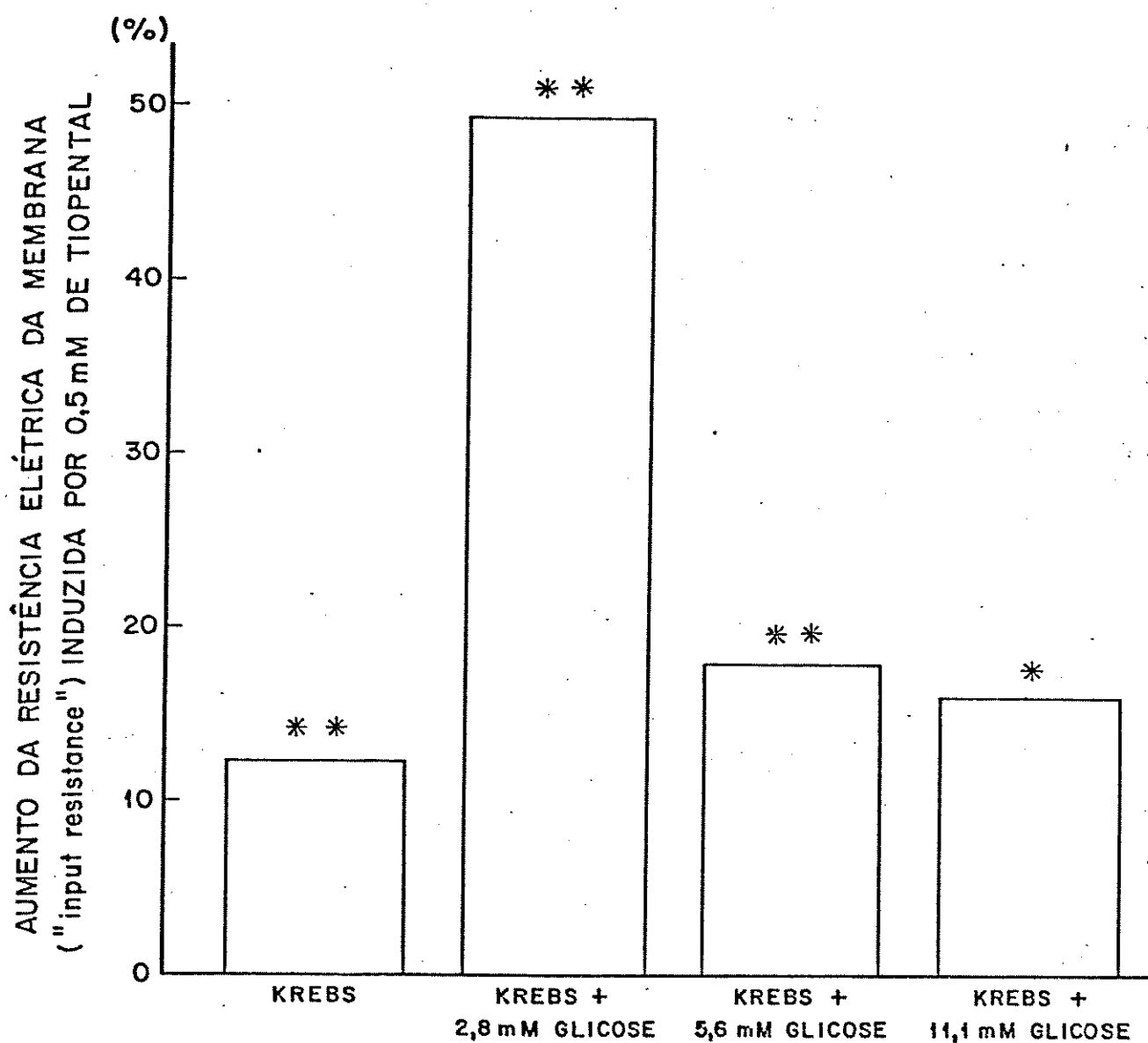


FIGURA 12. Aumento da resistência da membrana ("input resistance") da célula beta, induzida por 0,5 mM de tiopental, na ausência e em presença de 2,8 , 5,6 e 11,1 mM de glicose. Apresenta-se o aumento percentual da resistência da membrana, considerando os valores registrados na ausência e na presença de 0,5 mM de tiopental em cada situação experimental a que foram submetidas as 3 células estudadas. * $p < 0,01$; ** $p < 0,01$.

900 ms), provocadas por 0,5 mM de tiopental na ausência e em presença de 2,8 , 5,6 e 11,1 mM de glicose.

Na ausência de glicose 0,5 mM de tiopental elevou em 12,3% ($p < 0,001$) a resistência da membrana. Na presença de 2,8 , 5,6 e 11,1 mM de glicose, a introdução do tiopental no meio perfusor provocou a elevação da resistência em 49,2% ($p < 0,001$), 17,9 ($p < 0,001$) e 16% ($p < 0,01$), respectivamente. Pode-se notar a atenuação do efeito do tiopental em presença de concentrações mais altas de glicose.

Como pode ser observado nas figuras 5c, 6, 7 e 8, os pulsos despolarizantes induziram, por vezes, a deflagração de potenciais de ação. Por esta razão, para o cômputo da resistência, foram utilizados apenas os valores de variação do potencial de membrana produzidos pelos pulsos de corrente hiperpolarizante.

7. EFEITO DE 0,5 E 2,0 mM DE TIOPENTAL SOBRE O EFLUXO DE ^{45}Ca EM ILHOTAS DE LANGERHANS ISOLADAS DE RATOS.

Grupos de 80-150 ilhotas, previamente marcadas com ^{45}Ca , foram perfundidas com solução de Krebs sem glicose por 80 minutos. A introdução de 0,5 mM de tiopental no meio perfusor sem glicose, entre o 45º e o 65º minutos, produziu elevação significativa do efluxo do radioisótopo apenas nos minutos 56º, 58º e 62º (Fig. 13; Tabela 1, linha 1). Em presença de 4,0 mM de glicose, o tiopental (0,5 mM) não alterou significativamente o efluxo de ^{45}Ca das ilhotas, durante todo o período em que esteve presente no meio perfusor (Fig. 14; Tabela 1, linha 2).

Por outro lado, quando as ilhotas foram perfun-

FIGURA 13. Efeito da adição de 0,5 mM de tiopental sobre o efluxo de ^{45}Ca em ilhotas pancreáticas isoladas. As ilhotas foram perfundidas por 80 minutos na ausência de glicose. As linhas tracejadas verticais indicam a introdução (45º minuto) e a remoção (65º minuto) do tiopental do meio perfusor. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão de 2 observações (N). As observações foram efetuadas com a utilização de 100 ilhotas em cada câmara perfusora.

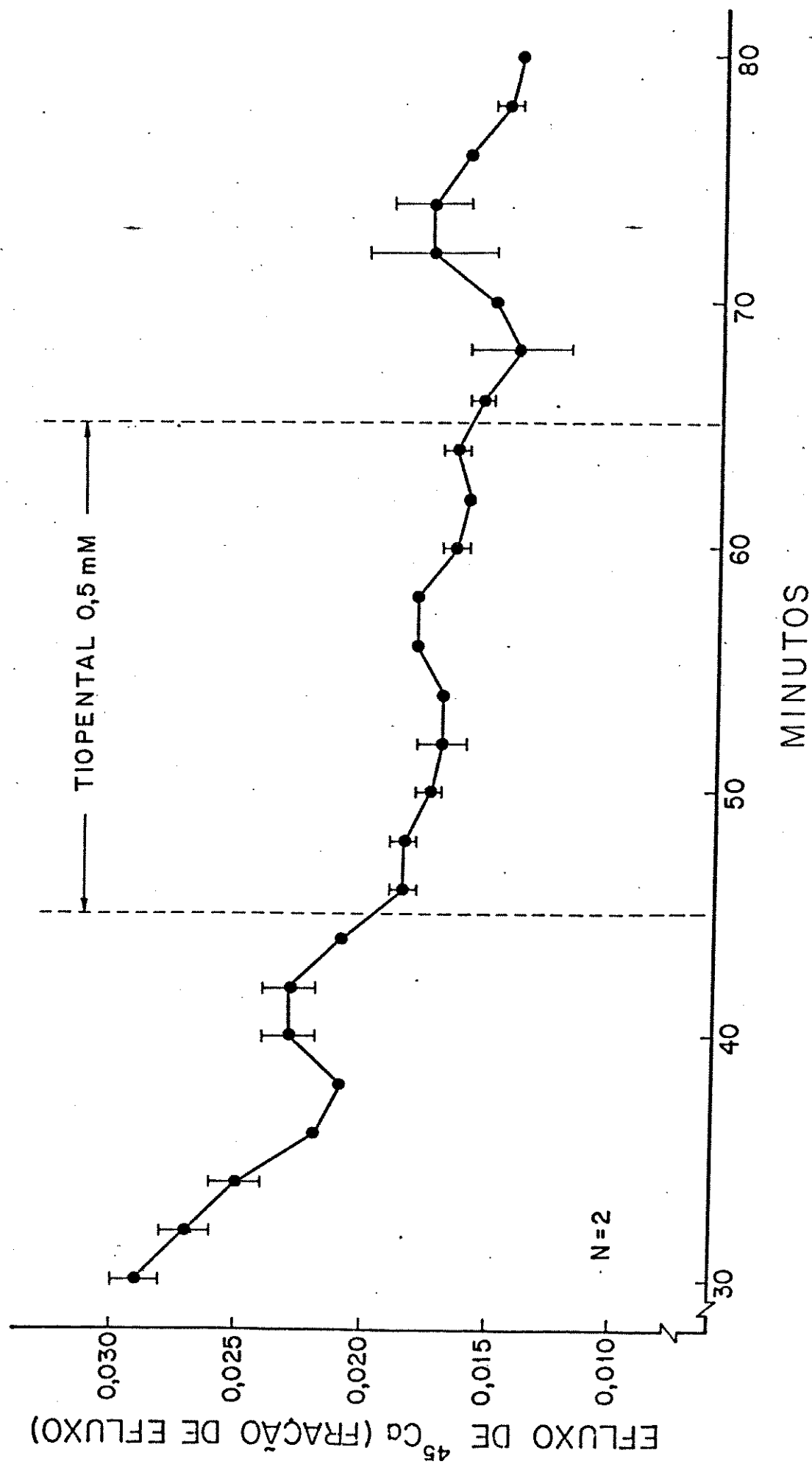
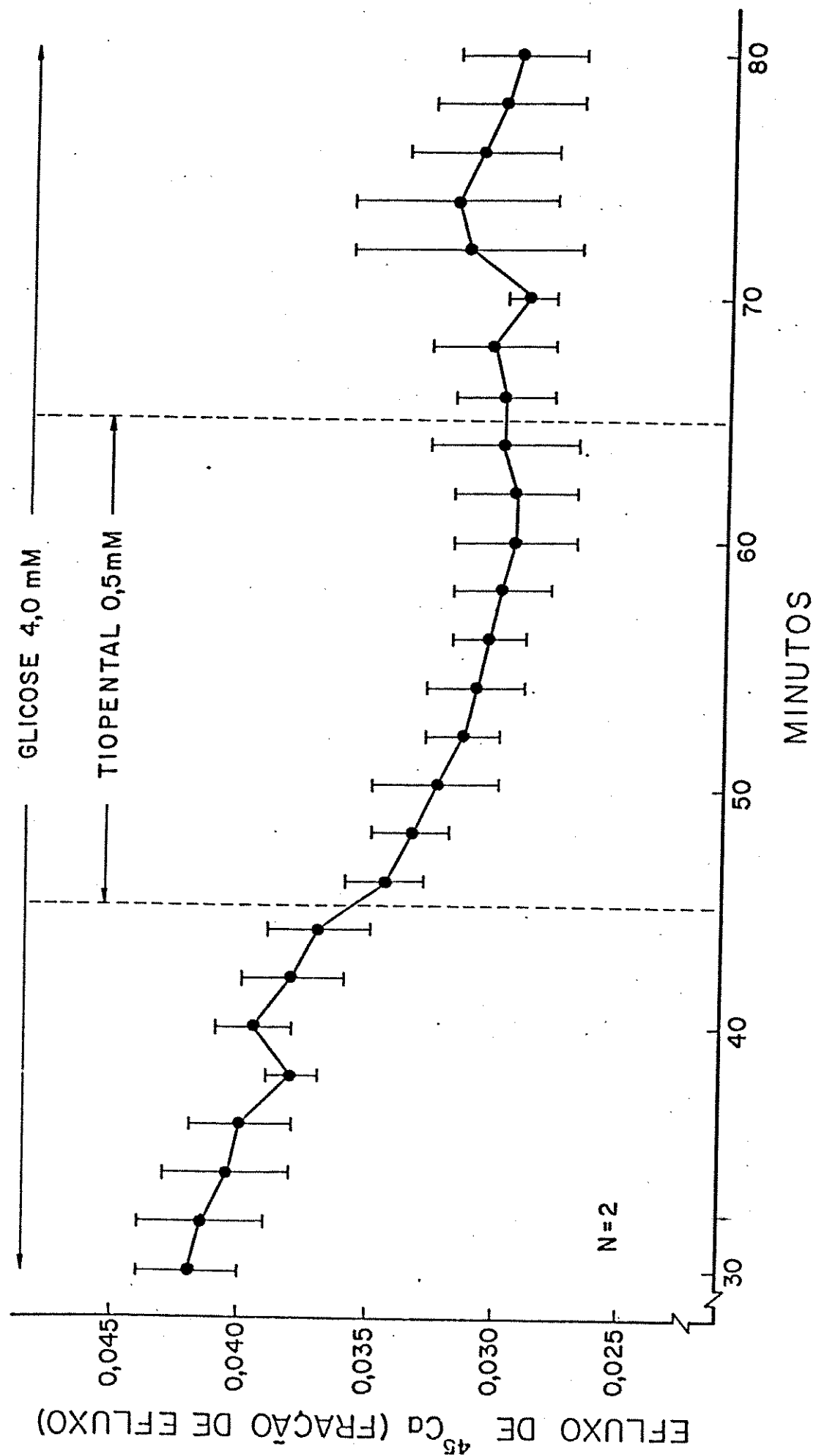


