

EDSON DELATTRE

**RITMO DIÁRIO DA SECREÇÃO DE INSULINA
POR ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS DE RATO:
CORRELAÇÃO COM AS PERMEABILIDADES A POTÁSSIO E CÁLCIO**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a)
<i>Edson Delattre</i>

e aprovada pela Comissão Julgadora.

13/05/98 Barbera

Tese submetida ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do grau de Doutor em Ciências, na área de Fisiologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. ANTONIO CARLOS BOSCHERO

CAMPINAS - SP

1998

D375r

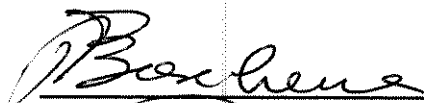
34723/BC

Campinas, 13 de maio de 1998.

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero (Orientador)



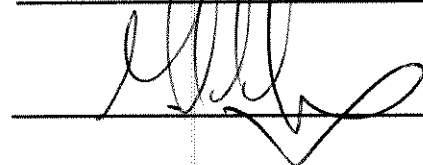
Prof. Dr. Ângelo Rafael Carpinelli



Prof. Dr. José Cipolla-Neto



Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

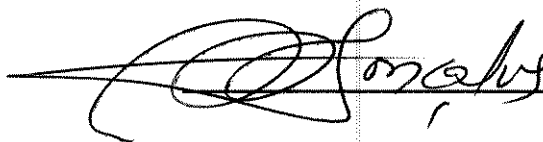


Prof. Dr. Rui Curi



SUPLENTES

Prof. Dr. Antonio Ari Gonçalves



Prof^a. Dr^a. Isis do Carmo Kettelhut



Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad



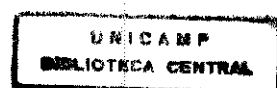
EDSON DELATTRE

**RITMO DIÁRIO DA SECREÇÃO DE INSULINA
POR ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS DE RATO:
CORRELAÇÃO COM AS PERMEABILIDADES A POTÁSSIO E CÁLCIO**

Tese submetida ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do grau de Doutor em Ciências,
na área de Fisiologia.

CAMPINAS - SP

1998



9816430

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/Unicamp
	D375r
V.	Ex.
TOMBO BC/	34723
PROC.	395198
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	11/08/98
N.º CPD	

CM-00115422-0

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

Delattre, Edson

D375r Ritmo diário da secreção de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas de rato: correlação com as permeabilidades a potássio e cálcio / Edson Delattre. -- Campinas, SP:[s.n.], 1998.
159 f. de texto, 30 p. de gráficos.: ilus.

Orientador: Antonio Carlos Boschero
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Insulina - Secreção. 2. Permeabilidade. 3. Ritmos circadianos.
I. Boschero, Antonio Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

O presente nada contém além do passado, e o
que é encontrado no efeito já existia na causa.
(Henri Bergson)

O tempo é a infinita equação, que no presente
soluciona as incógnitas do futuro,
e cujo produto é o passado.
(E.D. 7/5/78)

À

Minha filha

ISIS

Dedico.

AGRADECIMENTOS

AGRADECEMOS

A DEUS

Pela vida e saúde.

Aos nossos PAIS, por toda dedicação.

A todos os nossos MESTRES, por tudo que nos legaram.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero, pela orientação e ensinamentos prestados.

Ao Prof. Dr. José Cipolla Neto, pelo auxílio no delineamento experimental.

Ao Prof. Dr. Antonio Ari Gonçalves, pelas análises e discussões de resultados, bem como pelo auxílio em informática.

A todos os colegas e ex-colegas do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelos ensinamentos, apoio e compreensão.

Ao Núcleo de Medicina Experimental da UNICAMP, na pessoa do Prof. Dr. Gilberto D'Assunção Fernandes, pelo apoio de infraestrutura.

Aos Professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela acolhida e pelos ensinamentos.

Aos Secretários de Pós-Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, sempre solícitos.

Ao Sr. José Augusto Ferraz de Lima, pelo auxílio bibliográfico.

Aos Srs. Francisco Leite, José Francisco Machado e Lécio Domingues Teixeira, pelo auxílio para a manutenção dos animais ou execução dos experimentos.

A todos os funcionários e ex-funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho.

À Diretora Técnica da Biblioteca do Instituto de Biologia, Srta. Ana Maria Rabetti, e a todos os seus funcionários, pelo suporte bibliográfico.

À Sra. Shirley Rabetti Sitta, pelo auxílio na redação.

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

Ao FAEP (UNICAMP), à FAPESP e ao CNPq, pelos auxílios financeiros concedidos.

OBRIGADO.

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIMPLIFICAÇÕES

<i>ad libitum</i>	À vontade.
ANOVA	Análise de variância.
aprox.	Aproximadamente.
<i>apud</i>	Em; junto a.
área G 0	Área integrada sob a curva do efluxo fracional de ^{86}Rb , entre o 42° e o 60° minuto de perfusão, por <i>Krebs</i> desprovido de glicose ou área integrada sob a curva do efluxo fracional de ^{45}Ca , entre o 31° e o 44° minuto de perfusão, por <i>Krebs</i> desprovido de glicose.
área G 5,6	Área integrada sob a curva do efluxo fracional de ^{86}Rb , entre o 22° e o 40° minuto de perfusão, por <i>Krebs</i> contendo glicose (5,6 mM).
área G 8,3	Área integrada sobre a curva do efluxo fracional de ^{86}Rb , entre o 42° e o 60° minuto de perfusão, por <i>Krebs</i> contendo glicose (8,3 mM).
área G 16,7	Área integrada sob a curva do efluxo fracional de ^{45}Ca , entre o 46° e o 58° minuto de perfusão, por <i>Krebs</i> contendo glicose (16,7 mM).
B	Indica (Fig. 8) o valor percentual máximo da secreção de insulina.

B/Bo	Razão entre a radioatividade ligada ao anticorpo, de um tubo qualquer, e a radioatividade medida na ausência da insulina não-marcada.
BIR	<i>β cell inward rectifier</i> , equiv. a <i>Kir</i> (q.v.).
BRANCO	Radioatividade precipitada inespecificamente pelo PEG, na ausência de anticorpo (no RIE).
ca.	<i>Circa</i> (cerca de).
cm	Centímetro.
cpm	Contagens por minuto.
°C	Graus centígrados.
dl	Decilitro.
Δ%	Variação percentual do efluxo fracional de ⁸⁶ Rb ou ⁴⁵ Ca, após a alteração inicial (40° ou 44° minuto, respect.) da concentração de glicose no <i>Krebs</i> .
e	Base dos logaritmos neperianos.
EC ₅₀	Concentração efetiva mediana.
e.g.	Exemplo genérico.
epm	Erro padrão da média.
equiv.	Equivalente.
et al.	E colaboradores.
g	Grama.
g	Unidade de aceleração igual à aceleração padrão da gravidade.
GLUT1 e GLUT2	Transportadores de glicose (facilitadores) do tipo 1 e do tipo 2, respectivamente.

GTT	Teste de tolerância a glicose.
G 0	<i>Krebs</i> isento de glicose.
G 2,8; G 5,6 ou G 8,3	<i>Krebs</i> contendo glicose (2,8; 5,6 ou 8,3 mM, respect.).
G 11,1; G 16,7 e G 27,7	<i>Krebs</i> contendo glicose (11,1; 16,7 ou 27,7 mM, respect).
h	Hora.
Hanks (solução de)	Solução hidroeletrólítica utilizada no isolamento das ilhotas pancreáticas.
<i>i.e.</i>	Isto é.
<i>inclinação G 0</i>	Inclinação da curva de regressão exponencial dos valores do efluxo fracional de ^{45}Ca , entre o 31° e o 44° minuto de perfusão, por <i>Krebs</i> desprovido de glicose.
<i>inclinação G 5,6</i>	Inclinação da curva de regressão exponencial dos valores do efluxo fracional de ^{86}Rb , entre o 22° e o 40° minuto de perfusão, por <i>Krebs</i> contendo glicose (5,6 mM).
<i>inter alia</i>	Entre outros.
<i>K</i>	Indica (Fig. 8) a posição, no eixo da abscissa, da curva dose resposta a glicose, da secreção de insulina .
K^+_{ATP}	Canais de potássio sensíveis à razão ATP/ADP.
Kbq	Quilobequerels (10^3 bequerels).
$\text{K}^+_{\text{Ca}}^{2+}$	Canais de potássio sensíveis à atividade citosólica de cálcio.
$\text{K}^+ \text{-DR}$	Canais de potássio de retificação tardia.
<i>Kir</i>	<i>Inwardly rectifying potassium channels</i> , <i>i.e.</i> , canais de potássio de retificação interna.

K_M	Constante de Michaelis-Menten.
<i>Krebs</i>	Solução-tampão bicarbonato de Krebs-Ringer suplementada com albumina bovina (1 mg/ml).
l	Litro.
ln	Logaritmo natural (neperiano).
λ	Representa (Fig. 8) a inclinação da curva dose-resposta a glicose, da secreção de insulina .
M	Molar.
mg	Miligrama.
min	Minuto.
ml	Mililitro.
mM	Milimolar.
mmol	Milimol.
μ l	Microlitro.
μ M	Micromolar.
n	Número de experimentos ou observações.
N	Normal (concentração).
N. do A.	Nota do autor.
ng	Nanograma.
nm	Nanometro.
N.S.	Não-significativa.
p	Probabilidade.
PEG	Polietilenoglicol.
pg	Picograma.
PKA	Proteína-quinase A.

PKC	Proteína-quinase C.
POOLS	Misturas de várias soluções da secreção de insulina, utilizadas no controle de qualidade do RIE.
<i>q.s.p.</i>	Quantidade suficiente para.
<i>q.v.</i>	Queira ver.
<i>r</i>	Coeficiente de correlação linear de Pearson.
respect.	Respectivamente.
RIE	Radioimunoensaio.
rpm	Rotações por minuto.
SCN	Núcleos supraquiasmáticos.
SNC	Sistema nervoso central.
SUR	<i>Sulfonylurea receptor</i> , <i>i.e.</i> , receptor de sulfoniluréia.
Tbq	Terabequerels (10^{12} bequerels).
TOTAL	Radioatividade (cpm) total adicionada a cada um dos tubos do RIE.
VDCCs	Canais de cálcio dependentes de voltagem.
<i>v.g.</i>	<i>Verbi gratia</i> (por exemplo).
vs.	<i>Versus</i> (contra).
ZERO INSULINA	Tubos (do RIE) desprovidos da insulina não-marcada.
0, 4, 8, 12, 16 e 20 h	00:00; 04:00; 08:00; 12:00; 16:00 e 20:00 h, respectivamente.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. RITMICIDADE DA NATUREZA VIVA	1
1.1.1. RITMOS CIRCADIANOS	3
1.1.2. RITMOS ENDÓCRINOS	6
1.1.2.1. RITMOS DA SECREÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE INSULINA	8
1.1.2.1.1. VARIAÇÃO CIRCADIANA DA SECREÇÃO DE INSULINA	9
1.1.2.1.2. VARIAÇÃO CIRCADIANA DA GLICEMIA E DA INSULINEMIA EM HUMANOS	10
1.1.2.1.3. VARIAÇÕES ULTRADIANAS DE INSULINA	14
1.2. SECREÇÃO DE INSULINA	22
1.2.1. PARTICIPAÇÃO DOS ÍONS POTÁSSIO E CÁLCIO	23
1.2.2. INFLUÊNCIAS DO CICLO ALIMENTAÇÃO-JEJUM NO RITMO DA SECREÇÃO DE INSULINA	33
1.3. PROPOSIÇÃO DO TRABALHO	38
2. MATERIAIS E MÉTODOS	40
2.1. ANIMAIS	40
2.2. ISOLAMENTO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS	40
2.3. SECREÇÃO DE INSULINA EM CONDIÇÃO ESTÁTICA	41
2.4. DOSAGEM DE INSULINA	42
2.5. EFLUXO DE ⁸⁶ Rb	45

2.6. EFLUXO DE ^{45}Ca	46
2.7. CRONOLOGIA DOS EXPERIMENTOS	47
2.8. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DOS EFLUXOS	48
2.8.1. PROTOCOLOS DO EFLUXO DE ^{86}Rb	48
2.8.1.1. $G_{5,6} \rightarrow G_0 \rightarrow G_{5,6}$	48
2.8.1.2. $G_{5,6} \rightarrow G_{8,3} \rightarrow G_{5,6}$	49
2.8.2. PROTOCOLOS DO EFLUXO DE ^{45}Ca	50
2.9. REAGENTES	51
2.10. SOLUÇÕES	52
2.11. TRATAMENTO ESTATÍSTICO	55
3. RESULTADOS	58
3.1. SECREÇÃO DE INSULINA EM CONDIÇÃO ESTÁTICA	58
3.2. EFLUXO DE ^{86}Rb	63
3.2.1. EFEITO DA SUPRESSÃO DE GLICOSE SOBRE O EFLUXO DE ^{86}Rb , EM ILHOTAS DE RATOS ALIMENTADOS	63
3.2.2. EFEITO DA SUPRESSÃO DE GLICOSE SOBRE O EFLUXO DE ^{86}Rb , EM ILHOTAS DE RATOS EM JEJUM DURANTE 48 HORAS	66
3.2.3. COMPARAÇÃO DE EFEITOS DA SUPRESSÃO DE GLICOSE SOBRE O EFLUXO DE ^{86}Rb , ENTRE RATOS ALIMENTADOS OU EM JEJUM.	67
3.2.4. EFEITO DE GLICOSE (8,3 mM) SOBRE O EFLUXO DE ^{86}Rb , EM ILHOTAS DE RATOS ALIMENTADOS	69
3.3. CORRELAÇÃO ENTRE O EFLUXO DE ^{86}Rb E A SECREÇÃO DE INSULINA	70

3.4. EFEITO DE GLICOSE (16,7 mM) SOBRE O EFLUXO DE ^{45}Ca , EM ILHOTAS DE RATOS ALIMENTADOS	71
4. DISCUSSÃO	75
4.1. SECREÇÃO DE INSULINA	75
4.2. EFLUXO DE ^{86}Rb	82
4.2.1. EFEITOS DA SUPRESSÃO DE GLICOSE SOBRE O EFLUXO DE ^{86}Rb , EM ILHOTAS PANCREÁTICAS DE RATOS ALIMENTADOS	84
4.2.2. EFEITOS DA SUPRESSÃO DE GLICOSE SOBRE O EFLUXO DE ^{86}Rb , EM ILHOTAS DE RATOS SUBMETIDOS A JEJUM	88
4.2.3. EFEITOS DE GLICOSE (8,3 mM) SOBRE O EFLUXO DE ^{86}Rb , EM ILHOTAS PANCREÁTICAS DE RATOS ALIMENTADOS	94
4.3. EFLUXO DE ^{45}Ca	98
5. RESUMO E CONCLUSÕES	105
SUMMARY	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. RITMICIDADE DA NATUREZA VIVA

Ritmicidade é um fenômeno associado com o reino dos seres vivos em geral, sendo encontrada em todos os níveis de organização, desde simples células (ou organismos unicelulares), tecidos e órgãos, até animais¹ por inteiro (MINORS & WATERHOUSE, 1986¹⁹³).

Ritmo é a organização de um fenômeno no tempo. É, freqüentemente, descrito por seu período, média ou nível, amplitude e fase (WETTERBERG, 1994²⁷⁶).

Os ritmos biológicos são importantes para a saúde e bem estar do organismo, por duas razões. Primeiro, por permitirem temporização ótima das atividades biológicas, no contexto dos ciclos geofísicos ambientais. Eles capacitam o organismo a antecipar eventos periódicos em seu ambiente, podendo assim iniciar processos de desenvolvimento lento. Segundo, por proverem um arcabouço para a organização temporal da fisiologia e do comportamento, contribuindo desse modo para a manutenção de um meio interno equilibrado (WOLLNIK, 1989²⁸⁰). Assim, uma relação de fase estável, entre os diversos ritmos fisiológicos e comportamentais, leva à constituição de uma ordem temporal interna, que parece

¹ N. do A. Ritmicidade ocorre, igualmente, no reino vegetal e nos demais seres vivos.

ser condição de saúde para qualquer organismo (PALUDETTI, AFECHÉ & BENEDITO-SILVA, 1988²⁰⁰). A eficiência biológica é derivada da precisa organização das funções vitais, tanto no espaço quanto no tempo (SMOLENSKY & D'ALONZO, 1993²⁴³).

Mudanças fisiológicas, metabólicas e comportamentais nos organismos vivos estão usualmente sincronizadas com mudanças geofísicas periódicas de nosso ambiente, tais como a rotação diária da terra em torno do seu eixo (ritmos circadianos) e o movimento anual da terra em volta do sol (variações sazonais) (WETTERBERG, 1994²⁷⁶).

Todas as formas primitivas de vida tiveram inscritos na sua organização os princípios básicos das relações espaço-temporais, ou seja, essas relações devem ter sido os fundamentos essenciais dos quais a vida primitiva adquiriu suas propriedades básicas e adaptativas (ANOKHIN, 1974⁶). No período de surgimento da vida na Terra, a matéria pôde passar a interagir ativamente com as possíveis transformações espaço-temporais. Assim, para os organismos vivos, o tempo adquiriu sua própria significação. Os ritmos biológicos surgiram como incorporação da manifestação das propriedades antecipativas do protoplasma, propriedades estas que conferem o valor adaptativo desses ritmos (PALUDETTI, AFECHÉ & BENEDITO-SILVA, 1988²⁰⁰).

Muitas evidências experimentais indicam que a ritmicidade biológica foi filogeneticamente incorporada e é, atualmente, geneticamente determinada e endogenamente gerada (CIPOLLA-NETO & CAMPA, 1991⁵⁸). Nesse sentido, BUNNING (1935, *apud* HAUS & TOUITOU, 1992¹⁰⁷) demonstrou que ritmos circadianos são transmitidos de geração em geração, segundo leis genéticas. Por

outro lado, existem inúmeras evidências do caráter endógeno da ritmicidade biológica e da presença de suas manifestações nas mais variadas espécies, sugerindo que essas flutuações regulares são uma característica fundamental da matéria viva (PALUDETTI, AFECHÉ & BENEDITO-SILVA, 1988²⁰⁰).

1.1.1. RITMOS CIRCADIANOS

HALBERG (1959⁹⁹) introduziu a denominação *circadiano* para os ritmos endógenos com período de cerca de 24 horas. Esses ritmos evoluíram como resposta às enormes flutuações do ambiente físico, associadas com a alternância dia e noite. A aquisição de tais programas temporais, e seu adequado ajuste ao ciclo ambiente de 24 horas, capacita o organismo a se preparar antecipadamente para enfrentar diferentes situações (VAN CAUTER, 1989²⁶¹). Evidencia-se, assim, o conceito proposto por MOORE-EDE (1986¹⁹⁶) de *homeostasia antecipadora* ou *preditiva*.

Ritmos circadianos foram documentados em, praticamente, todas as espécies e em todos os níveis de organização dos seres vivos (MINORS & WATERHOUSE, 1986¹⁹³). Tais ritmos provêm alto grau de organização temporal dentro dos organismos, permitindo a realização de diferentes estados, através da segregação de seus momentos de ocorrência (VAN CAUTER, 1989²⁶¹). É difícil demonstrar-se uma variável corporal que não apresente flutuação circadiana (MINORS & WATERHOUSE, 1986¹⁹³).

ASCHOFF (1954, *apud* REINBERG & SMOLENSKY, 1983²¹⁸) e

HALBERG et al (1954, *apud* REINBERG & SMOLENSKY, 1983²¹⁸) desenvolveram a idéia de que variações cíclicas de fatores ambientais são capazes de influenciar a expressão de ritmos circadianos. Tais variações passaram a ser denominadas *sincronizadores*, *agentes arrastadores* ou *zeitgebers*². Um sincronizador não cria um ritmo; ele é capaz, apenas, de influenciar sua expressão, v.g., forçando a alteração do seu período e/ou a temporização do seu pico em relação à hora do dia (REINBERG & SMOLENSKY, 1983²¹⁸). O *zeitgeber* mais potente, para a maioria dos animais, é o ciclo claro-escuro (WOLLNIK, 1989²⁸⁰). Para a espécie humana, entretanto, os fatores sócio-ecológicos, decorrentes da organização social do trabalho e do lazer, são pelo menos tão importantes quanto aquele sincronizador (MINORS & WATERHOUSE, 1986¹⁹³; WOLLNIK, 1989²⁸⁰).

A maioria das flutuações diárias das variáveis fisiológicas e comportamentais é verdadeiramente endógena, uma vez que persistem mesmo quando não há sinalização externa (WOLLNIK, 1989²⁸⁰). Acredita-se que em animais mais complexos, as células individuais, os tecidos e os órgãos sejam dirigidos por um complexo de osciladores primários e secundários (MINORS & WATERHOUSE, 1986¹⁹³). O período e a fase dos ritmos são coordenados por relógios-marcapasso, localizados em vários níveis da organização biológica, sendo aqueles localizados no cérebro, aparentemente, os mais importantes (SMOLENSKY & D'ALONZO, 1993²⁴³).

² *Zeitgeber* é neologismo alemão, cujo significado etimológico é *doador de tempo* (*zeit* = tempo; *geber* = doador). Expressa uma oscilação externa que é capaz de sincronizar um ritmo biológico gerado endogenamente.

Embora os núcleos supraquiasmáticos (SCN) sejam o principal marcapasso circadiano em roedores, eles podem não ser os únicos (MEIJER & RIETVELD, 1989¹⁸⁸). Em primatas, enquanto os SCN controlam o ciclo sono-vigília, a secreção de somatotrofina e ritmos comportamentais, um segundo oscilador parece ser responsável pelo controle do sono REM (*Rapid Eye Movements*), do cortisol sérico e da temperatura central (CIPOLLA-NETO, 1988⁵⁷).

Não obstante a pineal atue como relógio biológico em vertebrados inferiores (FOULKES et al, 1997⁸⁴), em mamíferos não há evidências de que a pineal, por si, seja capaz de gerar ritmos circadianos, além de estar claro que não é necessária para a expressão desses ritmos em roedores (TUREK, 1994²⁵⁸). Entretanto, ARENDT (1995⁸) concluiu que, em mamíferos adultos, melatonina atua modulando a fase e a força de acoplamento da ritmicidade circadiana. Em humanos, por sua vez, há indicações de que essa indolamina pode atuar como *zeitgeber* interno (VAN CAUTER & TUREK, 1995²⁶³).

Embora os ritmos sejam dirigidos por oscilador(es) endógeno(s), o ambiente rítmico normal e os hábitos rítmicos também apresentam seus efeitos. Essas influências são os agentes *mascaradores*. Mascaramento, portanto, são os efeitos diretos e imediatos exercidos por periodicidades do ambiente sobre o ritmo expresso. Assim, efeitos *mascaradores* são uma consequência natural e inevitável de se viver em um ambiente rítmico. Conseqüentemente, a expressão final de um ritmo é mistura de efeitos *mascaradores* com os efeitos gerados pelo sistema de temporização interna do animal (WATERHOUSE & MINORS, 1988²⁷³).

1.1.2. RITMOS ENDÓCRINOS

Uma característica preeminente do sistema endócrino é seu elevado grau de organização temporal (VAN CAUTER & TUREK, 1995²⁶³). O interesse pelos ritmos biológicos aumentou grandemente, desde o reconhecimento do seu papel essencial em manter a função endócrina normal. Evidências mostrando que estados patológicos estão associados a ritmos anormais têm-se acumulado, e terapias que levam em conta a organização temporal da secreção endócrina foram desenvolvidas (VAN CAUTER, 1989²⁶¹).

Várias vantagens biológicas da transmissão pulsátil do sinal endócrino têm sido postuladas. RAPP, MEES & SPARROW (1981²¹⁵) sustentaram, em analogia com a engenharia de sistemas, que a regulação bioquímica codificada por frequência seria mais precisa e menos sujeita à degradação por ruído do que o controle dependente de amplitude. Por outro lado, NEWSHOLME (1978¹⁹⁸) sugeriu que os sistemas biológicos que ciclam rapidamente são capazes de promover transições mais rápidas para novos estados fisiológicos.

A secreção de, provavelmente, todos os hormônios é afetada, de uma ou outra forma, pelo sistema do relógio circadiano (TUREK, 1994²⁵⁸). Embora uma estrutura temporal circadiana do sistema endócrino esteja presente em nível celular e em órgãos, *inter alia*, é evidente que existe uma hierarquia de ritmos (SENSI, PACE-PALITTI & GUAGNANO, 1993²³²).

Os ritmos endócrinos podem ser classificados de acordo com sua frequência de oscilação. Presumivelmente, em razão de sua ubiquidade nos seres

vivos, a periodicidade circadiana é usada para subdividir o espectro de ritmos biológicos em duas faixas: a faixa *ultradiana*, que inclui ritmos com períodos menores que 20 horas, e a faixa *infradiana*, na qual os ritmos apresentam períodos maiores que 28 horas (HALBERG & REINBERG, 1967¹⁰¹).

Três diferentes tipos de mecanismos parecem interagir, para produzir os complexos padrões da secreção hormonal durante o ciclo de 24 horas: pulsatilidade, ritmicidade circadiana e efeitos intrínsecos do sono (VAN CAUTER, 1989²⁶¹).

As implicações clínicas da ritmicidade circadiana em Endocrinologia dizem respeito, tanto ao diagnóstico, quanto ao tratamento de patologias. Enquanto variações circadianas podem complicar a interpretação dos procedimentos de diagnóstico, elas podem também ser usadas para maximizar seu poder discriminatório, por selecionar adequadamente o momento de coleta da amostra que melhor diferenciará entre várias condições. Igualmente, melhores protocolos terapêuticos podem ser designados, por levarem em conta as propriedades cronobiológicas do sistema (VAN CAUTER, 1989²⁶¹). Assim, os valores medidos no exame clínico de um paciente incluirão, usualmente, tanto o componente endócrino do ritmo, quanto o mascaramento desse ritmo por fatores ambientais (HAUS & TOUITOU, 1992¹⁰⁷).

1.1.2.1. RITMOS DA SECREÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE INSULINA

O ritmo de insulina pode ser um importante mediador do controle neuroendócrino do metabolismo (TEDFORD & MEIER, 1993²⁵³). Nesse sentido, constatou-se que, em fígado de rato, insulina é o principal controlador da variação diária de síntese da proteína carreadora de esterol (SCP). Esta proteína é o mais importante regulador intracelular do metabolismo e transporte lipídicos em hepatócitos (HARGIS et al, 1986¹⁰⁶). Assim, o período diário de elevada insulinemia pode ser importante para o controle da atividade lipogênica (CINCOTTA & MEIER, 1984⁵⁶).

A função desempenhada por insulina na regulação glicêmica parece ser programada em base circadiana, ao invés de representar um fenômeno de *feedback* independente de tempo, como postulado pela hipótese homeostática convencional (MÉJEAN et al, 1988¹⁹⁰). Nesse sentido, há indicações de que os ritmos diários da insulinemia não são meras reações homeostáticas às variações da glicemia (GAGLIARDINO & HERNÁNDEZ, 1971⁸⁶) ou à ingestão alimentar (TEDFORD & MEIER, 1993²⁵³).

1.1.2.1.1. VARIAÇÃO CIRCADIANA DA SECREÇÃO DE INSULINA

A variação circadiana da secreção de insulina pode estar ligada a um ritmo endógeno da função da célula beta ou a uma ritmicidade de receptores de insulina, bem como à ritmicidade da ligação desse hormônio (MÉJEAN, KOLOPP & DROUIN, 1992¹⁸⁹).

Sustentam a primeira hipótese várias linhas de investigação. Assim, HELLMAN & HELLERSTRÖM (1959¹¹¹) demonstraram variação circadiana do volume nuclear da célula beta. Outrossim, JASPAN et al (1986¹³⁹) verificaram variação circadiana da pulsatilidade *in vivo* dos peptídios pancreáticos insulares. Por sua vez, VILLAUME et al (1984²⁶⁹) constataram ausência de ritmicidade da secreção de insulina em pacientes portadores de insulinomas. Finalmente, NICOLAU et al (1983¹⁹⁹) confirmaram a existência de ritmo circadiano do peptídio C em indivíduos saudáveis.

Por outro lado, a segunda hipótese é sustentada por investigações indicativas de variação circadiana da ligação de insulina aos receptores de hemáceas ou monócitos (BECK-NIELSEN & PEDERSEN, 1978²⁰; HUNG, BEYER & SCHULZ, 1986¹²⁹). Ainda nesse sentido, LEVY et al (1987¹⁶¹) afirmaram que a secreção de insulina seria modulada por alterações da sensibilidade dos tecidos periféricos a esse hormônio.

O mecanismo de variação diária da secreção de insulina em indivíduos normais é desconhecido (LEE, BRAY & KLETZKY, 1991¹⁵⁴), mas parece ser

primariamente endógeno em origem (MÉJEAN et al, 1988¹⁹⁰) e controlado diretamente por um oscilador circadiano, que influencia a secreção pancreática e o metabolismo de glicose, através de um sinal neural modulado pelos SCN (SAKAGUCHI, TAKAHASHI & BRAY, 1988²²⁶). Esta idéia é coerente com a verificação de que a lesão bilateral dos SCN, em ratos, aboliu a ocorrência do ritmo diário da insulinemia (YAMAMOTO, NAGAI & NAKAGAWA, 1987²⁸⁴).

1.1.2.1.2. VARIAÇÃO CIRCADIANA DA GLICEMIA E DA INSULINEMIA EM HUMANOS

Numerosos estudos indicam que, no ser humano, a hora do dia influencia a regulação normal da glicemia por insulina. Assim, variação diária da tolerância a glicose foi, inicialmente, demonstrada por diferentes grupos de pesquisadores (ROBERTS, 1964²²⁰; BOWEN & REEVES, 1967³⁷; CAMPBELL et al, 1975⁴²; VERRILLO, DE TERESA & RUCCO, 1984²⁶⁸). Por sua vez, APARICIO et al (1974⁷) constataram variação circadiana, tanto da glicemia, quanto da insulinemia, em indivíduos submetidos ao teste de tolerância a glicose (GTT) oral. Entretanto, a intensidade da variação diária desse teste foi significativa e inversamente relacionada ao grau de obesidade dos pacientes (JARRETT & KEEN, 1970¹³⁶). Vários grupos confirmaram aqueles achados, mostrando diminuição da tolerância a glicose no período da tarde e/ou noite, comparada com a tolerância pela manhã (SENSI et al, 1971²³⁴; JARRETT et al, 1972¹³⁸; SENSI et al, 1973²³³; ZIMMET et al, 1974²⁸⁷; COSCELLI, ALPI & BUTTURINI, 1978⁶⁵; KOFINAS, MEIS & ROSE, 1988¹⁴⁴;

VAN CAUTER, 1990²⁶²; VAN CAUTER et al, 1991²⁶⁶; LEE et al, 1992¹⁵⁵).

Menores glicemias também foram observadas pela manhã, em experimentos em que refeições-padronizadas foram ingeridas ao longo do dia (VAN CAUTER, 1990²⁶²).

CARROLL & NESTEL (1973⁴⁹) constataram que indivíduos normais reagiram ao GTT vespertino tal como diabéticos moderados e atribuíram o fato à diminuída resposta inicial pancreática a glicose. Resultados semelhantes foram obtidos por COSCELLI, ALPI & BUTTURINI (1978⁶⁵), após administração endovenosa de glicose ou glicose mais glucagon. O termo *diabetes vespertino* passou a ser usado para descrever esse fenômeno, que reflete um decréscimo progressivo da tolerância a glicose, atingindo um mínimo na metade do sono, em indivíduos normais (JARRETT, VIBERTI & AL SAYEGH, 1978¹³⁷; VAN CAUTER, 1990²⁶²).

RIGAS et al (1968²¹⁹) e MALHERBE et al (1969¹⁸⁰) demonstraram variação circadiana da insulina plasmática em indivíduos que ingeriram três refeições padronizadas durante o dia. Diversos pesquisadores confirmaram essas constatações, ao registrarem maiores respostas secretórias de insulina no período matutino, tanto no GTT (JARRETT et al, 1972¹³⁸; SENSI et al, 1973²³³; CARROLL & NESTEL, 1973⁴⁹; APARICIO et al, 1974⁷; WHICHELOW et al, 1974²⁷⁷; MELANI et al, 1976¹⁹¹; LEE et al, 1992¹⁵⁵), quanto após refeições padronizadas (HAUTECOUVERTURE et al, 1974¹⁰⁸). Tais constatações repetiram-se em humanos saudáveis, após administração de glucagon (MELANI et al, 1976¹⁹¹) ou, ainda, em diabéticos tratados com diferentes hipoglicemiantes orais (RIGAS et al, 1968²¹⁹).