FIGURA 14. Efeito da adição de 0,5 mM de tiopental sobre o efluxo de ^{45}Ca em ilhotas pancreáticas isoladas e perfundidas por 80 minutos na presença de 4,0 mM de glicose. As linhas tracejadas verticais indicam a introdução (45º minuto) e a remoção (65º minuto) do tiopental do meio perfusor. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão de 2 observações (N). As observações foram efetuadas com a utilização de 100 ilhotas em cada câmara de perfusão.



didas com solução de Krebs enriquecida com 5,6 mM de glicose , a introdução de 0,5 mM de tiopental induziu aumento do efluxo de ^{45}Ca (Fig. 15). Os valores da fração de efluxo durante o período de perfusão com tiopental , foram significativamente maiores que os valores teóricos esperados a partir da extrapolação da curva referente ao período controle (Tabela 1, linha 3). Entretanto, observa-se que esse efeito do tiopental se manifestou gradualmente. O efluxo de ^{45}Ca atingiu seu valor máximo entre o 4º e 6º minutos após sua introdução no meio perfusor, reduzindo-se a seguir, também de maneira gradual.

Em outro protocolo experimental, onde as ilhotas também foram perfundidas com solução de Krebs contendo 5,6 mM de glicose, a introdução de 2,0 mM de tiopental produziu uma elevação ainda mais acentuada do efluxo de ^{45}Ca , quando comparada com aquela induzida por 0,5 mM (Fig. 16; Tabela 1, linha 4). Também nestas condições, o aumento do efluxo foi gradual, atingindo seu máximo valor no 8º minuto após a introdução do tiopental. Reduzindo-se, entretanto, de maneira mais abrupta do que a em presença de 0,5 mM de tiopental.

FIGURA 15. Efeito da adição de 0,5 mM de tiopental sobre o efluxo de ^{45}Ca em ilhotas pancreáticas isoladas e perfundidas durante 80 minutos na presença de 5,6 mM de glicose. As linhas tracejadas verticais indicam a introdução (45º minuto) e a remoção (65º minuto) do tiopental do meio perfusor. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão de 4 observações (N). As observações foram efetuadas com a utilização de 80 a 150 ilhotas em cada câmara de per fusão.

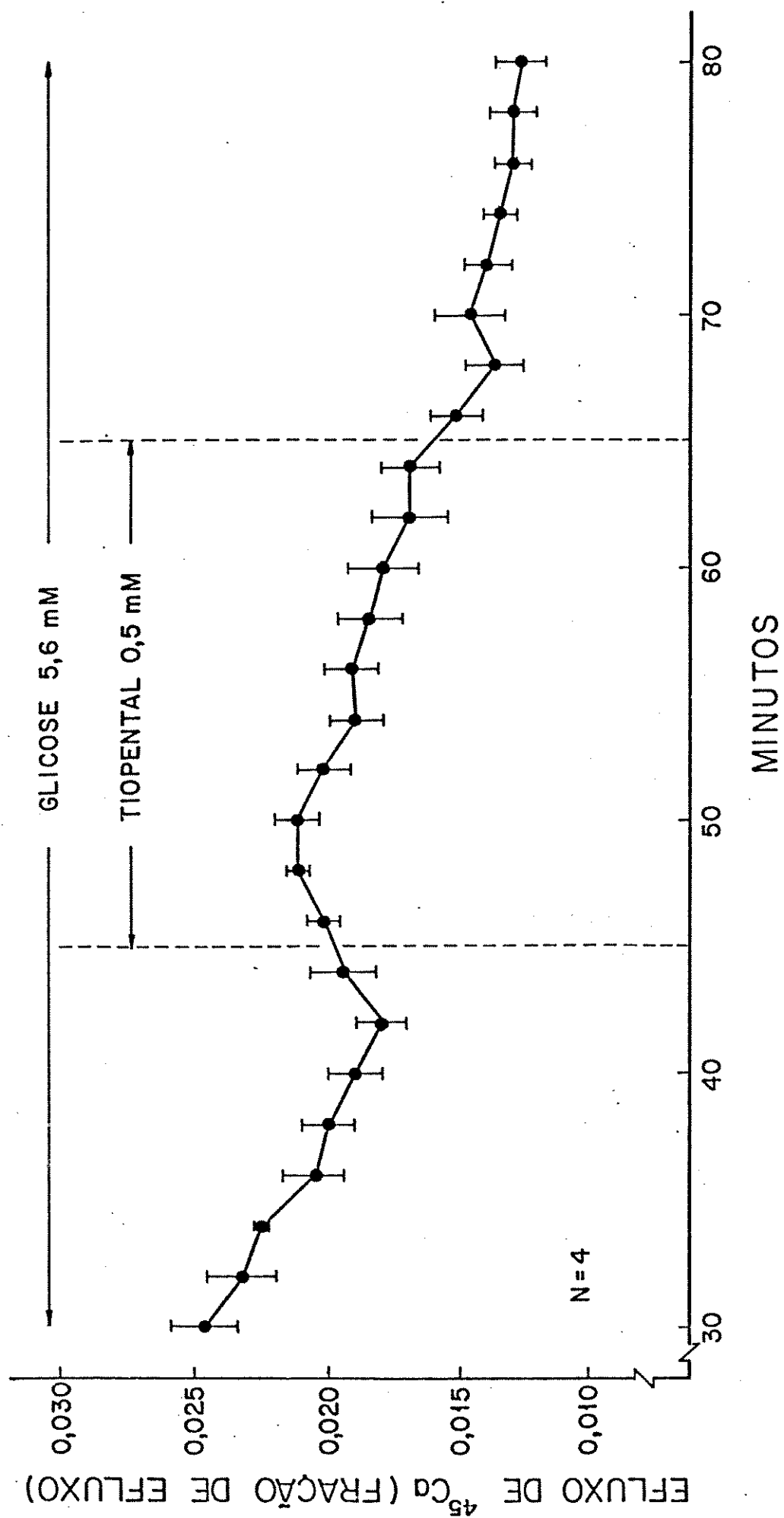
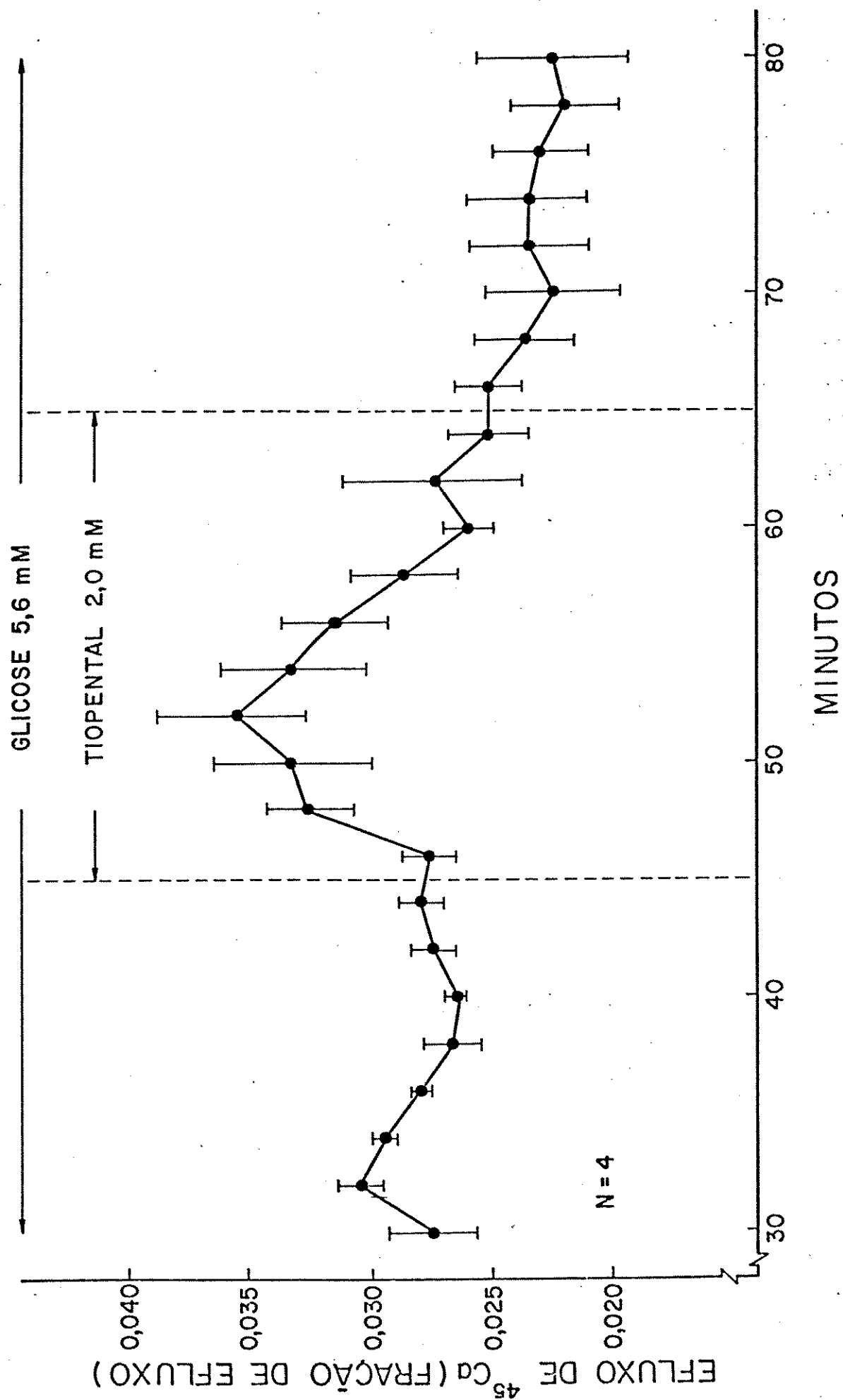