VERRILLO, DE TERESA & RUCCO (1984²⁶⁸) constataram menor razão insulina/glicose nos experimentos efetivados à tarde e à meia-noite. Sugeriram, então, que a causa desse fenômeno seria a variação circadiana do processo que regula a síntese e secreção de insulina. SERVICE et al (1983²³⁵) associaram o declínio progressivo da tolerância a carboidratos, das 8 às 18 h, à redução da secreção de insulina, estimada pelo peptídio C, bem como à redução da ação periférica de insulina. Nesse sentido, ritmo circadiano do peptídio C foi confirmado por NICOLAU et al (1983¹⁹⁹) em indivíduos saudáveis. Por sua vez, LEE, BRAY & KLETZKY (1991¹⁵⁴), executando *clamp* hiperglicêmico em humanos, demonstraram significativa variação da secreção de insulina, com maior secreção pela manhã, ao administrarem arginina por via endovenosa.

Assim, inúmeros pesquisadores atribuíram a redução da tolerância a glicose, nos períodos vespertino e noturno, à diminuída resposta pancreática, interpretando que os maiores níveis glicêmicos nos testes, nesses períodos, foram resultado da insulinoopenia (JARRETT & KEEN, 1969¹³⁵; JARRETT et al, 1972¹³⁸; CARROLL & NESTEL, 1973⁴⁹; ZIMMET et al, 1974²⁸⁷; APARICIO et al, 1974⁷; WHICHELOW et al, 1974²⁷⁷; GAGLIARDINO, HERNÁNDEZ & REBOLLEDO, 1984⁸⁸). Igualmente, estudos de POLONSKY, GIVEN & VAN CAUTER (1988²⁰⁷) evidenciaram que a resposta das células beta, à ingestão de refeição mista, pode ser influenciada pela hora do dia em que a ingestão ocorre.

Portanto, a resposta das células beta a um estímulo particular parece, em parte, ser dependente da hora em que o estímulo é administrado (BYRNE et al, 1996⁴¹). Nesse sentido, têm-se obtido resultados sugestivos de que a variação na resposta insulínica a glicose pode resultar de alterações circadianas da

sensibilidade da célula beta, provocando maior responsividade pela manhã, com redução a partir daí (APARICIO et al, 1974⁷; LEE et al, 1992¹⁵⁵; VAN CAUTER et al, 1992²⁶⁴).

Do ponto de vista clínico, a hora do dia pode ser importante para o diagnóstico e tratamento das condições de diminuição da tolerância a glicose (VAN CAUTER et al, 1991²⁶⁶). Assim, JARRETT & KEEN (1970¹³⁶) sugeriram que a hiperglicemia vespertina é o primeiro estágio no desenvolvimento de intolerância a glicose. WALSH & WRIGHT (1975²⁷¹) verificaram que, na seqüência de evolução da moléstia, ocorre perda do ritmo diário da secreção de insulina.

Por outro lado, não se tem detectado variação circadiana da tolerância a glicose em pacientes nos quais essa tolerância é deficiente, tais como indivíduos obesos (MARLISS et al, 1970¹⁸¹) ou pacientes diabéticos (CARROLL & NESTEL, 1973⁴⁹).

Extendendo as constatações acima, tem-se também demonstrado a ocorrência de ritmo circadiano da insulinemia em ovinos (HOLLEY & EVANS, 1974¹²⁵), no hamster (DE SOUZA & MEIER, 1987⁶⁸), coelho (LESAULT, ELCHINGER & DESBALS, 1991¹⁵⁹), rato (JOLIN & MONTES, 1973¹⁴⁰; BELLINGER, MENDEL & MOBERG, 1975²²; MARTIN, WANGSNESS & GAHAGAN, 1978¹⁸³; LIMA et, 1981¹⁶⁴; IKONOMOV et al, 1985¹³⁰; AHLERSOVÁ, AHLERS & TOROPILA, 1986²; WATANABE & UCHIYAMA, 1988²⁷²; IWASHITA et al, 1996¹³²), camundongo (GAGLIARDINO & HERNÁNDEZ, 1971⁸⁶; GAGLIARDINO & HERNÁNDEZ, 1972⁸⁷; PESSACQ et al, 1976²⁰⁴); cão (FISCHER et al, 1985⁸³) e em aves (TEDFORD & MEIER, 1993²⁵³).

Por fim, deve-se ressaltar que, enquanto ritmos circadianos expressam apenas uma frequência, na complexa estrutura temporal humana de múltiplas frequências (HAUS & TOUITOU, 1992¹⁰⁷), o comportamento oscilatório ultradiano parece ser a regra, ao invés de exceção, no sistema endócrino (MATTHEWS, 1991¹⁸⁵; VAN CAUTER & TUREK, 1995²⁶³). Este aspecto passa a ser focado no item que segue.

1.1.2.1.3. VARIAÇÕES ULTRADIANAS DE INSULINA

Há grandes razões biológicas para a secreção pulsátil dos hormônios. Assim, pulsações são *econômicas*; mais precisas em propiciar controle; mais *seguras* que as curvas dose-resposta e permitem aos tecidos periféricos a opção de auto-regulação (MATTHEWS, 1991¹⁸⁵).

Alteração da concentração hormonal pode ser o sinal, enquanto a mensagem pode estar no pulso e não no nível médio de fundo. Assim, a natureza dinâmica do pulso é, por si, mais importante que o ponto de ajuste médio. Frequentemente, sistemas hormonais usam pulsações como forma de transmitir mensagens confiáveis, através das incertezas da circulação, cujo tamanho é desconhecido, diluindo, assim, o sinal, e através dos rins e fígado — removendo, portanto, uma quantidade imprevisível — para atingir uma célula cujo receptor encontra-se em estado incerto (MATTHEWS, 1991¹⁸⁵).

O padrão oscilatório dos níveis de hormônio plasmático pode ter importância fisiológica como redutor de *down regulation* de receptores e, assim,

aumentar a ação hormonal (LEFÈBVRE et al, 1987¹⁵⁶).

Numerosos estudos demonstraram que a secreção da insulina humana é um processo oscilatório complexo, que inclui pulsos rápidos, recorrentes a cada 10 a 15 minutos, superpostos a oscilações ultradianas mais lentas, com períodos entre 90 e 120 minutos (LANG et al, 1979¹⁵⁰; VAN CAUTER & TUREK, 1995²⁶³). Assim, oscilações ultradianas da secreção de insulina e da glicemia, com períodos na faixa de 80 a 130 minutos, foram observadas em resposta a refeições (SIMON, FOLLENIUS & BRANDENBERGER, 1987²³⁹), durante nutrição enteral contínua (SIMON, BRANDENBERGER & FOLLENIUS, 1987²³⁸) e durante infusão constante de glicose (VAN CAUTER et al, 1989²⁶⁵). Constatou-se, também, que a nutrição enteral contínua não impede a ocorrência do ritmo ultradiano da glicemia e da insulinemia (BRANDENBERGER, SIMON & FOLLENIUS, 1987³⁸). Humanos que receberam infusão de glicose, sob fluxo constante, apresentaram grandes oscilações ultradianas de glicose e de insulina plasmáticas, com periodicidade média de duas horas em todos os indivíduos (VAN CAUTER et al, 1989²⁶⁵). Por outro lado, utilizando análise espectral, MÉJEAN et al (1988¹⁹⁰) demonstraram, em humanos, a existência de ritmo ultradiano da insulinemia, com período de seis horas.

HANSEN et al (1982b¹⁰⁴) mostraram, em macacos, que as oscilações dos níveis plasmáticos de insulina foram similares nos períodos imediatamente subseqüentes à ingestão alimentar, no período pós-absortivo imediato e após jejum prolongado.

Em outro sentido, LANG et al (1982¹⁵¹) constataram, em humanos, significativa correlação entre as amplitudes dos ciclos simultâneos de insulina e

glucagon plasmáticos.

JASPAN et al (1986¹³⁹) demonstraram oscilações espontâneas dos quatro peptídeos pancreáticos no cão, com períodos situados na mesma faixa daqueles registrados em babuínos e em humanos. Por outro lado, no rato, CHOU et al (1991a⁵⁴) verificaram a existência de oscilações da insulina sérica, *in vivo*, com período de 13,3 minutos, enquanto em ilhotas isoladas BERGSTROM et al (1989²⁶) constataram oscilações da secreção de insulina, com período de 16 minutos. Neste mesmo tipo de preparação, CHOU, BERMAN & IPP (1994⁵³) demonstraram oscilações de baixa frequência da secreção de insulina, com período entre 50 e 100 minutos. Igualmente, tem-se verificado, em humanos, que o aumento da concentração de glicose provoca aumento da amplitude, mas não da frequência, das oscilações da secreção de insulina (STURIS et al, 1993²⁴⁸). Em parcial discordância estão resultados recentes de PØRKSEN et al (1996²⁰⁹), obtidos, *in vivo*, em pâncreas de cães. Segundo estes autores, o mecanismo pelo qual a ingestão de glicose ativa a secreção de insulina inclui aumento de cerca de 400% da massa de insulina secretada por *burst*, bem como aumento de cerca de 40% da frequência de *bursts*.

Ritmos ultradianos representariam o padrão temporal do qual os ritmos circadianos seriam derivados por modulação de frequência e amplitude (WOLLNIK, 1989²⁸⁰). Talvez o melhor exemplo da modulação circadiana de ritmos ultradianos seja encontrado no sistema endócrino humano. Há evidências de que a fase, a amplitude e a frequência das oscilações ultradianas podem ser moduladas pelo relógio circadiano (TUREK, 1994²⁵⁸).

A origem das oscilações ultradianas da glicemia e da insulinemia não

está, ainda, totalmente esclarecida (VAN CAUTER & TUREK, 1995²⁶³). KOERKER et al (1978¹⁴³) propuseram que oscilações dos níveis plasmáticos de insulina em macacos refletem oscilações secretórias, ao invés de oscilações do *clearance* metabólico. Esta hipótese baseia-se no fato de que oscilações dos níveis plasmáticos do peptídio C — secretado em razão-equimolar com insulina, mas depurado diferentemente, a velocidade muito menor que insulina — correlacionam-se precisamente com as oscilações da insulina plasmática. Tais observações também foram confirmadas em humanos (SIMON, FOLLENIUS & BRANDENBERGER, 1987²³⁹). Outrossim, HANSEN et al (1982a¹⁰³) concluíram que, em humanos, as oscilações da glicemia, enquanto freqüentemente associadas àquelas de insulina, não são responsáveis pelas oscilações da insulina plasmática, ou não são para elas essenciais. A observação de oscilações, também durante infusão constante de glicose, indica que as mesmas não são dependentes da ingestão alimentar (SHAPIRO et al, 1988²³⁶).

A grande amplitude e consistência das oscilações da insulinemia, que provavelmente são reflexo da secreção de insulina, sugerem que a atividade das células beta distribuídas pelo pâncreas deve ser altamente coordenada (HANSEN et al, 1982a¹⁰³). Pâncreas isolado de cão, exposto a concentração constante de glicose, apresentou oscilações da secreção de insulina, com período de oito a doze minutos, indicando que o próprio pâncreas é o *zeitgeber* dos ciclos de glicose e insulina *in vivo* (STAGNER, SAMOLS & WEIR, 1980²⁴⁵). Em pacientes com transplante de pâncreas observou-se oscilação da secreção de insulina sob condição basal, bem como durante infusão constante de glicose. O período dominante dessas oscilações parece ser o dobro daquele observado em pâncreas

normal (KERN et al, 1990¹⁴²).

O marcapasso que controla a secreção de insulina em humanos é notavelmente estável. Sua periodicidade não é afetada quando a secreção de insulina é estimulada por glicose, tolbutamida ou bloqueadores alfa-adrenérgicos (MATTHEWS et al, 1983a¹⁸⁶). É crença geral que as medidas, *in vivo*, dos níveis séricos de insulina refletem flutuações da secreção de insulina, e que o marcapasso dessas oscilações está localizado no próprio pâncreas (LANG et al, 1981¹⁴⁹; LEFÈBVRE et al, 1987¹⁵⁶), apresentando sensibilidade alterada em vários estados nutricionais (HANSEN et al, 1982b¹⁰⁴). CHOU & IPP (1990⁵¹) constataram que ilhotas desligadas do meio pancreático continuam a secretar insulina de maneira pulsátil. Nesse sentido, SONNENBERG et al (1992²⁴⁴) observaram que essa pulsatilidade é gerada independente da inervação extrínseca, enquanto CHOU, BERMAN & IPP (1994⁵³) sugeriram que oscilações ultradianas de baixa frequência podem ser independentemente geradas a partir de uma fonte insular. Essas conclusões estão de acordo com BERGSTROM et al (1989²⁶) e CHOU & IPP (1990⁵¹), ao sugerirem que o marcapasso da secreção de insulina é intrínseco à ilhota. De outro modo, CHOU et al (1991b⁵⁵) demonstraram, em tecido de insulinoma humano, que as células beta são capazes de gerar atividade secretória pulsátil de insulina, não-dependente de inervação ou da presença de outras células insulares. Demonstraram, também, pulsatilidade inerente à célula beta, na atividade secretória de pró-insulina.

LIPKIN, TELLER & DE HAËN (1983¹⁶⁵) especularam que a secreção oscilatória de insulina estaria relacionada com um ciclo de 14 minutos da atividade glicolítica da célula beta, concluindo que a glicólise atuaria como marcapasso.

Nessa linha de raciocínio, CHOU, BERMAN & IPP (1992⁵²), utilizando análise espectral, demonstraram acentuada similaridade entre os padrões da oscilação de lactato e insulina, durante perfusão de ilhotas por solução contendo glicose (16,7 mM). A similaridade entre os períodos da oscilação de lactato e de insulina sugere a possibilidade de que as oscilações da glicólise possam prover um mecanismo para a secreção pulsátil de insulina. Consideram, entretanto, improvável que seja o lactato o fator gerador da flutuação de insulina. Uma hipótese lógica é que o metabolismo oscilatório seja responsável pela secreção rítmica de insulina, ao menos quando o estímulo é glicose (TORNHEIM, 1997²⁵⁶; PRENTKI, TORNHEIM & CORKEY, 1997²¹²). Entretanto, ainda não se demonstrou que uma interferência nesse padrão de metabolismo altera o padrão oscilatório de secreção (TORNHEIM, 1997²⁵⁶). É provável que a atividade marcapasso nas células beta resulte da influência conjunta de vários metabólitos, em múltiplos sítios regulatórios do citosol e mitocôndrias (MACDONALD et al, 1997¹⁶⁸).

Alguns estudos mostraram correlação temporal entre oscilações da secreção de insulina e oscilações do Ca^{2+} citosólico, sugerindo que o fluxo de Ca^{2+} é a força motriz desse processo (BERGSTEN et al, 1994²⁵; BERGSTROM et al, 1989²⁶).

Acredita-se que a perda da secreção oscilatória coordenada de insulina possa desempenhar um papel na patofisiologia do *diabetes* (VAN CAUTER, 1989²⁶¹). As oscilações ultradianas da secreção de insulina são mais irregulares em humanos acometidos de *diabetes mellitus* tipo 2 (POLONSKY et al, 1988²⁰⁸). Em consequência, CHOU, BERMAN & IPP (1994⁵³) propuseram que, nessa patologia, a sincronização por glicose, da célula beta anormal, é menos eficiente que em

sujeitos normais.

Um crescente corpo de dados experimentais, obtidos *in vitro* e *in vivo* (em humanos), sugere que a pulsatilidade aumenta a eficiência do acoplamento entre a secreção hormonal insular e a resposta ao hormônio. A perda, no *diabetes* tipo 2, do ciclo secretório de insulina com período de 10 a 14 minutos, é consistente com esse papel funcional postulado para a secreção hormonal insular (WEIGLE, 1987²⁷⁴). Assim, parte da resistência periférica a insulina poderia ser atribuída à qualidade temporal prejudicada da produção desse hormônio, em oposição à redução da quantidade total produzida (MATTHEWS et al, 1983b¹⁸⁷). Corrobora essa idéia a demonstração, em humanos normais, de que insulina é mais efetiva ao reduzir a glicemia quando administrada por via endovenosa, de maneira oscilatória, através de pulsos com períodos de 13 minutos (MATTHEWS et al, 1983b¹⁸⁷) ou de 120 minutos (STURIS et al, 1995²⁴⁷), do que ao ser injetada sob fluxo constante.

PAOLISSO et al (1987²⁰¹) verificaram maior eficiência da insulina administrada de maneira pulsátil, ao reduzir a glicemia de pacientes acometidos de *diabetes* tipo 1. Não obstante, tentativas de melhor controlar esse tipo de *diabetes*, por administração subcutânea pulsátil de insulina, foram infrutíferas (LEVY-MARCHAL, ALBISSER & ZINMAN, 1983¹⁶⁰). Outro efeito benéfico da administração pulsátil de insulina parece ser a redução da hiperglucagonemia em diabéticos (LEFÈBVRE et al, 1987¹⁵⁶).

Oscilações ultradianas podem ter significado fisiológico em humanos (VAN CAUTER et al, 1989²⁶⁵). Assim, verificou-se que a hiperglicemia desencadeia a secreção de insulina, segundo cinética baseada não apenas na curva dose-resposta. Para tanto, a secreção ocorre na forma de *pacote* finito — que provoca um

pulso — após o que o pâncreas torna-se quiescente por cerca de 13 minutos. Há evidências de que a secreção é realmente *desligada* durante esse período e, então, reativada, dependendo da nova concentração de glicose (MATTHEWS, 1991¹⁸⁵).

Flutuações regulares dos níveis plasmáticos de hormônios e substratos podem ter evoluído para aumentar, não somente a estabilidade pela qual a glicose sangüínea é controlada no jejum, mas também a eficiência do armazenamento de carboidratos nos tecidos, nos períodos em que esses nutrientes estão disponíveis (MARSH, MARSH & BERGMAN, 1986¹⁸²). Acredita-se que a secreção pulsátil sincrônica de glucagon e insulina seja um mecanismo pelo qual se limitem os efeitos hepáticos de insulina, mantendo-se, daí, a produção hepática de glicose, mas permitindo-se suficientes concentrações periféricas de insulina, para inibir excessivo catabolismo (LANG et al, 1982¹⁵¹).

É provável que a secreção pulsátil de insulina desempenhe importante função no controle metabólico, na situação de mudança do estado alimentar (SAFARIK, JOY & CURRY, 1988²²⁵). Uma possível adaptação é a promoção, por jejum, da redução do período das oscilações da secreção de insulina, com aumento de sua freqüência. Tal ajuste é mediado pela interação entre o marcapasso intrapancreático e o sistema nervoso central (SNC). O encurtamento do período pode ser um mecanismo de redução da densidade de receptores de insulina. Período menor (freqüência maior) de oscilações pode provocar *down regulation* de receptores, porque menor intervalo entre picos de insulina resultaria em nível de secreção quase constante. Atenuação das flutuações de insulina acarretaria uma condição benéfica no jejum, reduzindo a responsividade tecidual à insulina secretada, através do aumento de *down regulation* de seus receptores. Admite-se

que este é um mecanismo pelo qual o suprimento limitado de glicose pode ser conservado para o SNC, durante condições de jejum (SAFARIK, JOY & CURRY, 1988²²⁵). A interação entre jejum, secreção de insulina e ritmos circadianos é enfocada no item 1.2.2.

1.2. SECREÇÃO DE INSULINA

O processo da secreção de insulina estimulada por glicose inicia-se pela difusão facilitada dessa hexose, via GLUT1 ou GLUT2, através do plasmalema da célula beta pancreática, à qual se segue a fosforilação catalisada pela hexoquinase e a metabolização na via glicolítica e no ciclo de Krebs. O aumento da razão citosólica ATP/ADP, atuando via subunidade receptora de sulfoniluréias (SUR1), gera o fechamento de canais K^+_{ATP} — subunidade Kir6.2 (BIR) — do que resulta diminuição da saída de K^+ . O conseqüente *acúmulo* deste íon no citosol provoca despolarização da membrana plasmática e abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (VDCCs). O aumento da entrada de Ca^{2+} eleva a atividade citosólica deste cátion e desencadeia a exocitose dos grânulos de insulina (ASHCROFT & ASHCROFT, 1992¹¹; LENZEN, 1992¹⁵⁷; MALAISSE, 1992¹⁷¹; AIZAWA et al, 1994⁴; AMMON & WAHL, 1994⁵; BERGGREN et al, 1994²⁴; RORSMAN et al, 1994²²³; INAGAKI et al, 1995¹³¹; BOSCHERO, 1996³¹; AGUILAR-BRYAN et al, 1998¹; BOSCHERO et al, 1998³⁴). Não obstante se reconheça a importância da seqüência descrita acima, uma segunda via de sinalização, independente do canal K^+_{ATP} , tem sido proposta (BEST, YATES & TOMLINSON,

1992²⁸; GEMBAL, GILON & HENQUIN, 1992⁸⁹; SATO et al, 1992²²⁸; GEMBAL et al, 1993⁹⁰; AIZAWA et al, 1994⁴; KOMATSU et al, 1997¹⁴⁵).

1.2.1. PARTICIPAÇÃO DOS ÍONS POTÁSSIO E CÁLCIO

Canais de potássio constituem o mais variado grupo de canais iônicos, consequência da multiplicidade de funções que devem executar. Estas incluem o controle do potencial de repouso da membrana plasmática e a regulação dos potenciais de ação, quanto a seu início, término e periodicidade. São, também, alvo de numerosos hormônios e neurotransmissores, hábeis em promover ou inibir a secreção, por mecanismos que dependem, em parte, de alterações do potencial da membrana celular (DUNNE et al, 1994⁷⁴).

Existem pelo menos cinco diferentes tipos de canais seletivos de K^+ na célula beta, a saber: o canal de K^+ regulado por ATP (canal K^+_{ATP}); o canal de K^+ ativado por Ca^{2+} (canal $K^+_{Ca^{2+}}$); o canal retificador tardio (canal K^+-DR); o canal de K^+ ativado por transmissores inibitórios (canal K^+-I) e o canal transiente (canal K^+-A). Potássio pode também fluir através do canal não-seletivo de cátions (canal NS) (ASHCROFT & ASHCROFT, 1992¹¹).

Os canais $K^+_{Ca^{2+}}$ são ativados, tanto por despolarização, quanto por aumento da atividade citosólica de Ca^{2+} (TABCHARANI & MISLER, 1989²⁵⁰). São bloqueados por caribdotoxina ou baixas concentrações de tetraetilamônio (TEA). Contribuem para a repolarização da membrana durante o potencial de ação, mas

não para as ondas lentas (KUKULJAN, GONÇALVES & ATWATER, 1991¹⁴⁶).

Os canais K^+ -DR são dependentes de voltagem e aumentam sua atividade com a despolarização. Sua função é repolarizar a membrana (ASHCROFT & ASHCROFT, 1992¹¹).

Os canais K^+ -A são de observação infreqüente em preparações de células beta e sua participação na atividade elétrica dessas células parece não ser significativa (DUNNE et al, 1994⁷⁴).

Os canais K^+ -I são ativados por hormônios hiperglicemiantes e neurotransmissores (RORSMAN et al, 1991²²⁴) e respondem a somatostatina, clonidina e galanina por meio da proteína-G inibitória (G), sensível à toxina *pertussis* (ASHCROFT & ASHCROFT, 1992¹¹). Sua ativação pode ser responsável pela hiperpolarização provocada por adrenalina (DUNNE et al, 1994⁷⁴).

Os canais K^+ _{ATP} são independentes de voltagem e se fecham perante concentrações micromolares de ATP no citosol (COOK & HALES, 1984⁶⁰; COOK et al, 1988⁶¹). Os níveis citosólicos de ATP e a inibição do efluxo de K^+ por glicose atingem seu máximo em concentrações de 5,6 mM (aprox.) dessa hexose (WAHL, WALDNER & AMMON, 1992²⁷⁰; AMMON & WAHL, 1994⁵). Além do ATP, um número considerável de outros constituintes citosólicos influenciam esses canais, tais como: gliceraldeído, glicose, aminoácidos, produtos intermediários do ciclo de Krebs, proteínas-quinases e fosfatases (ASHCROFT & RORSMAN, 1989¹²). É provável que existam outros fatores alternativos ou complementares, responsáveis pela regulação metabólica dos canais K^+ _{ATP} (ASHCROFT & ASHCROFT, 1992¹¹). Além disso, são seletivamente bloqueados por sulfoniluréias (e.g. tolbutamida e

glibenclamida) (GILLIS et al, 1989⁹¹). Recentemente, demonstrou-se que o canal K^+_{ATP} das células beta apresenta estrutura heteromultimérica, composta por, pelo menos, duas subunidades essenciais: o canal de retificação interna — Kir6.2 (BIR) — e o receptor de sulfoniluréia (SUR 1) (INAGAKI et al, 1995¹³¹).

Em geral, predomina a resposta dos canais K^+_{ATP} às concentrações intracelulares de ATP, mas muitos outros nucleotídeos, incluindo ADP, têm grande influência sobre a frequência de abertura e fechamento desses canais (DUNNE et al, 1994⁷⁴). Assim, considera-se a relação ATP/ADP como o maior determinante da sua atividade (DUNNE et al, 1988⁷⁵; ASHCROFT & RORSMAN, 1990¹³). Níveis reduzidos de ADP livre permitem à elevada concentração de ATP fechar canais K^+_{ATP} , despolarizar as células beta e conduzir à abertura dos VDCCs, provocando o aumento do Ca^{2+} livre citosólico (HOPKINS et al, 1992¹²⁶). A relação citosólica ATP/ADP é máxima em 5,6 mM de glicose, situação também de máxima inibição do efluxo de K^+ por esse nutriente (ERECINSKA et al, 1992⁷⁸).

Um novo modelo de regulação do canal K^+_{ATP} — *duplo sítio* — foi proposto. Este modelo inclui o sítio de ATP previamente descrito, que pode ligar tanto ATP, quanto altas concentrações de ADP, diminuindo a abertura do canal, e um novo e separado sítio ligante de Mg.ADP, que aumenta a abertura do canal. Os resultados experimentais sustentam as predições do novo modelo, uma vez que decréscimo do ADP livre, acompanhando aumento da razão ATP/ADP, provoca fechamento de canais K^+_{ATP} (CORKEY et al, 1994⁶³).

Em concentrações subestimulatórias de glicose, o potencial de repouso da célula beta é estabelecido pela atividade dos canais K^+_{ATP} , e muitos

canais abertos podem ser registrados em células beta desprovidas de suprimento energético (COOK & HALES, 1984⁶⁰; ASHCROFT, ASHCROFT & HARRISON, 1988¹⁴; ASHCROFT et al, 1992¹⁷; DUNNE et al, 1994⁷⁴).

O fechamento de canais K^+_{ATP} , pelo ATP, representa um mecanismo de ligação entre o metabolismo e os fluxos iônicos (ASHCROFT & ASHCROFT, 1992¹¹). Glicose (5 a 20 mM) é capaz de inibir a atividade de canais K^+_{ATP} (ASHCROFT et al, 1992¹⁷). Substratos do metabolismo da célula beta produzem decréscimo rápido, reversível e dose-dependente da atividade de canais K^+_{ATP} . Assim, 50% dos canais ativos, na ausência de glicose, são inibidos por 2 mM dessa hexose, e mais de 90% são inibidos por 5 mM do secretagogo (MISLER et al, 1986¹⁹⁴; ASHCROFT, ASHCROFT & HARRISON, 1988¹⁴; RORSMAN & TRUBE, 1990²²²). Registros de *patch-perforated* sugerem que menos de 4% da condutância total dos canais K^+_{ATP} está ativa em células beta em repouso, obtidas de rato (COHEN et al, 1990⁵⁹). Dessa forma, a maioria dos canais K^+_{ATP} constituiria os — aparentemente — *canais de reserva* (*spare channels*) (COOK et al, 1988⁶¹). Estes autores propõem algumas vantagens metabólicas para sistemas que assim operam, a saber: (1) sensibilidade máxima a alterações da atividade do canal, por atuar próximo ao estado *totalmente inativado*; (2) operação do sistema em níveis bastante reduzidos de corrente, destarte minimizando os fluxos iônicos e o dispêndio energético, para manter os gradientes iônicos e (3) estabilidade do potencial de membrana, pela somação de breves aberturas de muitos canais.

É improvável, contudo, que a extensão da inibição do efluxo de K^+ , por ação em canais K^+_{ATP} , determine sozinha o montante da insulina secretada. Desse modo, inibição do efluxo de K^+ , pelo metabolismo de nutrientes, seria apenas uma

parte do processo. Efeitos adicionais do metabolismo participariam da cascata de fluxos iônicos (AMMON & WAHL, 1994⁵; RORSMAN, 1997²²¹). A propósito, GEMBAL, GILON & HENQUIN (1992⁸⁹) e GEMBAL et al (1993⁹⁰) demonstraram a existência de mecanismo pelo qual glicose pode controlar a secreção de insulina, independentemente de alterações da atividade dos canais K^+_{ATP} , do potencial de membrana e do Ca^{2+} citosólico.

Por outro lado, há evidências sugestivas de que o metabolismo de glicose pode controlar o estado funcional dos VDCCs (SMITH, RORSMAN & ASHCROFT, 1989²⁴²) — determinando, assim, a quantidade de cálcio entrante e a extensão da exocitose por ele provocada — bem como controlar o próprio processo secretório de insulina (DETIMARY et al, 1994⁷¹).

Medidas do efluxo de ^{86}Rb , a partir de ilhotas perfundidas por tampão desprovido de glicose, ou dela contendo baixas concentrações, são o mais simples e, provavelmente, o mais sensível teste para se determinar se uma substância fecha canais K^+_{ATP} nas células beta (HENQUIN et al, 1992¹¹⁷). Esse mesmo autor considera a improbabilidade de um agente fechar canais K^+_{ATP} em células beta intactas e, simultaneamente, não inibir o efluxo de ^{86}Rb . Igualmente, apenas raras condições reduzem o efluxo de ^{86}Rb na ausência de glicose, sem inibir canais K^+_{ATP} . Finalmente, considera indireta a interpretação dos resultados obtidos na presença de concentrações estimuladoras de glicose, porque mais de um tipo de canal de K^+ é implicado. Assim, enquanto canais K^+_{ATP} são fechados em grande número, canais K^+_{-DR} e $K^+_{Ca^{2+}}$ começam a abrir (HENQUIN et al, 1992¹¹⁷).

Um dos fatores implicados no uso de ilhotas isoladas, para o estudo de

fluxos iônicos, é a heterogeneidade celular desses microórgãos. Enquanto a medida da secreção de insulina refere-se especificamente à resposta funcional das células beta, medidas metabólicas e iônicas, realizadas com ilhotas isoladas, refletem o comportamento integrado de todos os tipos de células insulares (MALAISSE, 1987¹⁷⁰).

A concentração citosólica de Ca^{2+} livre é fundamental para a regulação dos processos da secreção de insulina na célula beta pancreática e é controlada por notável inter-relação de nutrientes, hormônios e neurotransmissores (BERGGREN, et al, 1994²⁴; BERGGREN & LARSSON, 1994²³). Aumento da concentração de Ca^{2+} é, reconhecidamente, um fator essencial de acoplamento na célula beta (WOLLHEIM & SHARP, 1981²⁷⁹; PRENTKI & MATSCHINSKY, 1987²¹⁰; GYLFE, 1988⁹⁶; HENQUIN et al, 1992¹¹⁷). Tem-se demonstrado que a estimulação, por glicose, de ilhotas pancreáticas intactas, promove flutuações do Ca^{2+} citosólico livre, em sincronia com a atividade elétrica (SANTOS et al, 1991²²⁷). É provável que essas flutuações constituam a base molecular das oscilações da secreção de insulina (BERGGREN et al, 1994²⁴).