FIGURA 16. Efeito da adição de 2,0 mM de tiopental sobre o efluxo de ^{45}Ca em ilhotas pancreáticas isoladas e perfundidas, durante 80 minutos, na presença de 5,6 mM de glicose. As linhas tracejadas verticais indicam a introdução (45º minuto) e a remoção (65º minuto) do tiopental do meio perfusor. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão de 4 observações (N). As observações foram efetuadas com a utilização de 80 a 150 ilhotas em cada câmara de perfusão.



T A B E L A I

Figura Meio de Concentração Perfusão de Tiopental (mM)		46°	48°	50°	52°	54°	56°	58°	60°	62°	64°
13	KREBS 0,5	ns	ns	ns	ns	ns	*	**	ns	*	ns
14	KREBS + Glicose 4,0 mM	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
15	KREBS + Glicose 5,6 mM	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
16	KREBS + Glicose 5,6 mM	*	**	**	**	**	**	**	**	*	**

LEGENDA: Avaliação estatística das frações de efluxo de ^{45}Ca observadas nas figuras 13, 14, 15 e 16. A coluna "Meio de Perfusão", indica as condições experimentais aplicadas durante os 80 minutos de perfusão. A coluna seguinte indica a concentração de tiopental introduzida no meio de perfusão entre 0 45° e 65° min. As colunas subseqüentes indicam a significância das diferenças entre os valores teóricos (obtidos a partir da extrapolação dos valores da fração de efluxo de ^{45}Ca registrados entre o 30° e o 44° min. de perfusão) e os reais observados durante o período em que o tiopental esteve presente no meio (45° ao 65° min.). (ns) não significativa para $p > 0,01$ (*) significativa para $0,01 \geq p > 0,005$; (**) significativa para $0,005 \geq p \geq 0,0005$

V. DISCUSSÃO

Grande parte dos conhecimentos relativos à participação de K^+ e Ca^{2+} no mecanismo de secreção de insulina pelas células beta do pâncreas, foi obtido através do emprego de ionóforos e bloqueadores de permeabilidade aos referidos íons (HELLMAN, 1975; HENQUIN & LAMBERT, 1975; KARL, et alii, 1975; SEHLIN & TALJEDAL, 1975; MALAISSE & BOSCHERO, 1977; ATWATER, 1980a; DELATTRE, et alii, 1982; BOSCHERO, et alii, 1983a; FERRER, et alii, 1984) ..

Estudos sobre a ação dos barbitúricos em células nervosas, têm mostrado que estas substâncias modificam a permeabilidade da membrana plasmática aos íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , tanto a nível sináptico como axonal (para revisão veja SEEMAN, 1972; ROTH, 1979 e HO & HARRIS, 1981).

Considerando tais observações, nos propusemos investigar os efeitos do tiopental sobre a permeabilidade a K^+ e Ca^{2+} na célula beta, através da análise das alterações induzidas por esse tiobarbitúrico sobre a sua atividade elétrica e o efluxo de ^{45}Ca .

Procuramos primeiramente caracterizar a padrão da atividade elétrica da célula beta. Conforme exemplificado nas figuras 2 e 3, em presença de 11,1 mM de glicose todas as células por nós utilizadas no presente trabalho apresentaram uma atividade elétrica característica, de acordo com o reportado por diversos autores (DEAN & MATTHEWS, 1968; MEISSNER & SCHMELZ, 1974; MATTHEWS & SAKAMOTO, 1975; MEISSNER & ATWATER, 1976; ATWATER et alii, 1978; ATWATER, et alii, 1982; BOSCHERO, GONÇALVES, DAWSON, ATWATER & MALAISSE, 1982; BOSCHERO et alii, 1983a; PACE, et alii, 1983; HENQUIN & MEISSNER, 1984a). A

variação da frequência de "bursts" (2-5 por minuto), verificada em células beta de diferentes ilhotas, também foi observada por ATWATER, DAWSON, SCOTT, EDDLESTONE & ROJAS (1980) e MEDA et alii (1984). Segundo ATWATER & RINZEL (1986), esta parece estar relacionada à capacidade de tamponamento de Ca^{2+} intracelular, a qual dependente do estado metabólico da célula. Corroborando o descrito por MEISSNER & ATWATER (1976) e ATWATER & BEIGELMAN (1976), a remoção da glicose do meio perfusor aboliu a atividade elétrica após 60 a 90 segundos (Fig. 4). A despolarização da membrana, com a indução de uma resposta bifásica após a introdução de 11,1 mM de glicose, foi também semelhante ao observado por diversos autores (para revisão veja: MEISSNER et alii, 1979; ATWATER, 1980a; BOSCHERO et alii, 1984).

Uma vez reconhecida a célula beta através da atividade elétrica induzida pela glicose (11,1 mM), passamos a estudar os efeitos do tiopental sobre o potencial e a resistência da membrana à entrada de corrente ("input resistance").

Na ausência de glicose, o tiopental (0,2 - 1,0 mM) reduziu o potencial de membrana de maneira dose dependente. Este efeito começou a ocorrer poucos segundos (5-10) após a introdução da droga no meio, e foi rapidamente revertido pela sua remoção (Fig. 5). Em idênticas condições experimentais, o tiopental elevou a resistência elétrica da membrana, também de maneira dose-dependente (Fig. 11).

A semelhança destes efeitos do tiopental, com aqueles produzidos pela glicose sobre o potencial e a resistência elétrica da membrana, e a rapidez com que foram induzidos sugerem que essa droga possa estar atuando diretamente sobre a membrana, bloqueando a permeabilidade da célula beta ao K^+ .

ATWATER et alii (1978); MEISSNER et alii (1979) e

BOSCHERO et alii (1983 a) demonstraram que o potencial de membrana das células beta é dependente da permeabilidade da membrana ao K^+ . ATWATER et alii (1978) e ATWATER (1980a) observaram que o fenômeno da despolarização da célula beta, induzida pela glicose, associada ao aumento da resistência elétrica da membrana, concordava com a ação bloqueadora desse secretagogo sobre o efluxo de K^+ , constatada por diversos pesquisadores (SEHLIN & TALJEDAL, 1974, 1975; BOSCHERO et alii, 1977; BOSCHERO & MALAISSE, 1979; HENQUIN, 1979, 1980). Estes sugeriram que a despolarização da membrana da célula beta é precipitada por uma redução da sua permeabilidade ao K^+ . De fato, ATWATER et alii (1978) e ATWATER (1980a), confirmaram esta hipótese, mostrando que na ausência de glicose, o potencial de membrana pode ser descrito por uma equação de campo constante (GOLDMAN, 1943; HODGKIN & KATZ, 1949, apud ATWATER, 1980a), onde a razão PK/PNa assume o valor 30, ao passo que durante a atividade elétrica induzida por 11,1 mM de glicose, ela assume os valores 15 na fase silente e 7 na fase ativa. Resultados semelhantes também foram observados por MEISSNER et alii (1979).

Também para os barbitúricos tem sido atribuído um efeito bloqueador da permeabilidade ao K^+ em diversos tecidos (BLAUSTEIN, 1968; NARAHASHI et alii, 1969; NEUMAN & FRANK, 1977; SCHWARZ, 1979; SEVCIK, 1980; ARHEM & KRISTBJARNARSON, 1981, 1985; GONÇALVES, et alii, 1982). Particularmente, SEVCIK (1980) mostrou que o tiopental induziu despolarização e elevação da resistência elétrica da membrana de axônios de lula de maneira dose dependente, e descargas repetitivas de potenciais de ação em 0,5 mM. Mostrou ainda que esse barbi-

tórico é capaz de bloquear a corrente de K^+ nestes axônios , sugerindo que esta droga atua sobre canais de K^+ , impedindo a elevação de sua condutância.

Em ilhotas isoladas de rato, DIAS (1984) verificou que o tiopental potencializou a secreção de insulina induzida por 6,0 mM de glicose. Analisando o efeito da droga sobre a permeabilidade ao K^+ (usando ^{86}Rb como traçador), observou que o tiopental (0,2 mM) reduziu o efluxo de ^{86}Rb , tanto na ausência como na presença de 6,0 mM de glicose, indicando uma ação bloqueadora do tiopental sobre a permeabilidade ao K^+ na célula beta. Sugeriu então, que isto dever-se-ia a uma ação direta da droga sobre a membrana, já que a redução do efluxo de ^{86}Rb manifestou-se mesmo na presença de Menadione, substância aceptora de H^+ , que reduz a formação de $\text{NAD(P)}H^+$ nas células beta e inibe sua atividade elétrica em presença de glicose (MALAISSE et alii, 1978a; BOSCHERO, GONÇALVES, DAWSON, ATWATER & MALAISSE, 1982).

Portanto, o efeito do tiopental sobre o potencial e a resistência elétrica da membrana da célula beta, através do bloqueio de sua permeabilidade ao K^+ , parece ter apoio nas observações prévias.

Como já expusemos na introdução, tem sido proposta a existência de três tipos de permeabilidade ao potássio na célula beta, as quais dependem respectivamente, do potencial de membrana, $(PK(V))$, da concentração intracelular de cálcio $(PK(\text{Ca}^{2+})_i)$ e da concentração intracelular de ATP $(PK(\text{ATP})_i)$ (ATWATER et alii, 1983 ; COOK & HALES, 1984). Assim sendo, sobre qual(is) delas o tiopental estaria atuando?