Para estudar os efeitos de glicose, sobre o metabolismo de Ca^{2+} na célula beta, tem-se avaliado o efluxo de ^{45}Ca em ilhotas pré-carregadas. A abordagem mais usada é, inicialmente, marcar-se ilhotas isoladas, por 60-120 minutos, com esse isótopo e, então, medir-se o seu efluxo em dispositivo de perfusão (MALAISSE, BRISSON & BAIRD, 1973¹⁷³).

Glicose exerce efeito bifásico sobre o efluxo de ^{45}Ca , em ilhotas perfundidas. Após cerca de um minuto de exposição ao secretagogo, ocorre queda rápida desse efluxo, seguida, poucos minutos depois, de grande aumento da saída

desse traçador. Este aumento secundário do efluxo de ^{45}Ca coincide com o início da secreção de insulina (MALAISSE, BRISSON & BAIRD, 1973¹⁷³; HERCHUELZ & MALAISSE, 1979¹¹⁸), depende da presença de cálcio no líquido extracelular (HERCHUELZ et al, 1980¹²²) e se deve, pelo menos em parte, ao deslocamento de ^{45}Ca intracelular, após aumentada entrada de Ca^{2+} (PRENTKI & WOLLHEIM, 1984²¹¹). O aumento secundário reflete, portanto, o influxo de Ca^{2+} , e corresponde a processo de troca $\text{Ca}^{2+} \times \text{Ca}^{2+}$, no qual a entrada de ^{40}Ca nas células desloca ^{45}Ca dos sítios intracelulares de ligação (HERCHUELZ et al, 1980¹²²; HERCHUELZ, COUTURIER & MALAISSE, 1980¹²¹). Porém, quando ilhotas são carregadas de ^{45}Ca até equilíbrio isotópico e, depois, incubadas na ausência de Ca^{2+} , glicose e outros estímulos energéticos provocam redução do efluxo de ^{45}Ca (GYLFE et al, 1978⁹⁷). Esses resultados sugerem a possibilidade de que processos de efluxo de Ca^{2+} , através da membrana plasmática, possam ser regulados e, assim, participar dos mecanismos que geram aumento do cálcio citosólico (PRENTKI & MATSCHINSKY, 1987²¹⁰).

Explicações contraditórias têm sido dadas para o decréscimo sustentado do efluxo de ^{45}Ca provocado por glicose, na ausência do Ca^{2+} extracelular. A primeira supõe que glicose e outros nutrientes reduzam o contratransporte $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ ou reduzam a atividade da Ca^{2+} -ATPase. A segunda sugere que glicose promove seqüestro de Ca^{2+} para os estoques intracelulares (PRENTKI & MATSCHINSKY, 1987²¹⁰).

O efeito inibitório inicial de glicose, sobre o efluxo de ^{45}Ca , é atenuado em baixa concentração extracelular de sódio, sugerindo que glicose reduz o efluxo de ^{45}Ca através de inibição do contratransporte $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$, processo este

responsável pela extrusão ativa de cálcio das células insulares (HERCHUELZ et al, 1980¹²²). A inibição do contratransporte $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ pode resultar da geração aumentada de prótons, que competem com cálcio por sua saída, via contratransporte $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ (CARPINELLI et al, 1980⁴⁸).

Em células beta isoladas de camundongo, GRAPENGIESSER, GYLFE & HELLMAN (1988⁹⁵) observaram a ocorrência de efeito dual de glicose sobre o cálcio citoplasmático. Assim, após estímulo com glicose (20 mM), constataram decréscimo inicial, seguido de aumento da atividade do cálcio citosólico.

O efeito de glicose sobre os fluxos de cálcio é estreitamente dependente do seu metabolismo (SENER, LEVY & MALAISSE, 1976²³¹). Assim, ATP (relação ATP/ADP) gerado nesse processo, ao causar o fechamento de canais K^+_{ATP} , provoca despolarização da membrana plasmática e subsequente abertura dos VDCCs. A entrada de Ca^{2+} , através desses canais, é etapa essencial do mecanismo pelo qual glicose estimula a secreção de insulina pelas células beta (ASHCROFT, KELLY & SMITH, 1990¹⁶). Em oposição a argumentos prévios de ação inibitória direta de glicose, sobre o transporte de saída de Ca^{2+} (HERCHUELZ & MALAISSE, 1981¹²⁰; WOLLHEIM & SHARP, 1981²⁷⁹), entende-se hoje que esse processo é, de fato, estimulado por glicose (HELLMAN et al, 1992¹¹³). O mais notável efeito de glicose, sobre o metabolismo de Ca^{2+} na célula beta, é aumentar o *turnover* desse cátion (HELLMAN et al, 1992¹¹³).

Vários tipos de VDCCs foram identificados, utilizando-se técnicas eletrofisiológicas e genéticas, sendo designados *L*, *N*, *P/Q*, *R* e *T* (HOCKERMAN et al, 1997¹²³). Em células beta de rato, dois dentre esses tipos já foram identificados

(ASHCROFT, KELLY & SMITH, 1990¹⁶). Canais *L* (*long lasting*), assim chamados em razão da propriedade — longa duração — apresentada por sua corrente, e canais *T* (*transient*), que apresentam corrente transitória, conseqüente à sua inativação relativamente rápida. Os canais tipo *L* têm estrutura primária estreitamente relacionada com os canais de Na^+ *voltagem-dependentes*. São ativados por grandes despolarizações, sendo inibidos por bloqueadores de canais de Ca^{2+} (v.g. verapamil e nifedipina) e modulados pela proteína-quinase dependente de AMPc e proteínas-G. Medeiam a entrada do Ca^{2+} que desencadeia a secreção de insulina (SMITH, RORSMAN & ASHCROFT, 1989²⁴²; ASHCROFT, KELLY & SMITH, 1990¹⁶; PLASMAN et al, 1990²⁰⁵; CATTERALL & EPSTEIN, 1992⁵⁰). Diidropiridinas são moduladores alostéricos e podem agir no canal de Ca^{2+} tipo *L*, tanto como agonistas, favorecendo o estado *aberto*, quanto como antagonistas, favorecendo o estado *inativado* (HOCKERMAN et al, 1997¹²³).

A subunidade alfa 1 (*CACN4*) dos VDCCs tipo *L* é o maior componente desses canais em células beta pancreáticas e atua como sensor de voltagem, bem como poro de condução iônica. Estudos em modelos animais, com hiperglicemia crônica ou em jejum, indicaram que, nesses estados funcionais, reduzidos níveis do RNA mensageiro de *CACN4*, em ilhotas pancreáticas, estão associados a respostas prejudicadas da secreção de insulina diante de estímulos (SEINO, 1995²³⁰).

Além de glicose e outros nutrientes, agentes não-metabolizáveis são capazes de abrir os VDCCs, através da inibição dos canais K^+ _{ATP} (sulfoniluréias) (TRUBE, RORSMAN & OHNO-SHOSAKU, 1986²⁵⁷) ou através de despolarização (KCl, arginina) (HENQUIN & MEISSNER, 1984¹¹⁶).

Os nutrientes, além de proverem metabólitos que agem nos canais de

K⁺ (e.g. ATP), também produzem metabólitos moduladores que sensibilizam a entrada de Ca²⁺ em resposta a iniciadores da secreção de insulina (AMMON & WAHL, 1994⁵). Assim, há evidências sugestivas de que o metabolismo de glicose pode controlar o estado funcional dos VDCCs (SMITH, RORSMAN & ASHCROFT, 1989²⁴²), determinando, dessa maneira, a quantidade de cálcio entrante e a extensão da exocitose por ele provocada.

A identidade do segundo mensageiro que liga o metabolismo de glicose à ativação dos VDCCs não foi estabelecida. Dois candidatos são o AMPc, que provoca ativação da proteína-quinase A (PKA), e o diacilglicerol, que ativa a proteína-quinase C (PKC) (ASHCROFT et al, 1992¹⁷). Fosforilação do canal de Ca²⁺ pela PKA é, provavelmente, o mecanismo pelo qual a elevação dos níveis de AMPc resulta em influxo aumentado de Ca²⁺ e secreção de insulina nas células beta (RAJAN et al, 1990²¹⁴).

Em adição ao fluxo de Ca²⁺ via VDCCs, determinou-se que aproximadamente 20% da corrente desse íon flui através de outro tipo de canal de Ca²⁺ (GILON et al, 1997⁹²), que é resistente, tanto à nifedipina, quanto aos antagonistas peptídicos desse canal (MAGNELLI et al, 1995¹⁶⁹).

Três sistemas transportadores podem retirar Ca²⁺ da célula beta. O primeiro é um sistema de transporte ativado por calmodulina, baseado em uma ATPase de alta afinidade, que retira energia da hidrólise do ATP (PERSHADSINGH et al, 1980²⁰²). O segundo é um contratransporte Na⁺-Ca²⁺, dirigido pelo gradiente de Na⁺ e pelo potencial de membrana através do plasmalema (HELLMAN et al, 1980¹¹²). O terceiro é um processo de troca Ca²⁺ x Ca²⁺ entre os meios extra e

intracelular (HERCHUELZ, COUTURIER & MALAISSE, 1980¹²¹).

1.2.2. INFLUÊNCIAS DO CICLO ALIMENTAÇÃO-JEJUM NO RITMO DA SECREÇÃO DE INSULINA

Alterações da temporização alimentar podem servir para deslocar a fase, ao menos parcialmente, de alguns ritmos circadianos humanos (HALBERG, 1974¹⁰⁰) e, em especial, dos ritmos circadianos de hormônios plasmáticos, tais como insulina e glucagon (REINBERG, 1983²¹⁷). Outrossim, em animais de laboratório, tais alterações podem, também, estar associadas a mudanças drásticas de atividade, busca de alimentos, etc. Sugere-se, daí, que o efeito sincronizador da temporização da alimentação pode depender da alteração do ciclo diário de atividade e dos ritmos relacionados, ao invés de depender da alteração dos efeitos diretos dos nutrientes (REINBERG, 1974²¹⁶). A persistência de ritmos circadianos durante condições de jejum é conhecida por *fenômeno de Chossat* (REINBERG & SMOLENSKY, 1983²¹⁸).

Comparado com humanos, o rato pode ser considerado um animal que ingere somente uma grande refeição por dia, preponderantemente no período de ausência de luz (DEUEL et al, 1938⁷²). As oscilações dessa ingestão culminam às 23 h, havendo um segundo pico, menor, às 5 h (AHLERSOVÁ et al, 1992³). Embora os ritmos alimentar e da insulinemia possam ser sincronizados pelo ciclo claro-escuro, as relações de fase não são fixas, e um ritmo não-necessariamente dirige o outro (TEDFORD & MEIER, 1993²⁵³). Quando alimentação é fornecida somente

durante o período de luz, com disponibilidade restrita a somente poucas horas (*i.e.* 4 h/24 h), os ritmos circadianos do animal sofrem deslocamento de fase (REINBERG, 1974²¹⁶). Não obstante, a maioria, senão todos, os ritmos circadianos persistem durante jejum ou durante dieta bastante restrita (REINBERG, 1974²¹⁶). Assim, a ingestão alimentar, provavelmente, exerce efeito mascarador direto sobre a insulinemia, através de suas ações sobre a glicemia. O ciclo alimentação-jejum seria, no máximo, um *zeitgeber* fraco (MINORS & WATERHOUSE, 1986¹⁹³), o que, no entanto, conflita com a idéia de que é um poderoso sincronizador (SENSI, PACE-PALITTI & GUAGNANO, 1993²³²).

Diversos pesquisadores demonstraram inibição da secreção de insulina, estimulada por glicose, em ilhotas isoladas de ratos submetidos a jejum durante 48 horas (SCHAUDER et al, 1979²²⁹; TAMARIT-RODRIGUEZ, VARA & TAMARIT, 1984²⁵²; CARPINELLI et al, 1986⁴⁷; VARA et al, 1988²⁶⁷). Nesse mesmo tipo de preparação também se constatou inibição da síntese lipídica, bem como do influxo de ⁴⁵Ca (VARA et al, 1988²⁶⁷).

Seres humanos, após jejum durante 48 horas, mantiveram o padrão bifásico da secreção de insulina, semelhante ao observado no grupo-controle em jejum *overnight* (FINK et al, 1974⁸²). Estes autores constataram, porém, decréscimo da secreção em ambas as fases, à semelhança do que verificaram em pâncreas isolado de rato, após igual período de jejum.

Jejum também inibiu a secreção de insulina estimulada por aminoácidos (ASHCROFT, 1981¹⁰; BODEN et al, 1981²⁹; WELSH & ANDERSSON, 1982²⁷⁵), aminoácidos mais tolbutamida (BODEN et al, 1981²⁹), inosina (CAPITO & HEDESKOV, 1976⁴⁵), ácido α -cetoisocapróico (WELSH & ANDERSSON, 1982²⁷⁵;

CARPINELLI et al, 1986⁴⁷), acetilcolina (FELDMAN & LEOVITZ, 1973⁸⁰), alta concentração extracelular de potássio (ASHCROFT, 1981¹⁰) e hipoglicemiantes orais (BOSBOOM, ZWEENS & BOUMAN, 1973³⁰; FELDMAN & LEOVITZ, 1973⁸⁰; ASHCROFT, 1981¹⁰).

Jejum durante 24 horas aumentou (de 5,6 para 8,3 mM) o limiar estimulatório a glicose, do pâncreas isolado de rato (BOSBOOM, ZWEENS & BOUMAN, 1973³⁰). Idêntico resultado obtiveram EFENDIC et al (1976⁷⁷), no mesmo tipo de preparação, registrando, também, aumento do K_M aparente a glicose. Deslocamento da curva dose-resposta a glicose, para a direita, com redução de inclinação, também foi constatado por BOSBOOM, ZWEENS & BOUMAN (1973³⁰). O jejum teve, porém, pouco efeito sobre a resposta secretória máxima a glicose (BOSBOOM, ZWEENS & BOUMAN, 1973³⁰; EFENDIC et al, 1976⁷⁷). Os resultados acima indicam que jejum reduziu acentuadamente a sensibilidade do pâncreas endócrino a glicose (BOSBOOM, ZWEENS & BOUMAN, 1973³⁰). Neste particular, considera-se possível que a sensibilidade a glicose, do mecanismo da secreção de insulina na célula beta, sofra redução antes de o jejum provocar qualquer decréscimo do conteúdo de insulina do pâncreas (MALAISSE, MALAISSE-LAGAE & WRIGHT, 1967¹⁷⁴).

Resultados diametralmente opostos são, contudo, relatados por JOOST & BECKMANN (1980¹⁴¹). Eles constataram, em sistema de perfusão de pâncreas extraído de rato mantido em jejum durante três dias, manutenção do K_M da curva dose-resposta a glicose, da secreção de insulina. A resposta máxima, porém, reduziu-se quase linearmente com o tempo de jejum. Assim, concluíram que jejum não reduz a sensibilidade das células beta a glicose.

Os processos celulares responsáveis pela inibição da secreção de insulina no jejum não são, ainda, totalmente conhecidos. Evidências de inúmeros estudos sugerem base metabólica para essa inibição, quando a secreção é provocada por glicose ou inosina (ASHCROFT, 1981¹⁰). Nesse sentido, mostrou-se que o metabolismo de glicose em ilhotas isoladas foi reduzido após jejum, e que a oxidação de glicose foi paralela à taxa da secreção de insulina (HEDESKOV & CAPITO, 1974¹⁰⁹; LEVY et al, 1976¹⁶²; BURCH et al, 1981⁴⁰). CAPITO & HEDESKOV (1974⁴⁴) sustentaram a hipótese de que a redução do metabolismo de glicose é o defeito primário do mecanismo da secreção de insulina durante jejum, enquanto LEVY et al (1976¹⁶²) demonstraram bloqueio do metabolismo nas etapas iniciais da glicólise. Adaptação, induzida por jejum, de enzimas-chave da glicólise (v.g. glicoquinase, hexoquinase e fosfofrutoquinase) poderia, ao menos parcialmente, explicar esse bloqueio (MALAISSE, SENER & LEVY, 1976¹⁷⁵). Por outro lado, GIROIX et al (1984⁹³) propuseram que aquela inibição é resultado de prejuízo da função dual de glicose como precursor, tanto de intermediários, como de ativadores glicolíticos adequados da fosfofrutoquinase. Independente das explicações possíveis, verificou-se que a realimentação com dieta rica em carboidratos desbloqueia a resposta secretória a glicose após jejum (BEDOYA et al, 1986²¹).