ATWATER et alii (1979b) verificaram que a tetraetilamônia (TEA), substância bloqueadora da permeabilidade ao potássio sensível à voltagem, não induziu alterações no valor

do potencial de repouso e da resistência elétrica da membrana da célula beta, na ausência de glicose. Isto ocorreu mesmo em presença de alta concentração de tetraetilamônia (20 mM).

Os efeitos que observamos, quando da aplicação do tiopental, divergem daqueles obtidos em presença de TEA por ATWATER et alii (1979b), BOSCHERO et alii (1983a).

Foi reportado ainda, que em presença de concentrações sublimiares de glicose, a tetraetilamônia induziu a deflagração de potenciais de ação, modificando a atividade elétrica padrão provocada por 11,1 mM de glicose, em atividade elétrica contínua. Os potenciais de ação induzidos então por essa droga ultrapassaram zero mV (ATWATER et alii, 1979b).

Nossos experimentos também mostraram que o tiopental potencializou o efeito despolarizante de concentrações sublimiares de glicose (2,8 e 5,6 mM) e intensificou a atividade elétrica induzida por 11,1 mM deste secretagogo (Figs. 6, 7, 8 e 9). A despolarização foi tanto mais intensa quanto maiores as concentrações de glicose e/ou tiopental. Além disso, em presença de 5,6 mM de glicose, o tiopental (0,5 e 2,0 mM) induziu deflagração de potenciais de ação, quando o potencial de membrana atingiu valores próximos ao potencial de platô da atividade elétrica padrão (Fig. 7 e 8). Entretanto, diversamente ao que foi observado por ATWATER et alii (1979b), constatamos que os potenciais de ação induzidos pelo tiopental, mesmo em alta concentração (2,0 mM) e na presença de 11,1 mM de glicose, apresentaram sempre potencial de reversão negativo (Fig. 9). Ainda, a deflagração desses potenciais de ação ocorreu concomitantemente a um deslocamento da linha de base no sentido despolarizante (Fig. 9).

Assim, corroborando o proposto por SEVCIK (1980)

e DIAS (1984), as diferenças entre os efeitos do tiopental e da tetraetilamônia sobre a atividade da célula beta, sugerem que este tiobarbitúrico esteja atuando sobre permeabilidades ao potássio não sensíveis à voltagem.

ATWATER et alii (1979a) e ATWATER et alii (1983) propuseram que na ausência de glicose, o potencial de membrana é controlado predominantemente pela permeabilidade de potássio dependente da concentração intracelular de cálcio. Esta hipótese tem apoio nas observações de que drogas bloqueadoras deste tipo de permeabilidade, tais como quinina e glibenclamida, induzem despolarização, elevação da resistência elétrica da membrana e deflagração de potenciais de ação pela célula beta, mesmo na ausência de glicose.

Considerando que, analogamente à quinina e glibenclamida (ATWATER et alii, 1978; FERRER et alii, 1984), o tiopental também induziu despolarização, elevação da resistência da membrana de maneira dose dependente, e deflagração de potenciais de ação na ausência de glicose, é plausível supor uma ação bloqueadora do tiopental sobre a PK (Ca^{2+})i nas células beta.

De fato, em presença de 5,6 mM de glicose, os potenciais de ação induzidos pelo tiopental (0,5 e 2,0 mM) inicialmente se agruparam em surtos semelhantes a "bursts", e somente à medida que a membrana se despolarizava é que se desenvolvia uma atividade elétrica contínua (Figs. 7 e 8). Se considerarmos que o padrão cíclico, ou contínuo da atividade elétrica da célula beta é determinada pela intensidade do bloqueio desse tipo de permeabilidade pela glicose, de maneira proporcional à sua concentração (ATWATER et alii 1983; ATWATER & RINZEL, 1986), esse efeito do tiopental parece refletir uma

intensificação de sua ação bloqueadora sobre a $PK(Ca^{2+})_i$ no decorrer do tempo.

Ainda, similarmente ao que foi constatado por ATWATER et alii (1979a) e FERRER et alii (1984) com quinina e glibenclamida, verificamos que a atividade elétrica contínua induzida por 0,5 mM de tiopental, na presença de 11,1 mM de glicose, foi só parcialmente revertida pela introdução de 20 μ M de 2,4 - dinitrofenol (DNP), um desacoplador da fosforilação oxidativa. Tem sido observado que o DNP promove a liberação de Ca^{2+} dessas organelas celulares, provocando assim uma elevação de sua concentração citosólica. Desta forma a hiperpolarização da célula beta, com a consequente inibição da atividade elétrica induzida por 11,1 mM de glicose, seria decorrente da ativação da $PK(Ca^{2+})_i$ (ROJAS & HIDALGO, 1968; ATWATER et alii (1980). Portanto o tiopental parece antagonizar esse efeito do DNP bloqueando a $PK(Ca^{2+})_i$.

Entretanto a ação do DNP na célula beta, além de promover aumento do cálcio citosólico, também reduz a produção de ATP pelas mitocôndrias. COOK & HALES (1984) recentemente identificaram canais de K^+ na célula beta que são rápida e reversivelmente bloqueados por ATP intracelular. Este canal é o mesmo indicado por ASHCROFT et alii (1984), sujeito ao bloqueio pela glicose. COOK & HALES (1984) propuseram então que a hiperpolarização da célula beta, induzida por venenos metabólicos, tais como DNP, poderia ser atribuída também a queda do nível de ATP celular e, conseqüentemente, à ativação de uma $PK(ATP)_i$. Além disso, sugeriram que a despolarização e a redução do efluxo de ^{86}Rb , observado com quinina, pode ser parcialmente atribuído a um bloqueio dos canais $GK(ATP)_i$ por esta droga.

Desta forma, cabe considerar a possibilidade de que o tiopental possa estar produzindo seus efeitos também a través de uma ação bloqueadora sobre a permeabilidade ao potássio, controlada pelo nível de ATP celular.

KYOGOKU, LORD & RICH (1968), considerando a semelhança existente entre as moléculas dos compostos barbitúricos e as bases nitrogenadas, e sua grande afinidade por estabelecer pontes de hidrogênio com adenina e seus derivados, propuseram que tais características químicas dos barbitúricos, poderiam explicar muitos dos seus efeitos biológicos.

Estudos sobre os efeitos dos barbitúricos nas sinapses, tem evidenciado que eles são capazes de interagir com receptores específicos de diversos neurotransmissores na membrana pós-sináptica (HO & HARRIS, 1981).

A partir da década de 70, foram obtidas inúmeras evidências da existência de receptores específicos para ATP e derivados da adenina na membrana de neurônios, onde tais substâncias podem atuar como neurotransmissores ou neuromoduladores (para revisão veja STONE, 1981 e SU, 1983). Recentemente LOHSE et alii (1984) verificaram que o pentobarbital, hexobarbital e meforbital se ligaram a receptores específicos de adenosina em membranas de neurônios de cérebro de rato.

A ação direta do ATP, bloqueando a permeabilidade ao K^+ na célula beta, evidenciada pela técnica de "patch clamp" (COOK & HALES, 1984), sugere a possibilidade de uma interação do ATP com prováveis receptores de membrana ai presentes. Desta forma, considerando o exposto acima, no que tange à capacidade de interação dos barbitúricos com os receptores de adenosina e à semelhança entre as duas células, não se pode excluir a possibilidade da ação do tiopental análoga à do ATP,

atuando sobre receptores deste composto na membrana da célula beta.

Com relação ao papel do cálcio na eletrofisiologia da célula beta, ele é reconhecido como responsável pelos potenciais de ação (MEISSNER & PREISSLER 1979; ATWATER, 1980a). Como já nos referimos anteriormente, quando a despolarização induzida por tiopental (0,5 e 2,0 mM), na presença de 5,6 mM de glicose, atingiu valor próximo ao do potencial de platô a célula passou a deflagrar potenciais de ação. Entretanto, aproximadamente após 2 minutos ocorreu uma redução acentuada de sua frequência (Figs. 7 e 8). O aumento da resistência da membrana, induzida por tiopental (0,5 mM), foi menos acentuado em presença de 5,6 e 11,1 mM de glicose do que na ausência ou na presença de 2,8 mM do secretagogo (Fig. 12). Estes resultados parecem refletir uma maior permeabilidade iônica da membrana, o que é compatível com a deflagração de potenciais de ação induzida por tiopental na presença de 5,6 mM de glicose. A propósito, durante a fase ativa a permeabilidade ao Ca^{2+} aumenta, como demonstrado por DEAN & MATTHEWS (1970), ATWATER et alii (1981); ATWATER et alii (1982).

O estudo do efluxo de ^{45}Ca , em ilhotas isoladas de rato, revelou que a introdução de 0,5 mM de tiopental ao meio perfusor, na ausência de glicose, elevou significativamente a fração de efluxo de ^{45}Ca , apenas no 56º, 58º e 62º minutos de perfusão. Em presença de 4,0 mM de glicose o tiopental (0,5 mM não alterou o efluxo do radioisótopo durante todo o período em que esteve presente no meio perfusor. Por outro lado, a introdução do tiopental (0,5 e 2,0 mM) no meio perfusor contendo 5,6 mM de glicose, aumentou o valor da fração de efluxo do ^{45}Ca das ilhotas, durante todo

o período em que esteve presente. Se considerarmos que o efluxo de ^{45}Ca pode estar refletindo uma troca dentre ^{45}Ca e Ca^{2+} (HERCHUELZ, 1980), esses resultados parecem compatíveis com os registros nos experimentos eletrofisiológicos, quais sejam:

1) deflagração de potenciais de ação induzida por 0,5 e 2,0 mM de tiopental, na presença de 5,6 mM de glicose; 2) maior elevação da resistência da membrana, induzida por 0,5 mM de tiopental, na presença de 2,8 mM de glicose, do que na presença de 5,6 mM deste secretagogo, indicativo de maior permeabilidade iônica da membrana.

O efeito dos compostos barbitúricos sobre a permeabilidade do cálcio é ainda controvertido, variando bastante entre os diferentes derivados da malonilurêia. LØYNING, et alii (1964) verificaram que o tiopental e pentobarbital, reduziram o conteúdo quantal médio liberado pelos terminais axônicos de fibras Ia, nas suas sinapses com motoneurônios da medula de gato. Diversos autores tem reportado também, que o acúmulo de cálcio induzido por despolarização em sinaptossomos cerebaris, gânglios autonômicos e células nervosas "in vitro" é inibido por diversos compostos barbitúricos (BLAUSTEIN & ECTOR 1975; BLAUSTEIN, 1976; FRIEDMAN et alii, 1979; ONDRUSEK et alii, 1979; LESLIE et alii, 1980; PERCY et alii, 1981; HARRIS & STOKES, 1982). Particularmente, HEYER & MacDONALD (1982) sugeriram que barbitúricos não convulsivantes, tais como pentobarbital e fenobarbital, são capazes de bloquear canais de cálcio.