Inibição do sistema adenilatociclase-AMPc, com diminuição intracelular desse nucleotídeo, seria fator preponderante na redução da secreção de insulina no jejum (HOWELL, GREEN & MONTAGUE, 1973¹²⁷; RABINOVITCH et al, 1976²¹³; WOLTERS, KONIJNENDIJK & BOUMAN, 1977²⁸¹; BOUMAN, WOLTERS & KONIJNENDIJK, 1979³⁶). Reversão, por teofilina, da redução da secreção de insulina, em camundongos submetidos a jejum durante 60 horas, reforça essa

hipótese (WELSH & ANDERSSON, 1982²⁷⁵). Assim, a inibição do metabolismo de glicose seria um fenômeno adicional independente, que se manifestaria após períodos de jejum superiores a 24 horas (WOLTERS, KONIJNENDIJK & BOUMAN, 1977²⁸¹). Em concordância com essa idéia, ZAWALICH et al (1979²⁸⁶) verificaram que a metabolização de glicose, por ilhotas de rato, não foi alterada após jejum durante 24 horas.

Em células beta o jejum reduz a atividade da glicoquinase de maneira tempo-dependente, o que pode ser prevenido por glibenclamida ou insulina (LENZEN, TIEDGE & PANTEN, 1986¹⁵⁸). Essa enzima age como glicorreceptor adaptativo da célula beta, correlacionando a glicose sangüínea com a secreção de insulina (BURCH et al, 1981⁴⁰). Em outro sentido, constatou-se que dois dias de jejum reduziram pela metade a expressão gênica do GLUT2, em células beta de rato (TIEDGE & LENZEN, 1995²⁵⁴).

Por outro lado, não há correlação entre a reduzida sensibilidade do mecanismo secretor de insulina e o metabolismo de glicose na via das pentoses (HEDESKOV & CAPITO, 1975¹¹⁰). Entretanto, aumentada taxa da oxidação de ácidos graxos livres, refratária à inibição por glicose, pode contribuir para a redução, provocada por jejum, da secreção de insulina. (TAMARIT-RODRIGUEZ, VARA & TAMARIT, 1984²⁵²).

Além dos aspectos da participação do metabolismo, do AMPc e da glicoquinase, vários outros fatores têm sido estudados como mediadores do efeito de jejum sobre a secreção de insulina. Mencionam-se, assim: alterações na cascata da fosfolipase A₂/ácido aracdônico (TADAYYON, BONNEY & GREEN, 1990²⁵¹); depressão da atividade insular da aminoglicosidase ácida (LUNDQUIST &

LÖVDAHL, 1983¹⁶⁷); alta atividade secretória das células beta (SCHAUDER et al, 1979²²⁹); *manuseio* intracelular alterado de Ca^{2+} (WOLTERS, WIEGMAN & KONIJNENDIJK, 1981²⁸²) e participação de monoaminas endógenas (FELDMAN & LEBOVITZ, 1973⁸⁰). Em outro sentido, EFENDIC, CERASI & LUFT (1975⁷⁶) consideram improvável que catecolaminas mediem a redução da secreção de insulina durante jejum.

Finalmente, BRODOWS (1985³⁹) verificou que jejum aumenta a capacidade de insulina inibir sua própria secreção. Segundo este autor, influências inibitórias aumentadas de insulina sobre a célula beta, durante jejum, podem ser um mecanismo fisiológico importante para a diminuída secreção desse hormônio, na transição do estado alimentar para o jejum.

1.3. PROPOSIÇÃO DO TRABALHO

Considerando que o processo da secreção de insulina apresenta variação circadiana, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, e que remodelação de fluxos catiônicos na célula beta é etapa fundamental da secreção, propusemo-nos, em ilhotas isoladas de rato: (1) confirmar a ocorrência de variação diária da secreção de insulina *in vitro*; (2) investigar uma possível variação diária da permeabilidade membranar a potássio e cálcio e (3) estabelecer correlação temporal entre esses processos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, machos, de três a sete meses de idade, procedentes do biotério da UNICAMP. Até utilização, os animais permaneceram em gaiolas coletivas (por no mínimo dez dias de adaptação) no biotério do Departamento, a 23 ± 2 °C, sob iluminação provida exclusivamente por lâmpadas fluorescentes, ligadas e desligadas automaticamente às 06:00 e 18:00 h (07:00 e 19:00 h no horário de verão), respectivamente. Forneceu-se ração balanceada e água *ad libitum*, sendo a limpeza das gaiolas executada após as 15:00 h (16:00 h no horário de verão). Os ratos submetidos a jejum (48 horas) receberam apenas água durante esse período pré-experimental.

2.2. ISOLAMENTO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS

As ilhotas foram isoladas seguindo-se a técnica originalmente descrita por MOSKALEWSKI (1965¹⁹⁷), aplicada a pâncreas murino por LACY & KOSTIANOVSKY (1967¹⁴⁷), com as modificações introduzidas por BOSCHERO, DELATTRE & SANTOS (1980³³) e SUTTON et al (1986²⁴⁹). Em cada experimento, um a três ratos foram sacrificados por concussão cerebral e decapitados para

sangria. Após laparotomia e localização do ducto biliar comum, este foi ocluído no extremo distal, junto ao duodeno, e dissecado próximo ao pedículo hepático, onde se introduziu uma cânula de polietileno no sentido da desembocadura. Cerca de 15 ml da solução de Hanks (*Hanks*), contendo 9 mg de colagenase e glicose (1,4 mM), foram injetados via cânula, provocando, por fluxo retrógrado, a divulsão do tecido acinoso. Procedeu-se, então, à ablação do pâncreas, que foi transferido para tubo de ensaio de vidro (12 x 1,5 cm) e incubado sob borbulhar de carbogênio, por cerca de 18 minutos, a 37 °C.

Em seguida, ainda a 37 °C, o conteúdo foi agitado suavemente por um a dois minutos e vertido em béquer. Após mistura com *Hanks* (ca. 50 ml), foi lentamente aspirado e ejetado com seringa e decantado durante dois minutos. O sobrenadante foi então aspirado, e o sedimento ressuspenso em *Hanks* (ca. 80 ml). Repetindo-se as operações, as ilhotas foram lavadas quatro vezes e segregadas do tecido acinoso, colagenase e enzimas pancreáticas. O produto final foi transferido para placas de Petri, de onde, sob lupa, as ilhotas foram coletadas por aspiração, com auxílio de pipeta de vidro de ponta afilada.

2.3. SECREÇÃO DE INSULINA EM CONDIÇÃO ESTÁTICA

As ilhotas foram isoladas de ratos alimentados *ad libitum*, sendo então coletadas alternadamente (grupos de cinco) em placas de polipropileno contendo, em cada *poço*, 0,75 ml da solução-tampão de Krebs-Ringer suplementada com albumina bovina (1 mg/ml) (*Krebs*), à qual se adicionou glicose (5,6 mM) . Após

incubação por 30 minutos, a 37 °C, em atmosfera de carbogênio para ajuste do pH 7,4, o Krebs foi aspirado sob lupa e substituído por 1,0 ml do mesmo tampão (pré-aquecido a 37 °C e borbulhado com carbogênio), sem glicose, ou dela contendo concentrações de 2,8 (G 2,8); 5,6 (G 5,6); 8,3 (G 8,3) ; 11,1 (G 11,1); 16,7 (G 16,7) e 27,7 mM (G 27,7). Procedeu-se a nova incubação, por 60 minutos, nas condições referidas acima. As placas foram então mergulhadas em gelo, e os sobrenadantes transferidos para tubos de ensaio e conservados a – 20 °C, até dosagem da insulina secretada. Em cada horário, o protocolo experimental foi executado entre três e cinco vezes.

2.4. DOSAGEM DE INSULINA

A insulina imunorreativa de rato secretada *in vitro* foi dosada pela técnica de radioimunoensaio (RIE) (YALOW & BERSON, 1960²⁸³), utilizando-se o procedimento de separação das frações pelo polietilenoglicol (PEG), desenvolvido por DESBUQUOIS & AURBACH (1971⁷⁰). As etapas do ensaio são resumidas abaixo.

AMOSTRAS

Alíquotas de 10 µl do meio de incubação de ilhotas, em duplicatas, foram transferidas para tubos de ensaio de polipropileno (7,5 x 1 cm) e o volume completado até 100 µl com Krebs.

PONTOS DA CURVA

Em cada RIE executou-se, em quadruplicata, uma curva de referência com insulina murina comercial, liofilizada, que foi diluída em *Krebs*, resultando nas seguintes concentrações: 50; 100; 250; 500 e 1000 pg/100 µl. Cada tubo recebeu 100 µl da diluição.

CONTROLES

Em paralelo, foram executados (em triplicatas) o *TOTAL*, que recebeu unicamente 100 µl da solução de insulina marcada, o *BRANCO*, que recebeu 100 µl de *Krebs*, 100 µl de tampão veronal albuminado (1 mg/ml) e 100 µl da solução de insulina marcada, e o *ZERO INSULINA*, no qual se adicionaram, inicialmente, 100 µl de *Krebs*.

POOLS

Ao final de cada protocolo de RIE, incluíram-se replicatas (10 µl cada) de um *pool alto* (G 16,7) e de um *pool baixo* de secreção (G 0), os quais serviram de indicadores da exatidão e precisão do ensaio. Completou-se o volume adicionando-se 90 µl de *Krebs*.

Aos tubos que continham *amostras*, *pontos da curva*, *zero insulina* e *pools* adicionaram-se 100 µl da solução de anticorpo¹. Igualmente, foram acrescentados 100 µl da solução de insulina marcada². Misturou-se em vórtex

¹ *Guinea pig anti-insulin serum* (GPAIS), previamente titulado (1:75 000 de diluição final no tubo do RIE) e diluído em tampão veronal albuminado.

² Insulina porcina marcada com ¹²⁵I (monoiodada; ca. 22 Tbq/mmol).

e incubou-se por três horas, em temperatura ambiente.

Para a separação das frações da insulina marcada (livre ou ligada ao anticorpo), foram adicionados aos tubos (exceção ao *TOTAL*) 100 µl de soro *strip*³ e 1,0 ml da solução de PEG⁴ (18 g/dl). Misturou-se em vórtex e centrifugou-se a 1700 g (10 °C) por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade do precipitado lida em contador gama.

Para os cálculos, a radiação média (cpm) do *BRANCO* (precipitação inespecífica) foi descontada de todos os tubos (exceção ao *TOTAL*). A radiação de cada *PONTO DA CURVA* e das *AMOSTRAS* foi referida percentualmente à radiação média dos *ZERO INSULINA*, resultando na relação B/Bo⁵. A curva de referência foi traçada em papel logito⁶, dispondo-se B/Bo versus concentração de insulina. *Entrando-se* (na curva) pela razão B/Bo de cada *AMOSTRA*, determinou-se a quantidade de insulina imunorreativa nela presente. Os resultados finais foram expressos em nanogramas/ilhota por 60 minutos de secreção.

³ O soro *strip* (soro isento de insulina) foi preparado adicionando-se carvão ativado (1,25 g/dl) e dextrana T₇₀ (0,25 g/dl) ao soro bovino, misturando-se por 2 horas e centrifugando-se diversas vezes, até que o soro se apresentasse límpido.

⁴ O PEG foi dissolvido em tampão fosfato 0,05 M (pH 7,5) e misturado por 30 minutos. Ajustou-se o pH 8,6 pela adição de NaOH 1 N. Sua temperatura foi reduzida a 4 °C antes da adição.

⁵ *Bound* da *AMOSTRA* ou *PONTO DA CURVA* ÷ *bound* do *ZERO INSULINA*. Relação, geralmente expressa em percentagem, entre a radioatividade (cpm) do precipitado (nesse tipo de técnica em particular) da *AMOSTRA* ou *PONTO DA CURVA* e a radioatividade do *ZERO INSULINA*.

⁶ logito B/Bo = $\ln [(B/Bo) / 1-(B/Bo)]$.

2.5. EFLUXO DE ^{86}Rb

Dois grupos, contendo entre 80 e 150 ilhotas cada um, isolados de ratos alimentados, foram incubados (75 min) em 300 μl de *Krebs* provido de glicose (5,6 mM) e $^{86}\text{RbCl}$ (ca. 400 KBq), em atmosfera de carbogênio. Após três lavagens com G 5,6 gelado, as ilhotas foram transferidas para duas câmaras de perfusão, de polipropileno (Swinnex, SXOO 01300, Millipore, [0,3 ml cada]), supridas de filtro de acetato de celulose (Millipore SCWP 01300; poros de 8 μm). As câmaras foram, então, conectadas ao sistema de perfusão, acionado por uma bomba peristáltica de dois canais, com fluxo de 0,8 ml/minuto por câmara. Durante todo o período de perfusão, as soluções foram borbulhadas com carbogênio e mantidas a 37 °C. Decorridos os 20 minutos iniciais de perfusão e estabilização com G 5,6, iniciou-se a coleta do efluente, a intervalos de dois minutos, em frascos de cintilação, durante 60 minutos. Nos 20 minutos iniciais de coleta (20° ao 40° min), manteve-se a mesma solução perfusora. Entre o 40° e o 60° minuto, a solução foi substituída por G 0 ou G 8,3. A partir daí, perfundiu-se G 5,6 até o final.

A medida da radiação⁷ (cpm) foi feita em contador de cintilação líquida,

⁷ ^{86}Rb foi usado, nesses experimentos, como traçador do movimento de potássio, por apresentar maior meia-vida (18,6 dias) que o ^{42}K (12,4 h) e cinética de efluxo equivalente à do isótopo natural de potássio. Os resultados obtidos em ilhotas pré-carregadas de ^{86}Rb foram idênticos àqueles obtidos com ^{42}K , em termos da influência de agentes estimulantes sobre a radioatividade efluente (BOSCHERO et al, 1977³⁵). Correntemente, assume-se que alterações do efluxo de ^{86}Rb , de ilhotas pré-marcadas, refletem alterações equivalentes da permeabilidade da membrana plasmática a potássio (MALAISSE, 1987¹⁷⁰).

por efeito Cerenkov⁸.

Os resultados foram expressos em efluxo percentual por minuto, em relação à radioatividade imediatamente pré-existente nas ilhotas (*i.e.* efluxo fracional ou taxa de efluxo). O número de experimentos executados em cada tipo de protocolo é indicado nos *Resultados*.

2.6. EFLUXO DE ⁴⁵Ca

Dois grupos, contendo entre 110 e 160 ilhotas, isolados de ratos alimentados, foram incubados em 300 µl de *Krebs* modificado (desprovido de ⁴⁰Ca), contendo glicose (16,7 mM) e ⁴⁵CaCl₂ (ca. 800 KBq). Nos 10 minutos iniciais, o pH da solução foi ajustado pela passagem de carbogênio. Após 90 minutos, a 37 °C, as ilhotas foram lavadas quatro vezes com *Krebs* modificado, gelado, contendo glicose (16,7 mM), para remover o ⁴⁵Ca extracelular, sendo então transferidas para duas câmaras de perfusão (0,3 ml cada), supridas de filtro Millipore SCWP 01300. As câmaras, submersas em banho a 37 °C, foram conectadas ao sistema de perfusão, acionado por uma bomba peristáltica de dois canais, com fluxo fixado em

⁸ *Efeito Cerenkov* é a emissão de radiação eletromagnética (visível ou ultravioleta) produzida pela passagem de uma partícula veloz e carregada (α , β^- , etc.) através de um meio transparente. Ocorre quando as partículas de alta energia apresentam velocidade superior à da luz nesse meio, induzindo a polarização de moléculas que, ao retornarem ao seu estado fundamental, emitem fótons (350-600 nm). Estes podem excitar o fotocatodo do contador de cintilação líquida e ser lidos como *cpm* (TURVER, 1988²⁵⁹; SIMONNET, 1990²⁴⁰).

1,1 ml/minuto por câmara. Durante todo o período de perfusão, as soluções foram borbulhadas com carbogênio e mantidas a 37 °C. Após 30 minutos de adaptação às condições experimentais, perfundindo-se *G 0*, iniciou-se a coleta do efluente, minuto a minuto, em frascos plásticos de cintilação, por 40 minutos. Durante 14 minutos, manteve-se a perfusão por *Krebs* desprovido de glicose (mas com ^{40}Ca [1 mM]), após o que a solução passou a conter glicose (16,7 mM). A radioatividade de cada amostra do efluente foi medida em contador de radiação beta, após adição do líquido de cintilação.