Além disso, WILLOW & JOHNSTON (1979), HARRIS & STOKES (1982) e YAMAMOTO & HARRIS (1983) reportaram que diversos barbitúricos com propriedades sedativas, tais como pentobarbital e amilobarbital, são capazes de estimular a atividade

da Ca^{2+} -ATPase na membrana de sinaptossomos.

Retomando nossos resultados, gostaríamos de destacar que o tiopental teve efeito transitório sobre aumento do efluxo de ^{45}Ca (Figs., 15 e 16) e sobre a frequência de deflagração de potenciais de ação (Figs., 7 e 8). Tais fatos, à luz dos dados bibliográficos pesquisados, parecem indicar que o tiopental inibe parcialmente o influxo de cálcio nas células beta. Esta afirmação se apoia também nas observações de BOSCHERO et alii (1985), que verificaram uma redução da captação de ^{45}Ca por ilhotas isoladas, de ratos, após 90 minutos de incubação em presença de 16,7 mM de glicose e 2,0 mM de tiopental. Além disso, o pentobarbital, um oxibarbitúrico análogo ao tiopental, induziu despolarização e aumento da resistência elétrica da membrana sem, contudo, induzir a deflagração de potenciais de ação (GONÇALVES et alii, 1982).

Por outro lado, o aumento transitório do efluxo de ^{45}Ca também poderia estar refletindo uma ação estimulatória do tiopental sobre a Ca^{2+} -ATPase da membrana da célula beta.

DIÁS (1984) verificou um aumento de secreção de insulina, induzido por tiopental na presença de 6,0 mM de glicose. Entretanto, a avaliação da secreção de insulina realizada, foi estática e não dinâmica. Através desta última, poder-se-ia talvez detectar o efeito transitório do tiopental também sobre a secreção de insulina. Entretanto, não é possível descartar a possibilidade de uma ação intracelular do tiopental, e médio e a longo prazo, sobre os reservatórios de cálcio. Em tempo, HELLMAN (1977) atribuiu ao pentobarbital um efeito direto sobre a distribuição de Ca^{2+} intra

celular, ao verificar um aumento da secreção de insulina por ilhotas de camundongos ob/ob, em presença de 20 mM de glicose e na ausência de Ca^{2+} extracelular. Neste trabalho observou também uma redução da concentração de AMP cíclico.

Outro importante aspecto da ação dos barbitúricos, destacado na bibliografia, diz respeito à interação desses compostos com fosfolipídeos da membrana (para revisão veja ROTH, 1979; HO & HARRIS, 1981). Tal interação tem sido interpretada como a causa do aumento da fluidez da membrana celular (LEE, 1976b; HARRIS & SCHROEDER, 1980). Este fenômeno, por sua vez, poderia implicar na alteração do funcionamento de canais iônicos da membrana, afetando assim sua permeabilidade, bem como a comunicação intracelular nos tecidos (LEE, 1976a, b; ROWLETT et alii, 1985).

Tal mecanismo de ação não pode ser negligenciado na análise de nossos resultados. Entretanto, através da metodologia empregada, não se pode concluir até que ponto a possível interação do tiopental com os fosfolipídeos da membrana da célula beta afetou a sua fisiologia. Cabe portanto, a execução de outros experimentos para elucidar esta questão.

VI. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho nos propusemos estudar os efeitos do tiopental sobre a permeabilidade da célula beta do pâncreas ao K^+ e ao Ca^{2+} . Tal propósito advém do fato de que o tiopental afeta a permeabilidade a esses íons nas células nervosas, modificando sua fisiologia. Dessa maneira, esse barbitúrico pode vir a ser um instrumento de interesse ao estudo da fisiologia das células secretoras de insulina.

Os experimentos constituíram-se do registro da atividade elétrica de células beta de ilhotas microdissecadas de camundongo e da avaliação do efluxo de ^{45}Ca em ilhotas de ratos, isoladas pela técnica da collagenase.

Para os estudos eletrofisiológicos, as ilhotas foram microdissecadas, introduzidas numa câmara (volume = 1 mm³) e perfundidas constantemente, à razão de 1,4 ml/min. As soluções perfusoras foram mantidas em banho-maria a 37°C. Para evitar a perda de calor, a solução passou através de cânulas no interior de uma câmara trocadora de calor. Os registros intracelulares foram obtidos através de microeletrodos, ligados a um sistema de amplificação e registro gráfico.

Os resultados obtidos são resumidos a seguir:

Preliminarmente, caracterizamos a atividade elétrica das células beta. Quando foi introduzido 11,1 mM de glicose à solução perfusora, as células apresentaram resposta bifásica típica, com uma frequência de "bursts" que variou de 2 a 5 por minuto. A remoção da glicose interrompeu a atividade elétrica e hiperpolarizou a membrana da célula beta.

A introdução do tiopental (0,2; 0,5 e 1,0 mM)

no meio, quando as ilhotas foram perfundidas com solução de Krebs, promoveu a despolarização da membrana da célula beta de maneira dose dependente. Também foi observado efeito despolarizante com a introdução de 0,5 mM de tiopental no meio perfusor, enriquecido com 2,8 mM de glicose.

Em presença de 5,6 mM de glicose, o tiopental (0,5 e 2,0 mM) promoveu despolarização da membrana e deflagração de potenciais de ação. Estes se agrupam inicialmente em surtos, semelhantes ao "bursts", e em seguida passaram a ser deflagrados de maneira contínua. A frequência destes foi diminuindo no decorrer do tempo.

A atividade elétrica padrão da célula beta, induzida por 11,1 mM de glicose, foi modificada pelo tiopental (0,5 e 2,0 mM). A sucessão de "bursts" foi substituída pela deflagração contínua de potenciais de ação.

Tanto os potenciais de ação deflagrados pela célula beta em presença de 5,6 mM de glicose e tiopental (0,5 e 2,0 mM), quanto em presença de 11,1 mM de glicose e tiopental (0,5 e 2,0 mM), apresentaram amplitudes semelhantes às observadas durante a atividade elétrica padrão, induzida por 11,1 mM de glicose.

A introdução de 20 μ M de DNP no meio perfusor, inibiu a atividade elétrica das células beta, induzida por 11,1 mM de glicose e hiperpolarizou a célula.

A atividade elétrica da célula beta, induzida por 0,5 mM de tiopental, em presença de 11,1 mM de glicose, foi só parcialmente revertida por 20 μ M de DNP.

Em todos os experimentos, as alterações do potencial de membrana e da atividade elétrica induzidos pelo tiopental, foram revertidos com a sua remoção do meio de perfu-

são.

Na ausência de glicose, o tiopental (0,5 e 1,0 mM) induziu aumento da resistência da membrana da célula beta à injeção de corrente, de maneira dose dependente.

Na ausência e na presença de 2,8 , 5,6 e 11,1 mM de glicose, o tiopental (0,5 mM) elevou a resistência da membrana à injeção de corrente, respectivamente, em 12,3% , 49,2%, 17,9% e 16%.

Para a análise do efluxo de ^{45}Ca , grupos de 80 a 150 ilhotas pancreáticas de rato foram pré-incubadas por 90 minutos, lavados quatro vezes e transferidos para uma câmara de 0,3 ml de volume, contendo filtro milipore e perfundidos com o auxílio de uma bomba peristáltica, à razão de 0,6 ml/min, por 80 minutos. O efluxo de ^{45}Ca foi avaliado em termos de fração do efluxo.

Os resultados obtidos são resumidos a seguir:

Na ausência de glicose, 0,5 mM de tiopental aumentou significativamente o efluxo de ^{45}Ca das ilhotas apenas no 56^o , 58^o e 62^o minutos de perfusão.

Na presença de 4,0 mM de glicose, 0,5 mM de tiopental não alterou o efluxo de ^{45}Ca das ilhotas durante todo o período em que esteve presente no meio perfusor.

Em presença de 5,6 mM de glicose, 0,5 mM de tiopental elevou significativamente o efluxo de ^{45}Ca das ilhotas, durante todo o período em que esteve presente no meio perfusor. Entretanto, a partir do 50^o minuto de perfusão o valor da fração de efluxo do ^{45}Ca diminuiu gradativamente.

Em presença de 5,6 mM de glicose, 2,0 mM de tiopental elevou o efluxo de ^{45}Ca das ilhotas de maneira mais acentuada que no protocolo anterior. A partir do 52^o minuto

de perfusão, o valor da fração de efluxo de ^{45}Ca passou a ser gradualmente menor. Entretanto, de maneira mais abrupta que em presença de 0,5 mM de tiopental.

Os resultados obtidos nos permite concluir que:

1. O tiopental despolarizou a membrana da célula beta, através do bloqueio de sua permeabilidade ao K^+ .
2. A permeabilidade ao K^+ da membrana da célula beta, bloqueada pelo tiopental, é insensível à voltagem.
3. O bloqueio da permeabilidade ao K^+ pelo tiopental na célula beta, foi devido a uma ação do tiobarbitúrico sobre a permeabilidade ao K^+ ativada por Ca^{2+} celular e/ou sobre a inativada por ATP celular.
4. O tiopental exerceu uma ação dual sobre a permeabilidade ao Ca^{2+} sensível à voltagem na célula beta. Ativou-a devido à sua ação despolarizante e bloqueou-a, possivelmente, atuando sobre esses canais iônicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ØRHEM, P. & KRISTBJARNARSON, H. A barbiturate-induced potassium permeability increase in the myelinated nerve membrane. *Acta Physiol. Scand.*, 113:387-392, 1981.
- ØRHEM, P. & KRISTBJARNARSON, H. On the mechanism of barbiturate action on potassium channels in the nerve membrane. *Acta Physiol. Scand.*, 123(3):369-371, 1985.
- ASHCROFT, S.J.H. The control of insulin release by sugars , In: Ciba Found. Symp. Polypeptide Hormones: Molecular and cellular aspects. Amsterdam: Elsevier, 41 (New Ser), 1976, p. 117-139.
- ASHCROFT, F.M.; HARRISON, D.E. & ASHCROFT, S.J.H. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic β -cells. *Nature*, 312(29):446-448, 1984.
- ATWATER, I. Control mechanisms for glucose-induced changes in the membrane potential of mouse pancreatic β -cell. *Cienc. Biol.*, (Portugal) 5:299-314, 1980a.
- ATWATER, I. Effects of the calcium ionophore, A23187, on glucose-induced electrical activity in mouse pancreatic β -cells. *J. Physiol.*, 303:80p., 1980b.
- ATWATER, I. & BEIGELMAN, P.M. Dynamic characteristics of electrical activity in pancreatic β -cells. I - Effects

of calcium and magnesium removal. *J. Physiol.*, (Paris), 72:769-786, 1976.

ATWATER, I.; DAWSON, C.M.; EDDLESTONE, G.T. & ROJAS, E. Voltage noise measurement across the pancreatic β -cell membrane: calcium channel characteristics. *J. Physiol.*, 314: 195-212, 1981.