Os resultados mostrados (% por min) representam a taxa de efluxo (*i.e.* efluxo fracional) de ^{45}Ca e indicam o percentual de radiação liberada a cada minuto, em relação ao total existente na câmara, no início de cada amostragem.

Em cada horário, o *n* experimental variou entre três e seis.

2.7. CRONOLOGIA DOS EXPERIMENTOS

Os três tipos de experimentos (itens 2.3., 2.5. e 2.6.) foram executados a partir dos seguintes horários (hora de sacrifício dos ratos): 00:00, 04:00, 08:00, 12:00, 16:00 e 20:00 h (0, 4, 8, 12, 16 e 20 h, respect.). Para cada um desses horários, o momento de início da incubação estática, ou da perfusão das ilhotas, foi aproximadamente constante (± 15 minutos).

A seqüência de opções, por um ou outro horário, a cada dia de experimentação, foi aleatória, conforme comprovado pela aplicação do *teste da*

mediana (HOEL, 1961¹²⁴). Cada tipo de experimento foi executado em separado dos demais.

2.8. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DOS EFLUXOS

As curvas do efluxo fracional de ^{86}Rb e ^{45}Ca , de cada experimento, receberam tratamento matemático, definindo-se quatro parâmetros para cada tipo de protocolo, conforme discriminados abaixo e ilustrados na figura 1.

2.8.1. PROTOCOLOS DO EFLUXO DE ^{86}Rb

2.8.1.1. $G\ 5,6 \rightarrow G\ 0 \rightarrow G\ 5,6$

A) ÁREA $G\ 5,6$

Mediu-se a área integrada **sob** a curva do efluxo fracional de ^{86}Rb , entre o 22° e o 40° minuto de perfusão ($G\ 5,6$), considerando-se como base o valor zero da ordenada.

B) INCLINAÇÃO $G\ 5,6$

Determinou-se a inclinação da curva de regressão exponencial dos valores do efluxo fracional de ^{86}Rb , entre o 22° e o 40° minuto de perfusão ($G\ 5,6$).

PARÂMETROS:

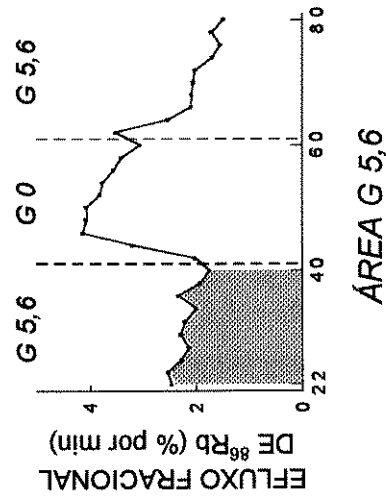
A

B

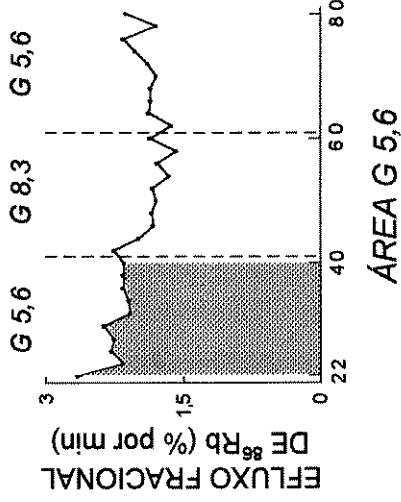
C

D

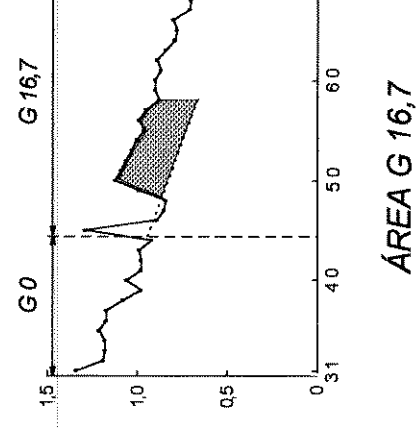
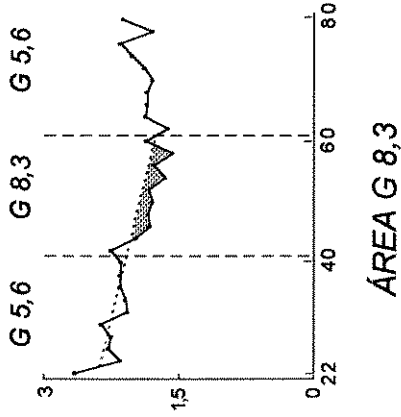
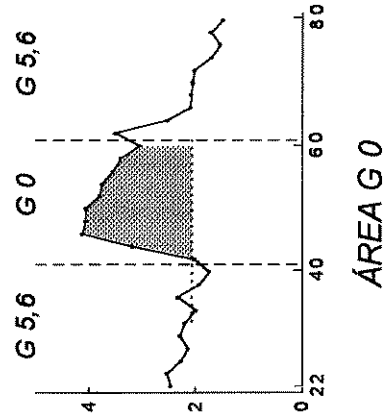
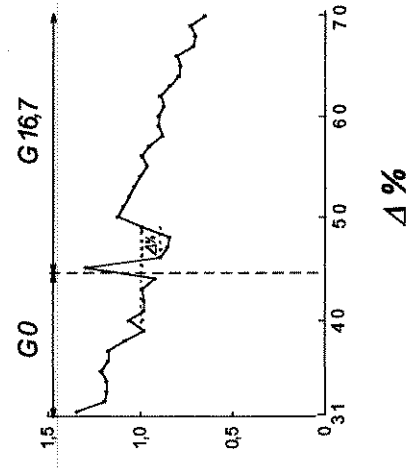
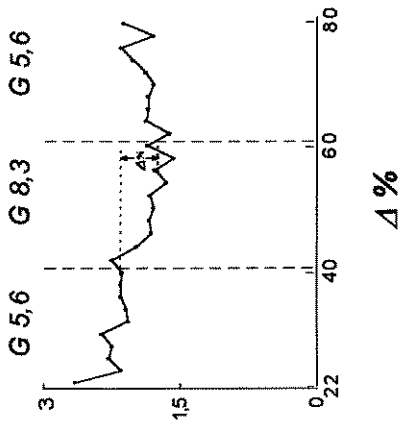
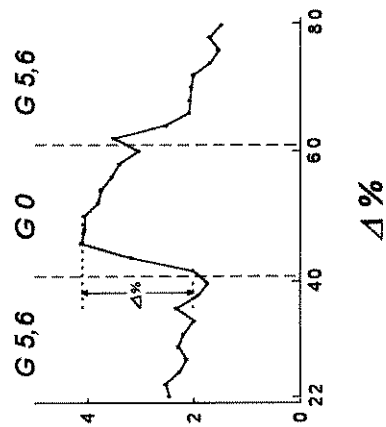
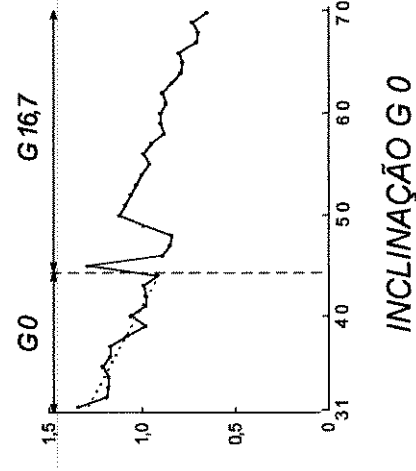
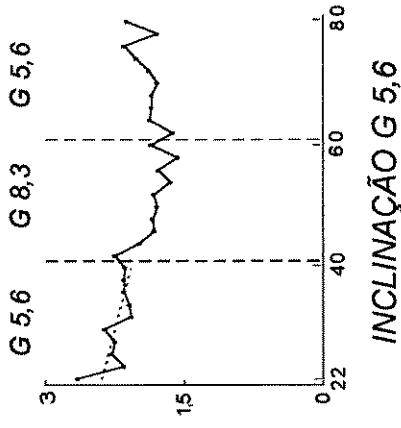
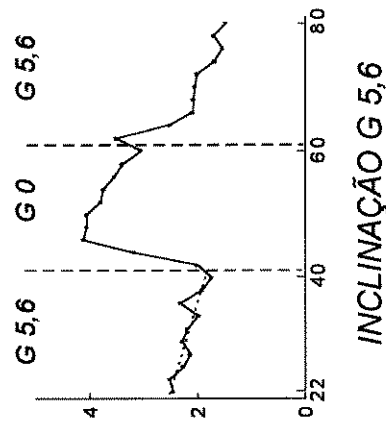
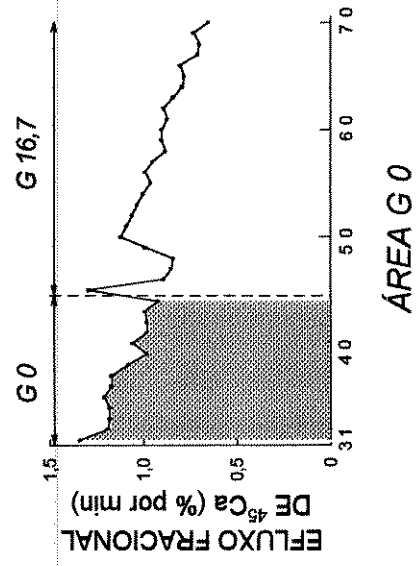
1)



2)



3)



C) $\Delta\%$

O aumento percentual do efluxo fracional de ^{86}Rb ($\Delta\%$), após a retirada de glicose do líquido de perfusão, foi calculado aplicando-se a equação: $[(\text{efluxo médio dos três valores de pico} \div \text{efluxo médio do } 36^\circ \text{ ao } 40^\circ \text{ min}) - 1] \times 100$.

D) **ÁREA G 0**

Calculou-se a área integrada **sob** a curva do efluxo fracional de ^{86}Rb , entre o 42° e o 60° minuto de perfusão (G 0), considerando-se como limite inferior a projeção horizontal, nesse período, do valor médio do efluxo entre o 32° e o 40° minuto de perfusão.

2.8.1.2. **G 5,6 $\rightarrow$ G 8,3 $\rightarrow$ G 5,6**

Os parâmetros (A) e (B) foram calculados conforme descrito acima.

C) $\Delta\%$

A redução percentual do efluxo de ^{86}Rb ($\Delta\%$), após incremento de glicose (de 5,6 para 8,3 mM) na solução perfusora, foi calculada aplicando-se a equação: $[1 - (\text{efluxo médio do } 56^\circ \text{ ao } 60^\circ \text{ min} \div \text{efluxo médio do } 36^\circ \text{ ao } 40^\circ \text{ min de perfusão})] \times 100$.

D) **ÁREA G 8,3**

Calculou-se a área integrada **sobre** a curva do efluxo fracional de ^{86}Rb , entre o 42° e o 60° minuto de perfusão (G 8,3), com o limite superior fornecido

pela projeção, nesse período, da regressão exponencial dos valores do efluxo em G 5,6 (22° ao 40° min). Áreas eventualmente posicionadas acima desse limite foram (de forma algébrica) somadas ao conjunto.

2.8.2. PROTOCOLOS DO EFLUXO DE ^{45}Ca

G 0 → G 16,7

A) ÁREA G 0

Mediu-se a área integrada **sob** a curva do efluxo fracional de ^{45}Ca , entre o 31° e o 44° minuto de perfusão (G 0), considerando-se como base o valor zero da ordenada.

B) INCLINAÇÃO G 0

Determinou-se a inclinação da curva de regressão exponencial dos valores do efluxo fracional de ^{45}Ca , entre o 31° e o 44° minuto de perfusão (G 0).

C) $\Delta\%$

A redução percentual do efluxo fracional de ^{45}Ca ($\Delta\%$), após introdução de glicose (16,7 mM) na solução perfusora, foi calculada aplicando-se a equação:
 $[1 - (\text{efluxo médio do 46° ao 49° min} \div \text{efluxo médio do 40° ao 44° min})] \times 100$.

D) **ÁREA G 16,7**

Mediu-se a área integrada **sob** a curva do efluxo fracional de ^{45}Ca , entre o 46° e o 58° minuto de perfusão (G 16,7), fixando-se como limite inferior a projeção, nesse período, da regressão exponencial dos valores de efluxo, entre o 31° e o 44° minuto.

2.9. REAGENTES

Todos os produtos químicos utilizados para isolamento, incubação e perfusão de ilhotas, bem como para RIE, possuíam grau analítico de pureza (P.A.). Albumina bovina fração V-RIA *grade* e carvão ativado foram obtidos da Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo). Colagenase P foi adquirida da Boehringer Mannheim Corp (Indianápolis, IN). Dextrana T₇₀ da Pharmacia (Uppsala, Suécia). Insulina murina do Novo Research Inst. (Bagsvaerd, Dinamarca). Anticorpo antiinsulina foi gentilmente doado pelo Dr W. J. Malaisse (Bruxelas, Bélgica). PEG 6000 foi obtido da Reagen (Rio de Janeiro). Agente tensoativo Tinoventine foi adquirido da Coema (São Paulo). Omnifluor, ^{45}Ca ($^{45}\text{CaCl}_2$), ^{86}Rb ($^{86}\text{RbCl}$) e ^{125}I -insulina foram comprados da New England Nuclear Corp. (Boston, Mass).

2.10. SOLUÇÕES

A solução para isolamento de ilhotas pancreáticas (**HANKS**) foi preparada de acordo com HANKS & WALLACE (1949¹⁰²), apresentando a seguinte composição (g/l):

NaCl	8,000
KCl	0,400
CaCl ₂ anidro	0,140
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,200
Na ₂ HPO ₄ anidro	0,048
KH ₂ PO ₄	0,060
NaHCO ₃	0,350
H ₂ O deionizada (q.s.p.)	1 000 ml

No momento de uso, adicionou-se glicose (250 mg/l de solução [1,4 mM]).

A solução-tampão bicarbonato de KREBS-RINGER (**KREBS**), para incubação e perfusão de ilhotas, bem como para o RIE, tem a seguinte composição (g/l):

NaCl	26,886
NaHCO ₃	8,065
KCl	1,491
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,813
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,588
H ₂ O deionizada (q.s.p)	1 000 ml

No momento de uso, foi adicionada albumina bovina (1 mg/ml). O pH (7,4) foi obtido após equilíbrio com carbogênio. O CO₂ integra o tampão.

O **TAMPÃO VERONAL** (0,15 M e pH 7,4), usado no RIE, foi preparado conforme a formulação abaixo (g/l):

Solução-estoque

Barbital sódico	29,428
Acetato de sódio	19,428
H ₂ O deionizada (q.s.p.)	1 000 ml

Preparação para uso:

Solução-estoque	50 ml
HCl 0,1 N	50 ml
NaCl	7,65 g
H ₂ O deionizada (q.s.p.)	1 000 ml

O **TAMPÃO FOSFATO** (0,05 M e pH 7,5) (usado para diluição do PEG) (g/l) apresenta a seguinte composição:

Solução-estoque (0,2 M e pH 7,5)

KCl	1,490
KH ₂ PO ₄	13,600
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	35,800
NaNO ₃	0,520
H ₂ O deionizada (q.s.p.)	1 000 ml

Preparação para uso:

Solução-estoque	250 ml
H ₂ O deionizada	750 ml

Acertou-se o pH 7,5 .

LÍQUIDO DE CINTILAÇÃO (1 l)

Omnifluor	2,68 g
Tinoventine	330 ml
Tolueno	670 ml

2.11. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados foram expressos como média $\pm$ epm. Para variáveis que apresentaram distribuição normal (teste de normalidade) e variâncias homoscedásticas (testes de Bartlett ou F), foi utilizada estatística paramétrica. Neste caso, para múltiplas comparações, utilizou-se a ANOVA unifatorial, seguida do pós-teste (Student-Newman-Keuls). Para comparações múltiplas com um controle, utilizou-se o teste de Dunnett. Para comparações entre dois grupos (v.g. *claro vs. escuro*) usou-se o teste t de Student, não-pareado.