ATWATER, I.; DAWSON, C.M.; RIBALET, B. & ROJAS, E. Potassium permeability activated by intracellular calcium ions concentration in the pancreatic β -cell. *J. Physiol.*, 288: 575-588, 1979a.

ATWATER, I.; DAWSON, C.M.; SCOTT, A.M.; EDDLESTONE, G.T. & ROJAS, E. The nature of the oscillatory behaviour in electrical activity from pancreatic β -cell. *Horm. Metab. Res.* (Suppl)100-107, 1980.

ATWATER, I.; GONÇALVES, A.A. & ROJAS, E. Electrophysiological measurement of an oscillating potassium permeability during the glucose-stimulated burst activity in mouse pancreatic β -cell. *Biom. Res.*, 3(6):645-648, 1982.

ATWATER, I.; RIBALET, B. & ROJAS, E. Cyclic changes in potential and resistance of the β -cell membrane induced by glucose in islets of Langerhans from mouse. *J. Physiol.*, 278:117-139, 1978.

- ATWATER, I.; RIBALET, B. & ROJAS, E. Mouse pancreatic β -cells: tetraethylammonium blockage of the potassium permeability increase induced by depolarization. *J. Physiol.*, 288:561-574, 1979b.
- ATWATER, I.; ROSARIO, L.M. & ROJAS, E. Properties of the Ca-activated K-channel in pancreatic β -cells. *Cell Calcium* 4:451-461, 1983.
- ATWATER, I. & RINZEL, J. The β -cell bursting pattern and intracellular Ca^{2+} , 1986.
- BARKER, J.L. CNS depressants: effects on post-synaptic pharmacology. *Brain Res.*, 92:35-55, 1975.
- BARKER, J.L. & GAINER, H. Pentobarbital: selective depression of excitatory post-synaptic potentials. *Science*, 182:720-722, 1973.
- BARKER, J.L. & RANSON, B.R. Pentobarbitone pharmacology of mammalian central neurones grown in tissue culture. *J. Physiol.*, 280:355-372, 1978.
- BEIGELMAN, P.M.; RIBALET, B. & ATWATER, I. Electrical activity of mouse pancreatic β -cells. II - Effects of glucose and arginine. *J. Physiol.*, (Paris), 73:201-217, 1977.

- BEST, L.; DUNLOP, M. & MALAISSE, W.J. Phospholip metabolism in pancreatic islets. *Experientia*, 40:1085-1091, 1984.
- BLAUSTEIN, M.P. Barbiturates block sodium and potassium conductance increases in voltage-clamped lobster axons. *J. gen. Physiol.*, 51:293-307, 1968.
- BLAUSTEIN, M.P. Barbiturates block calcium uptake by stimulated and potassium-depolarized rat sympathetic ganglia. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 196:80-86, 1976.
- BLAUSTEIN, M.P. & ECTOR, A.C. Barbiturate inhibition of calcium uptake by depolarized nerve terminals *in vitro*. *Mol. Pharmacol.*, 11:369-378, 1975.
- BOSCHERO, A.C.; DELATTRE, E. & GONÇALVES, A.A. Mecanismo da secreção de insulina. *Ciênc. Cult.*, 36(10):1742-1749, 1984.
- BOSCHERO, A.C.; DELATTRE, E. & dos SANTOS, M.L. Isolamento de ilhotas de Langerhans de rato. Resumos do XXII Congresso de SBFis (Ribeirão Preto - SP.), pg. 117, 1980.
- BOSCHERO, A.C.; DELATTRE, E. & DOS SANTOS, M.L. Inhibition of insulin release by the aminoglycoside antibiotic sismycin. *Horm. Metab. Res.*, 13:531-532, 1981.

BOSCHERO, A.C.; DIAS, O.; REIS, L.C.; LANGONE, F. & GONÇALVES, A.A. Calcium permeability in beta cells: effect of thiopental. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 18(5-6): 690A, 1985.

BOSCHERO, A.C.; GONÇALVES, A.A.; DAWSON, C.M.; ATWATER, I. & MALAISSE, W.J. Effect of menadione on bioelectrical activity in the pancreatic β -cell. *I.R.C.S. Med. Sci.*, 10:462-463, 1982.

BOSCHERO, A.C.; GONÇALVES, A.A.; DAWSON, C.M.; ATWATER, I. & ROJAS, E. Valinomycin inhibition of the electrical activity of mouse pancreatic β -cells. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 16:153-160, 1983a.

BOSCHERO, A.C.; GONÇALVES, A.A. & LANGONE, F. Thiopental induces K^+ permeability alterations in Beta cells: effects on membrane potential and input resistance. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 16(5-6):424, 1983b.

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

BOSCHERO, A.C.; KAWAZU, S.; SENER, A.; HERCHUELZ, A. & MALAISSE, W.J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: effects of valinomycin upon pancreatic islet function. *Archs. Biochem. Biophysics.*, 196:54-63, 1979.

- BOSCHERO, A.C. & MALAISSE, W.J. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXIX. regulation of $^{86}\text{Rb}^+$ efflux from perifused islets. *Am. J. Physiol.*, 236:E139-E146, 1979.
- CARMICHAEL, F.J. & ISRAEL, Y. Effects of ethanol on neurotransmitter release by rat brain control slices. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 193:824-834, 1975.
- CARPINELLI, A. & MALAISSE, W.J. Regulation of $^{86}\text{Rb}^+$ outflow from pancreatic islets. Reciprocal changes in the response to glucose, tetraethylammonium and quinine. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 17:103-110, 1980.
- COLLINS, G.G.S. Release of endogenous amino acid neurotransmitter candidates from rat olfactory cortex slices: possible regulatory mechanisms and the effects of pentobarbital. *Brain Res.*, 190:517-528, 1980.
- COOK, D.L.; HALES, C.N. Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic β -cells. *Nature* 311(20):271-273, 1984.
- CORBETT, C.E. Hipnóticos. In: CORBETT, C.E. *Farmacodinâmica*. 5a. ed., Rio de Janeiro, R.J., Ed. Guanabara Koogan, 1977, Cap. 14, 224-234.

CUTLER, R.W.P. & DUDZINSKI, D.S. Effect of pentobarbital on uptake and release of ^3H GABA and ^{14}C glutamate by brain slices. *Brain Res.*, 67:546-548, 1974.

CUTLER, R.W.P. & YOUNG, J. Effect of barbiturates on release of endogenous amino acids from rat cortex slices. *Neurochem. Res.*, 4:319-329, 1979.

DAHL, G. & GRATZL, M. Calcium induced fusion of isolated secretory vesicles from the islet of Langerhans. *Citobiologie*, 12:344-355, 1976.

DAWSON, C.M.; ATWATER, I. & ROJAS, E. The response of pancreatic β -cell membrane potential to potassium-induced calcium influx in the presence of glucose. *Q. J. exp. Physiol.*, 69:819-830, 1984.

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

DEAN, P.M. & MATTHEWS, E.K. Electrical activity in pancreatic islets cells: effect of ions. *J. Physiol.*, 210: 265-275, 1970.

- DEAN, P.M.; MATTHEWS, E.K. & SAKAMOTO, Y. Pancreatic islet cells: effects of monosacharides glycolytic intermediates and metabolic inhibitors on membrane potential and electrical activity. *J. Physiol.*, 246:459-478, 1975.
- DELATTRE, E.; dos SANTOS, M.L. & BOSCHERO, A.C. Effect of gentamycin on insulin release and ^{45}Ca net uptake by isolated islets. *Experientia*, 38:1320-1321, 1982.
- DEVIS, G.; SOMERS, G. & MALAISSE, W.J. Dynamics of calcium-induced insulin release. *Diabetologia*, 13:531-536, 1977.
- DIAS, O. Permeabilidade ao K^+ e secreção de insulina. Efeito do tiopental. Instituto de Biologia, 1984, 38p. Tese de Mestrado. UNICAMP.
- EDDLESTONE, G.T. & BEIGELMAN, P.M. Pancreatic β -cell electrical activity: the role of anions and control of pH. *Am. J. Physiol.*, 244:C188-C197, 1983.
- 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.

FERRER, R.; ATWATER, I.; OMER, E.M.; GONÇALVES, A.A.; CROGHAN, P.C. & ROJAS, E. Electrophysiological evidence for the inhibition of potassium permeability in pancreatic β -cells by glibenclamide. *Q. J. exp. Physiol.*, 69:831-839, 1984.

FRAZIER, D.T.; MURAYAMA, K.; ABBOTT N.J. & NARAHASHI, T. Comparison of the action of different barbiturates on squid axon membranes. *Eur. J. Pharmacol.*, 32:102-107, 1975.

FRIEDMAN, M.B.; COLEMAN, R. & LESLIE, S.W. Barbiturate depression of calcium-mediated stimulus-secretion coupling in synaptosomes: a species and strain comparison. *Life Sci.*, 25:735-738, 1979.

GAGE, P.W. & MCKINNON, D. Effects of pentobarbitone on acetylcholine-activated channels in mammalian muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 85(1):229-235, 1985.

GERICH, J.E.; CHARLES, M.A. & GRODSKY, G.M. Regulation of pancreatic insulin and glucagon secretion. *Ann. Rev. Physiol.*, 38:353-388, 1976.

GOLDSTEIN, D.B. The effects of drugs on membrane fluidity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 24:43-64, 1984.

GONÇALVES, A.A.; ROJAS, E.; ATWATER, I. & BANGHAN, J.A. Effect of pentobarbital on electrical activity and input

membrane resistance of mouse islet β -cell. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 15(4-5):331, 1982.

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

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

HALES, C.N. & MILNER, R.D.G. Cations and the secretion of insulin from rabbit pancreas *in vitro*. *J. Physiol.*, 199:177-187, 1968b.

HARRIS, R.A. & SCHROEDER, F. Interaction of barbiturates with brain membranes. *Soc. Neurosc. Abstr.*, 6:772, 1980.

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

HARRISON, D.E.; ASHCROFT, S.J.H.; CHRISTIE, M.R. & LORD, J.M. Protein phosphorylation in the pancreatic β -cell. *Experientia*, 40:1075-1084, 1984.

HARVEY, S.C. Hypnotics and sedatives. In: the Pharmacological Basis of Therapeutics, eds. A.G. GILMAN, L.S.; GOODMAN, A. GILMAN, pp. 339-75, New York : Macmillan. 1980. 1843, pp.

- HAYCOCK, J.W.; LEVY, W.B. & COTMAN, C.W. Pentobarbital depression of stimulus-secretion coupling in brain. Selective inhibition of depolarization-induced calcium-dependent release. *Biochem. Pharmacol.*, 26:159-161, 1977.
- HEDESKOV, C.J. Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiol. Rev.*, 60:442-509, 1980.
- HELLMAN, B. Modifying actions of calcium ionophores on insulin release. *Biochem. Biophys. Acta*, 399:157-169, 1975.
- HELLMAN, B. Calcium and pancreatic β -cell function. I. Stimulatory effects of pentobarbital on insulin release. *Biochem. et Biophys. Acta*, 497:766-774, 1977.
- HELLMAN, B.; SEHLIN, J. & TÄLJEDAL, I.B. Effects of glucose on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by pancreatic islets as studied with the lanthanum method. *J. Physiol. (London)* 254:639-656, 1976a.
- HELLMAN, B.; SEHLIN, J. & TÄLJEDAL, I.B. Calcium and secretion: distinction between two pools of glucose-sensitive calcium in pancreatic islets. *Science*, 194:1421-1423, 1976b.
- HENQUIN, J.C. Tetraethylammonium potentiation of insulin release and inhibition of rubidium efflux in pancreatic islets. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 77(2):551-556, 1977.
- HENQUIN, J.C. D-glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islets cells. *Nature*, 271:271-273, 1978.
- HENQUIN, J.C. Opposite effects of intracellular Ca^{2+} and glucose on K^{+} permeability of pancreatic islet cells. *Nature*, 280:66-68, 1979.

HENQUIN, J.C. Metabolic control of the potassium permeability in pancreatic islets cells. *Biochem. J.* 186:541-550, 1980.

HENQUIN, J.C. & LAMBERT, A.E. Cobalt inhibition of insulin secretion and calcium uptake by isolated rat islets. *Am. J. Physiol.*, 288:1669-1677, 1975.

HENQUIN, J.C. & MEISSNER, H.P. Valinomycin inhibition of insulin release and alteration of the electrical properties of pancreatic β -cells. *Biochem. Biophys. Acta*, 543:455-464, 1978.

HENQUIN, J.C. & MEISSNER, H.P. Effects of aminoacids on membrane potential and ^{86}Rb fluxes in pancreatic β -cells. *Am. J. Physiol.*, 240:E245-E252, 1981.

HENQUIN, J.C. & MEISSNER, H.P. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on $^{86}\text{Rb}^+$ fluxes and membrane potential in pancreatic β -cells. *Biochem. Pharmac.* 31:1407-1415, 1982.

HENQUIN, J.C. & MEISSNER, H.P. Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic β -cells. *Experientia*, 40:1043-1052, 1984a.

HENQUIN, J.C. & MEISSNER, H.P. The ionic, electrical, and secretory effects of endogenous cyclic adenosine monophosphate in mouse pancreatic β -cells: Studies with Forskolin. *Endocrinology*, 115:1125-1134, 1984b.

- HENQUIN, J.C.; MEISSNER, H.P. & PREISSLER, M. 9-aminoacridine and tetraethylammonium-induced reduction of the potassium permeability in pancreatic β -cells. Effects on insulin release and electrical properties. *Biochem. Biophys. Acta*, 387:579-592, 1979.
- HENQUIN, J.C.; SCHMEER, W. & MEISSNER, H.P. Forskolin, on activator of adenylate cyclase, increases Ca^{2+} -dependent electrical activity induced by glucose in mouse pancreatic β -cells. *Endocrinology*, 112:2218-2220, 1983.
- HERCHUELZ, A. Regulation des flux calciques dans us ilots de Langerhans. These presentee en vue de l'obtention du grade D'Agrede de l'enseignement Superier Universete Libre de Bruxelles, 1980.
- HERCHUELZ, A. & MALAISSE, W.J. Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets. I. Dissociation between calcium and insulin release. *J. Physiol.*, 283:409-424, 1978.
- HEYER, E.J. & MacDONALD, R.L. Barbiturate reduction of calcium-dependent action potentials: correlation with anesthetic action. *Brain Res.*, 236:157-171, 1982.
- HO, I.K. & HARRIS, R.A. Mechanism of action of barbiturates. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 21:83-111, 1981.
- HOWELL, S.L. & TAYLOR, K.W. Potassium ions and the secretion of insulin by islets of Langerhans incubated *in vitro*. *Biochem. J.* 108:17-24, 1986.

- HUTTON, J.C.; SENER, A.; HERCHUELZ, A.; ATWATER, I.; KAWAZU, S.; BOSCHERO, A.C.; SOMERS, G.; DEVIS, G. & MALAISSE, W. J. Similarities in the stimulus-secretion coupling mechanisms of glucose and 2-keto acid-induced insulin release. *Endocrinology*, 106:203-219, 1980.
- KALANT, H. & GROSE, W. Effects of ethanol and pentobarbital on release of acetylcholine from cerebral cortex slices. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 158:386-393, 1967.
- KARL, R.C.; ZAWALICH, W.S.; FERRENDELLI, J.A. & MATSCHINSKY, F.M. The role of Ca^{2+} and cyclic adenosine 3':5'-mono-phosphate in insulin release induced *in vitro* by the divalent cation ionophore A23187. *J. biol. Chem.* 250: 4575-4579, 1975.
- KYOGOKU, Y.; LORD, R.C. & RICH, A. Specific hydrogen bonding of barbiturate to adenine derivatives. *Nature*, 218: 69-72, 1968.
- LACY, P.E. & KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, 16:35-39, 1967.
- LARRABEE, M.G. & POSTERNAK, J.M. Selective action of anesthetics on synapses and axons in mammalian sympathetic ganglia. *J. Neurophysiol.*, 15:91-114, 1952.
- LEE, A.G. Model for action of local anesthetics. *Nature*, 262:545-548, 1976a.

- LEE, A.G. Interactions between phospholipids and barbiturates. *Biochem. Biophys. Acta*, 455:102-108, 1976b.
- LESLIE, S.W.; FRIEDMAN, M.B.; WILCOX, R.E. & EROLD, S.V. Acute and chronic effects of barbiturates on depolarization-induced calcium influx into rat synaptosomes. *Brain Res.*, 185:409-417, 1980.
- LOHSE, M.J.; LENSCHOW, V. & SCHWABE, U. Interaction of barbiturates with adenosine receptors in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 326(1):69-74, 1984.
- LOYNING, Y.; OSHIMA, T. & YOKOTA, T. Site of action of thiamylal sodium on the monosynaptic spinal reflex pathway in cats. *J. Neurophysiol.*, 27:408-428, 1964.
- MACDONALD, R.L. & BARKER, J.L. Enhancement of GABA-mediated post-synaptic inhibition in cultured mammalian spinal cord neurons: a commomode of anticonvulsant action. *Brain Res.*, 167:323-336, 1979.
- MALAISSSE, W.J. Stimulus-secretion coupling in the pancreatic β -cell: introductory remarks. *Experientia*, 40:1025-1026, 1984.
- MALAISSSE, W.J. & BOSCHERO, A.C. Calcium antagonists and islet function XI. Effect of nifedipine. *Hormone Res.*, 8:203-209, 1977.

MALAISSSE, W.J.; BOSCHERO, A.C.; KAWAZU, S. & HUTTON, J.C.

The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXVII. Effect of glucose on K^+ fluxes in isolated islets. *Pflügers Arch.*, 373:237-242, 1978a.

MALAISSSE, W.J.; BRISSON, G. & MALAISSSE-LAGAE, F. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release.

I. Interaction of epinephrine and alkaline earth cations.

J. Lab. clin. Med., 76:895-902, 1970.

MALAISSSE, W.J.; BRISSON, G.R. & BAIRD, L.E. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. X.

Effect of glucose on ^{45}Ca efflux from perifused islets.

Am. J. Physiol., 224:389-394, 1973.

MALAISSSE, W.J.; DEVIS, G.; HERCHUELZ, A.; SENER, A. &

SOMERS, G. Calcium-antagonists and islet function. VIII.

The effect of magnesium. *Diab. Metab.*, 2:1-4, 1976a.

MALAISSSE, W.J.; HERCHUELZ, A.; DEVIS, G.; SOMERS, G.; BOS -

CHERO, A.C.; HUTTON, J.C.; KAWAZU, S.; SENER, A.; ATWA -

TER, I.J.; DUNCAN, G.; RIBALET, B. & ROJAS, E. Regula

tion of calcium fluxes and their regulatory roles in

pancreatic islets. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 307:562-582 ,

1978b.

MALAISSSE, W.J. & MALAISSSE-LAGAE, F. The role of cyclic AMP

in insulin release. *Experientia*, 40:1068-1075, 1984.

MALAISSSE, W.J.; MALAISSSE-LAGAE, F.; WALKER, M.O. & LACY, P. E. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. V. The participation of microtubular-microfilamentous system. *Diabetes*, 20:257-265, 1971.

MALAISSSE, W.J.; SENER, A.; KOSER, M. & HERCHUELZ, A. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: metabolism of α - and β -D-glucose in isolated islets. *J. biol. Chem.*, 251:5936-5943, 1976b.

MALAISSSE-LAGAE, F. & MALAISSSE, W.J. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. III. Uptake of 45 calcium by isolated islets of Langerhans. *Endocrinology*, 88:72-80, 1971.

MATTHEWS, E.K. & SAKAMOTO, Y. Pancreatic islets cells: electrogenical and electrodiffusional control of membrane potential. *J. Physiol.*, 246:439-457, 1975.

MEDA, P.; ATWATER, I.; GONÇALVES, A.A.; BANGHAM, A.; ORCI, L. & ROJAS, E. The topography of electrical synchrony among β -cells in the mouse islet of Langerhans. *J. exp. Physiol.*, 69:719-735, 1984.

MEDA, P.; PERRELET, A.; ORCI, L. Increase of gap junctions between pancreatic β -cells during stimulation of insulin secretion. *J. Cell. Biol.*, 82:441-448, 1979.

MEISSNER, H.P. Electrical characteristics of β -cells in pancreatic islets. *J. Physiol.*, (Paris) 72:757-767, 1976a.

- MEISSNER, H.P. Electrophysiological evidence for coupling between β -cells of pancreatic islets. *Nature*, 262:502-504, 1976b.
- MEISSNER, H.P. & ATWATER, I. The kinetics of electrical activity of β -cells in response to a square wave stimulation with glucose or glibenclamide. *Horm. Metab. Res.*, 8:11-16, 1976.
- MEISSNER, P.; HENQUIN, P.C. & PREISSLER, M. Potassium dependence of the membrane potential of pancreatic β -cells. *FEBS letters*, 94(1):87-89, 1978.
- MEISSNER, H.P. & PREISSLER, M. Glucose-induced changes of the membrane potential of pancreatic β -cells: their significance for the regulation of insulin release. In *treatment of Early Diabetes*. Ed. Rafael A. Camerini - Davalos and Bernard Hanover. Plenum Publishing Co., 1979. p.97-107.
- MEISSNER, H.P. & PREISSLER, M. Ionic mechanisms of the glucose-induced membrane potential change in β -cells. *Horm. Metab. Res.*, Suppl. (10):91-98, 1980.
- MEISSNER, H.P.; PREISSLER, M. & HENQUIN, J.C. Possible ionic mechanisms of the electrical activity induced by glucose and tolbutamide in pancreatic β -cells. In *International Congress Series n° 500 - Diabetes (1979)* (Ed. WALDHAUSL W.K.) Excerpta Medica, Elsevier North Holland, Amsterdam, 1979, pp.166-171.
- MEISSNER, H.P. & SCHMEER, W. The significance of calcium ions for the glucose-induced electrical activity of pancreatic β -cells, in: *The mechanisms of gated calcium transport across biological membranes*. Eds. S.T. OSNISHI & M. ENDO. Academic Press, New York, 1981. pp. 157-165.

- MEISSNER, H.P. & SCHMELZ, H. Membrana potential of β -cells in pancreatic islets. *Pflügers Arch.* 351:195-206, 1974.
- MILNER, R.D.G. & HALES, C.N. The role of calcium and magnesium in insulin secretion from rabbit pancreas studied *in vitro*. *Diabetologia*, 3:47-49, 1967.
- MORGAN, K.G. & BRYANT, S.H. Pentobarbital: Presynaptic effect in the squid giant synapse. *Experientia*, 33:487-488, 1977.
- NARAHASHI, T.; MOORE, J.W. & POSTON, R.N. Anesthetic blocking of nerve membrane conductance by internal and external applications. *J. Neurobiol.*, 1:3-22, 1969.
- NEUMAN, R.S. & FRANK, G.B. Effects of diphenylhydantoin and phenobarbital on voltage clamped myelinated nerve. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 55:42, 1977.
- NICOLL, R.A. & WOJTOWICZ, J.M. The effects of pentobarbital and related compounds on frog motoneurons. *Brain Res.*, 191:225-237, 1980.
- NOVAK, R.F. & SWIFT, T.J. Barbiturate interaction with phosphotidylcholine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69(3):640-642, 1972.
- ONDRUSEK, M.G.; BELKNAP, J.K. & LESLIE, S.W. Effects of acute and chronic barbiturate administration on synaptosomal calcium accumulation. *Mol. Pharmacol.*, 15:386-395, 1979.
- PACE, C.S. Electrophysiology of secretion cells. Introduction and over view. *Fed. Proc.*, 43(9):2362-2363, 1984.

PACE, C.S. & PRICE, S. Electrical responses of pancreatic islets cells to secretory stimuli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46:1557-1563, 1972.

PACE, C.S.; TARVIN, J.T. & SMITH, J.S. Stimulus-secretion coupling in β -cells: modulation by pH. *Am. J. Physiol.*, 244:E3-E18, 1983.

PANTEN, U.; CHRISTIANS, J.; KRIEGSTEIN, E.V.; POSER, W. & HASSELBLATT, A. Effect of carbohydrates upon fluorescence of reduced pyridine nucleotides from perifused isolated pancreatic islets. *Diabetologia*, 9(6):477-482, 1973.

PERCY, V.A.; LAMM, M.C.L. & TALJAARD, J.J.F. Effects of α -aminolaevulinic acid, porphobilinogen, amino acids and barbiturates on calcium accumulation by cultured neurons. *Biochem. Pharmacol.*, 30:665-666, 1981.

PETERSEN, O.H. Electrically excitable gland cells. In: PETERSEN, O.H. The electrophysiology of gland cells. Monographs of the Physiological Society n^o 36, London, Academic Press, 1980, Cp 12, p. 181-207.

PHILLIS, J.W.; EDSTROM, J.P.; KOSTOPOULOS, G.K. & KIRKPATRICK, J.P. Effects of adenosine and adenine nucleotides on synaptic transmission in the cerebral cortex. *J. Can. Physiol. Pharmacol.*, 57(11):1289-1312, 1979.

PIPELEERS, D.G.; MARICHAL, N. & MALAISSE, W.J. The stimulus secretion coupling of glucose-induced insulin release. XV. Participation of cations in the recognition of by the β -cell. *Endocrinology*, 93:1012-1018, 1973.

- PRENTKI, M. & WOLLHEIM, C.B. Cytosolic free Ca^{2+} insulin secreting cells and its regulation by isolated organelles. *Experientia*, 40:1052-1060, 1984.
- PROCTOR, W.R. & WEAKLY, J.N. A comparison of the presynaptic and post-synaptic actions of pentobarbitone and phenobarbitone in the neuromuscular junction of the frog. *J. Physiol.*, 258:257-268, 1976.
- RIBALET, B. & BEIGELMAN, P.M. Cyclic variation of K^+ conductance in pancreatic β -cells: Ca^{2+} and voltage dependence. *Am. J. Physiol.*, 237:C137-C146, 1979.
- RIBALET, B. & BEIGELMAN, P.M. Calcium action potentials and potassium permeability activation in pancreatic β -cells. *Am. J. Physiol.*, 239:C124-C133, 1980.
- RIBALET, B. & BEIGELMAN, P.M. Effects of sodium on β -cell electrical activity. *Am. J. Physiol.*, 242:C296-C303, 1982.
- RICHTER, J.A. & WALLER, M.B. Effects of pentobarbital on the regulation of acetylcholine content and release in different regions of rat brain. *Biochem. Pharmacol.*, 26:609-615, 1977.
- RICHTER, J.A. & WERLING, L.L. K-stimulated acetylcholine release: Inhibition by several barbiturates and chloral hydrate but not by ethanol, chlordiazepoxide or 11-OH- Δ -tetrahydrocannabinol. *J. Neurochem.*, 32: 935-941, 1979.

- ROJAS, E. & HIDALGO, C. Effect of temperature and metabolic inhibitors on ^{45}Ca outflow from squid giant axons. *Biochem. Biophys. Acta.*, 163:550-556, 1968.
- ROTH, S.H. Physical mechanisms of anesthesia. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 19:159-178, 1979.
- ROWLETT, K.A.; WASSERBERG, J. & WAKELY, J. Immediate effects of procaine and pentobarbital on placodal and non-placodal head ectoderm of the chick embryo *in vitro*. *J. Anat.* 140(2):181-188, 1985.
- SANTOS, R.M.; MEDA, P. & ROJAS, E. Modulation of cell-to-cell coupling by cAMP in mouse islets of Langerhans. *Biophys. J.*, 49:340a, 1986.
- SAWADA, S. & YAMAMOTO, C. Blocking action of pentobarbital on receptors for excitatory amino acids in the guinea-pig Hippocampus. *Exp. Brain Res.*, 59(2):226-231, 1985.
- SCHWARZ, J.R. The mode of action of phenobarbital on the excitable membrane of the node of ranvier. *Eur. J. Pharmacol.*, 56:51-60, 1979.
- SCHWARTZ, R.D.; SKOLNICK, P. HOLLINGWORTH, E.B. & PAUL, S. M. Barbiturate and picrotoxin-sensitive chloride efflux in rat cerebral cortical synoptoneurosomes. *FEBS letters*, 175(1):193-196, 1984.

- SCOTT, A.M.; ATWATER, I. & ROJAS, E. A method for simultaneous measurements of insulin release and β -cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia*, 21:470-475, 1981.
- SCOTT, A.M.; DAWSON, C.M. & GONÇALVES, A.A. Comparison of glucose-induced changes in electrical activity, insulin release, lactate output and potassium permeability between normal and ob/ob mouse islets: effects of cooling. *J. Endocr.*, 107:265-273, 1985.
- SCOTT, A.M.; ROSÁRIO, L.M. & ATWATER, I. Simultaneous measurement of insulin release and electrical activity in single, isolated perfused islets of Langerhans in ob/ob mice. Proc. British Diabetic Ass. Med. and Scientific section, Autumn Meeting, Norwich, U.K., 1983.
- SEEMAN, P. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. *Pharmacol. Rev.*, 24:583-655, 1972.
- SEHLIN, J. & TÄLJEDAL, I.B. Transport of rubidium and sodium in pancreatic islets. *J. Physiol.*, 242:505-515, 1974.
- SEHLIN, J. & TÄLJEDAL, I.B. Glucose-induced decrease in Rb^+ permeability in pancreatic β -cell. *Nature*, 253:635-636, 1975.

- SEVCIK, C. Differences between the actions of thiopental and pentobarbital in squid giant axons. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 214:657-663, 1980.
- SEYAMA, I. & NARAHASHI, T. Mechanisms of blockade of neuromuscular transmission by pentobarbital. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 192:95-104, 1975.
- SKERRIT, J.H. & MACDONALD, R.L. Multiple actions of convulsant barbiturates on mouse neurons in cell culture. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 230(1):82-88, 1984.
- SKERRIT, J.H.; WILLOW, M. & JOHNSTON, G.A.R. Contrasting effects of a convulsant (CHEB) and a anticonvulsant barbiturate (phenobarbitone) on amino acid release from rat brain slices. *Brain Res.*, 258:271-277, 1983.
- SOMJEN, G.G. Effects of ether and thiopental on spinal presynaptic terminals. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 140:396-402, 1963.
- STEEL, L. & SCHOLFIELD, C.N. γ -Aminobutyric acid partly mediates the pentobarbitone depression of synaptic excitation in the guinea-pig olfactory cortex *in vitro*. *Neurosci. Lett.*, 56(1): 33-38, 1985.
- STONE, T.W. Physiological roles for adenosine and adenosine 5'-triphosphate in the nervous system. *Neuroscience*, 6: 523-555, 1981.
- SU, C. Purinergic neurotransmission and neuromodulation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 23:397-411, 1983.

- TÄLJEDAL, I.B. On insulin secretion. *Diabetologia*, 21:1 - 17, 1981.
- THESLEFF, S. Effects of anesthetic agents on skeletal muscle membrane. *Acta Physiol. Scand.*, 37:355-359, 1956.
- THOMSON, T.D. & TURKANIS, S.A. Barbiturate-induced transmitter release at a frog neuromuscular junction. *Br. J. Pharmacol.*, 48:48-58, 1973.
- UNGER, R.H.; DOBBS, R.E. & ORCI, L. Insulin, glucagon and somatostatin secretion in the regulation of metabolism. *Ann. Rev. Physiol.*, 40:307-343, 1978.
- VALVERDE, I. & MALAISSE, W.J. Calmodulin and pancreatic β -cell function. *Experientia*, 40:1061-1068, 1984.
- WEAKLY, J.N. Effect of barbiturates on "quantal" synaptic transmission in spinal motoneurons. *J. Physiol.*, 204: 63-77, 1969.
- WILLOW, M. & JOHNSTON, G.A.R. Barbiturates and calcium-activated adenosine triphosphatase. *Neurosci. Lett.* 14: 361-364, 1979.
- WILLOW, M.; BORNSTEIN, J.C. & JOHNSTON, G.A.R. The effects of anaesthetic and convulsant barbiturates on the efflux of [^3H] -D-aspartate from brain minislices. *Neurosci. Lett.* 18:185-190, 1980.

WOLLHEIM, C.B.; KIKUCHI, M.; RENOLD, A.E. & SHARP, G.W.G.

The role of intracellular and extracellular Ca^{++} in glucose-stimulated biphasic insulin release by rat islets.

J. clin. Invest., 62:451-458, 1978.

WOLLHEIM, C.B. & SHARP, G.W.G. Regulation of insulin release by calcium. *Physiol. Rev.*, 61:914-973, 1981.

YAMAMOTO, H. & HARRIS, R.A. Effects of ethanol and barbiturates on Ca^{2+} -ATPase activity of erythrocyte and brain membranes. *Biochem. Pharmacol.*, 32(18):2787-2791, 1983.