Para variáveis que não apresentaram distribuição normal (v.g. valores percentuais) e/ou apresentaram variâncias heteroscedásticas, aplicaram-se testes não-paramétricos. Neste caso, para múltiplos contrastes, utilizou-se a ANOVA não-paramétrica (teste de Kruskal-Wallis), seguida do teste de Dunn. Múltiplas comparações com um controle foram feitas de acordo com procedimento sugerido por DUNN (1964, *apud ZAR, 1984*²⁸⁵) e HOLLANDER & WOLFE (1973, *apud ZAR, 1984*²⁸⁵). Para comparações entre dois grupos (*claro vs. escuro*) usou-se o teste U de Mann-Whitney. O teste da mediana foi utilizado para verificar a aleatoriedade da

seqüência dos horários de execução dos experimentos. O grau de relação linear entre duas variáveis — coeficiente de correlação (r) de Pearson — foi determinado pelo método dos mínimos quadrados.

Diferenças com $p > 0,05$ foram consideradas não-significativas. Resultados submetidos às ANOVAs, e que apresentaram significâncias limítrofes, também foram submetidos ao pós-teste.

Valores da secreção de insulina que ultrapassaram o limite de dois desvios-padrões foram excluídos dos dados e da análise estatística.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. SECREÇÃO DE INSULINA EM CONDIÇÃO ESTÁTICA

A figura 2 mostra o efeito de concentrações crescentes de glicose, sobre a secreção de insulina, por ilhotas pancreáticas isoladas de rato e incubadas (grupos de cinco) a 37 °C, por 60 minutos, em diferentes horas do dia. Em G 0, a secreção variou entre $3,6 \pm 0,50$ e $4,4 \pm 0,45$ ng/ilhota por 60 minutos, às 16 e 8 h, respectivamente, não ocorrendo diferença entre horários ($p > 0,05$).

Em G 2,8, a secreção mínima também ocorreu às 16 h ($3,6 \pm 0,40$ ng/ilhota por 60 min), enquanto a máxima verificou-se às 20 h ($5,2 \pm 0,50$ ng/ilhota por 60 min), não havendo diferença entre os valores.

Em G 5,6, a maior secreção também foi registrada às 20 h ($5,3 \pm 0,55$ ng/ilhota por 60 min), enquanto a menor foi observada às 12 h ($3,8 \pm 0,50$ ng/ilhota por 60 min), sem diferença entre horários. Nenhuma das secreções estimuladas por glicose (2,8 ou 5,6 mM) superou aquela verificada na ausência de glicose, no mesmo horário.

No intervalo entre G 5,6 e G 8,3, os segmentos de curva referentes aos experimentos das 0, 4 e 20 h situaram-se à esquerda dos demais.

Em G 8,3, a secreção verificada à 0 h ($8,6 \pm 0,90$ ng/ilhota por 60 min) foi superior àquela constatada às 8, 12 ou 16 h ($5,7 \pm 0,85$; $5,3 \pm 0,60$ e $5,1 \pm 0,80$ ng/ilhota por 60 min, respect.) ($p < 0,05$).

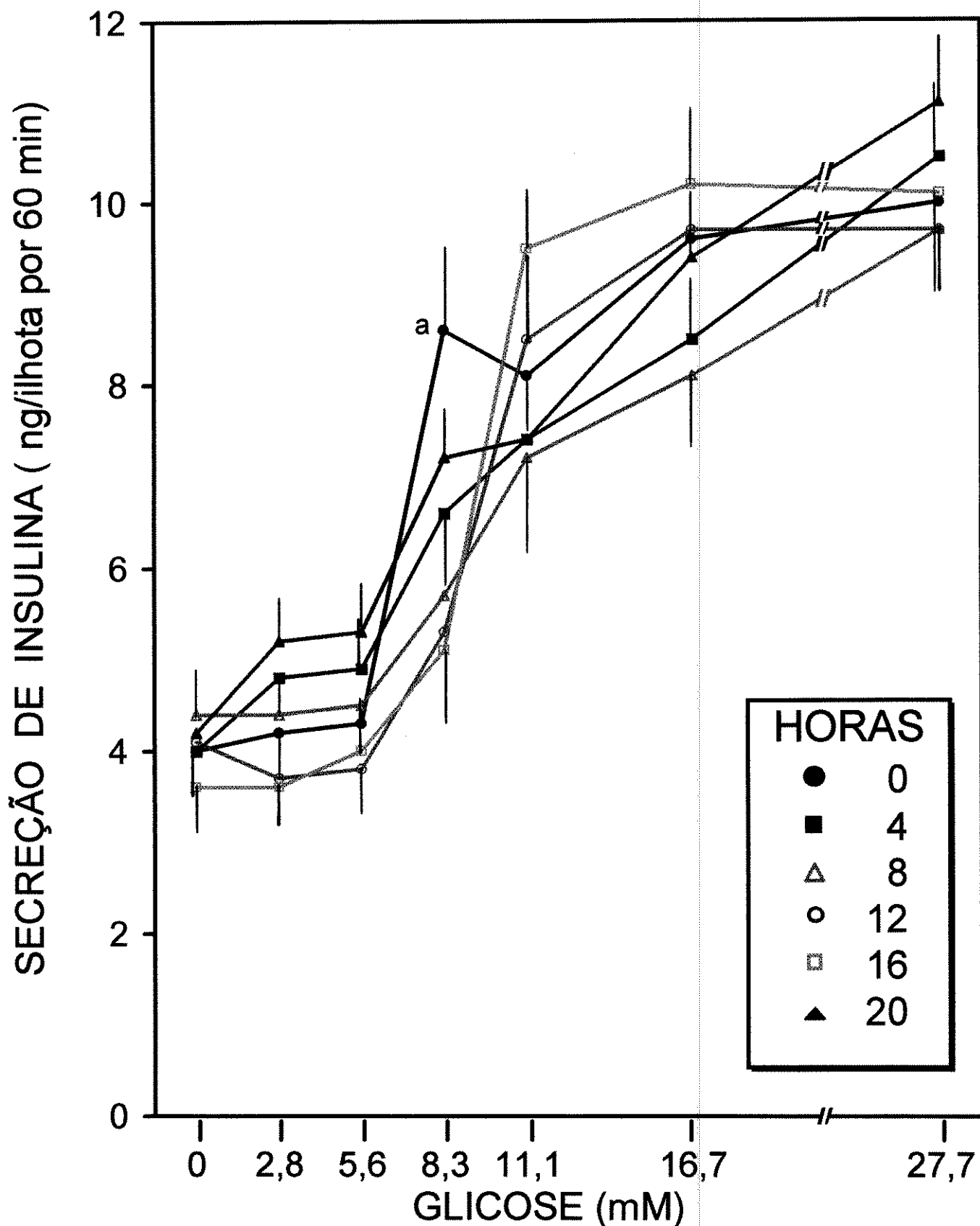


Figura 2. Efeito de concentrações crescentes de glicose sobre a secreção de insulina, por ilhotas de Langerhans isoladas de rato, em diferentes horas do dia, e incubadas (grupos de cinco) por 60 minutos, a 37 °C, em *Krebs*. Cada valor de secreção representa a média ($\pm$ epm) de 11 a 30 observações. a: $p < 0,05$ vs. 8, 12 e 16 h. Os horários indicam o momento de sacrifício dos ratos.

Nas concentrações de glicose superiores a 8,3 mM, não foram verificadas diferenças de secreção por efeito da hora do dia.

Em G 27,7, a secreção variou entre $9,7 \pm 0,65$ e $11,0 \pm 0,70$ ng/ilhota por 60 minutos, às 8 ou 12 h e às 20 h, respectivamente (N.S.).

Os resultados mostrados na figura 2 foram reunidos em dois grupos, de acordo com o período de sacrifício dos animais, a saber: o grupo do período *claro*, para os experimentos iniciados às 8, 12 ou 16 h, e o do período *escuro*, para aqueles iniciados às 0, 4 e 20 h (Fig. 3). Para cada um dos grupos, calculou-se a média ($\pm$ epm) da secreção de insulina verificada em cada concentração de glicose.

A figura 3 mostra que, na ausência de glicose, não houve diferença de secreção de insulina entre grupos ($4,1 \pm 0,27$ e $4,1 \pm 0,28$ ng/ilhota por 60 min, nos períodos *claro* e *escuro*, respect.). Para ambos os grupos, não se constatou diferença entre as secreções obtidas em G 2,8 ou G 5,6, e a secreção na ausência de glicose. Também em ambos, verificou-se que G 8,3 provocou secreção acima dos níveis basais ($5,4 \pm 0,45$ e $7,4 \pm 0,44$ ng/ilhota por 60 min, respect.) ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respect.). Não obstante, no intervalo entre G 0 e G 8,3, a curva dose-resposta do período *escuro* apresentou-se deslocada à esquerda daquela do período *claro*. Nesse período, as secreções estimuladas por G 2,8, G 5,6 e G 8,3 foram, respectivamente, 21, 17 e 37% superiores às do período *claro* ($p < 0,025$; $p < 0,05$ e $p < 0,0025$, respect.). Não se constatou influência do período do dia sobre a secreção estimulada por glicose, entre 11,1 e 27,7 mM.

Para minimizar os efeitos da variabilidade da secreção basal entre protocolos do mesmo grupo experimental, os valores individuais de cada

SECREÇÃO DE INSULINA (ng/ilhota por 60 min)

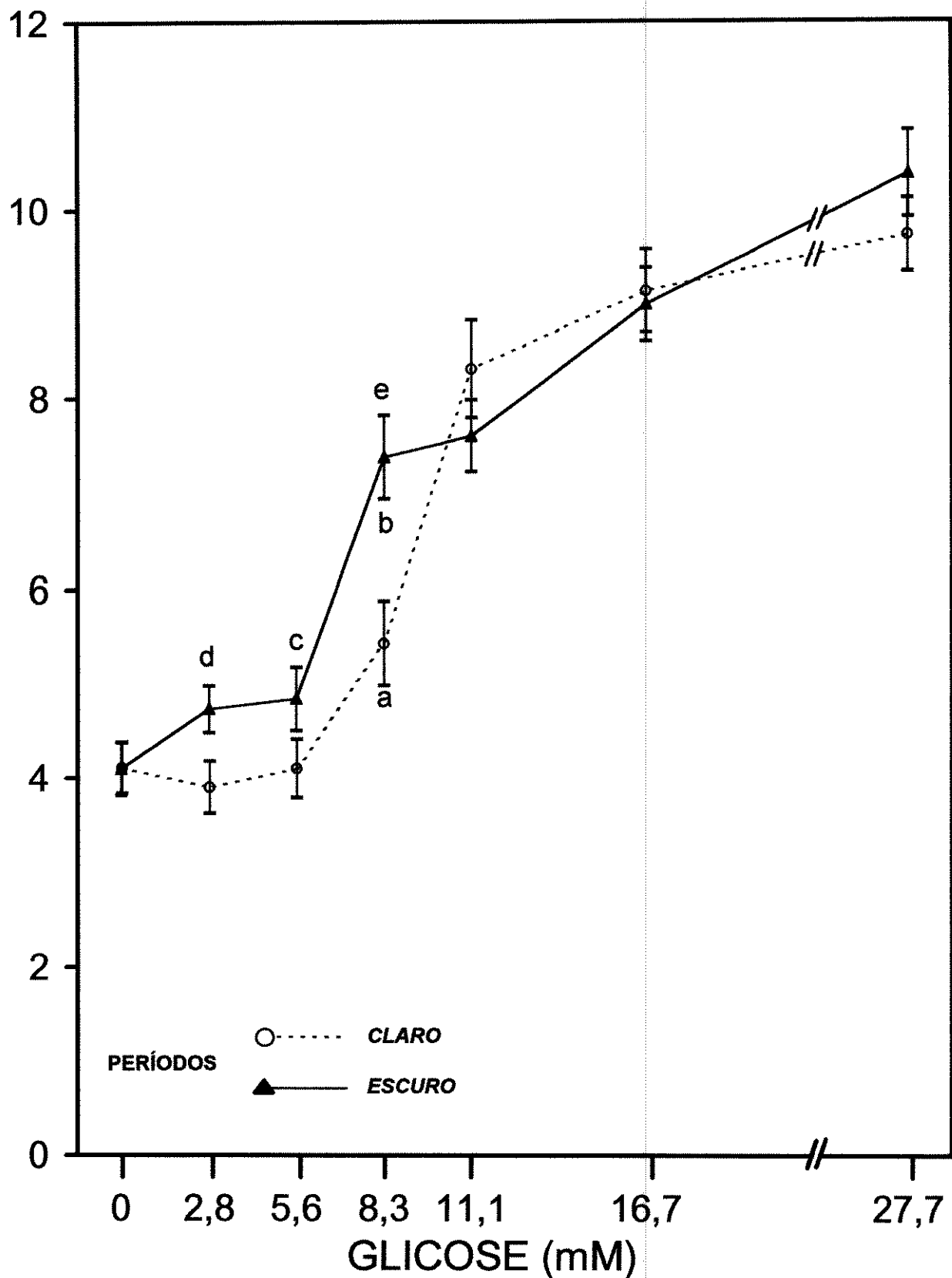


Figura 3. Comparação dos efeitos de concentrações crescentes de glicose sobre a secreção de insulina, por ilhotas de Langerhans (grupos de cinco) isoladas de rato, entre experimentos realizados nos períodos *claro* (8, 12 e 16 h) e *escuro* (20, 0 e 4 h) (horários de sacrifício dos ratos). As ilhotas foram incubadas por 60 minutos, a 37 °C, em *Krebs*. Os valores de secreção representam a média ($\pm$ epm) de 46 a 77 observações e foram extraídos da figura 2. a: $p < 0,05$ vs. G 0; b: $p < 0,001$ vs. G 0; c: $p = 0,05$ vs. *claro*; d: $p < 0,025$ vs. *claro*; e: $p < 0,0025$ vs. *claro*.

experimento foram relacionados percentualmente à média da secreção obtida na ausência de glicose naquele protocolo, estando suas médias ($\pm$ epm) representadas na figura 4. As secreções percentuais observadas em G 2,8 (entre $95 \pm 12\%$ às 12 h e $136 \pm 15\%$ às 16 h) não diferiram daquela verificada na ausência do secretagogo, em todos os horários. G 5,6 estimulou a secreção de insulina acima dos níveis basais apenas nos experimentos das 20 h. Nesse horário, a secreção foi $165 \pm 18\%$ ($p < 0,05$). Nessa mesma concentração de glicose, as secreções observadas às 16 e às 20 h ($137 \pm 15\%$ e $165 \pm 18\%$, respect.) foram maiores que a observada às 12 h ($77 \pm 9\%$) ($p < 0,05$ e $p < 0,002$, respect.). A secreção estimulada por G 8,3 foi maior à 0 h ($254 \pm 25\%$) e às 20 h ($238 \pm 22\%$), comparada àquela das 8 h ($138 \pm 13\%$) ($p < 0,01$, para ambos). Não houve, entre horários, diferenças de secreção percentual nas concentrações de glicose superiores a 8,3 mM. Observou-se que, entre G 0 e G 8,3, as curvas dose-efeito dos experimentos do período *escuro* situaram-se à esquerda daquelas obtidas às 8 e 12 h.

Os resultados da figura 4 foram tratados tal qual descrito para aqueles da figura 2. Assim, a figura 5 mostra não haver diferença entre as secreções dos períodos *claro* e *escuro* em G 2,8 ($107 \pm 7,5$ vs. $121 \pm 7,2\%$, respect.). Porém, em G 5,6, a secreção do período *escuro* foi 32% superior à do período *claro* ($139 \pm 10,7\%$ vs. $105 \pm 7,1\%$) ($p < 0,025$). Igualmente, em G 8,3, a secreção do período *escuro* foi 37% superior à do período *claro* ($223 \pm 14,5$ vs. $163 \pm 12,0\%$, respect.) ($p < 0,001$). Constata-se, portanto, que a curva do período *escuro* apresentou-se deslocada à esquerda daquela do período *claro*. Assim, a secreção obtida com G 8,3, no período *escuro* ($223 \pm 14,5\%$), foi equivalente àquela obtida com G 11,1 no período *claro* ($235 \pm 15,3\%$). Por outro lado, enquanto o limiar estimulatório

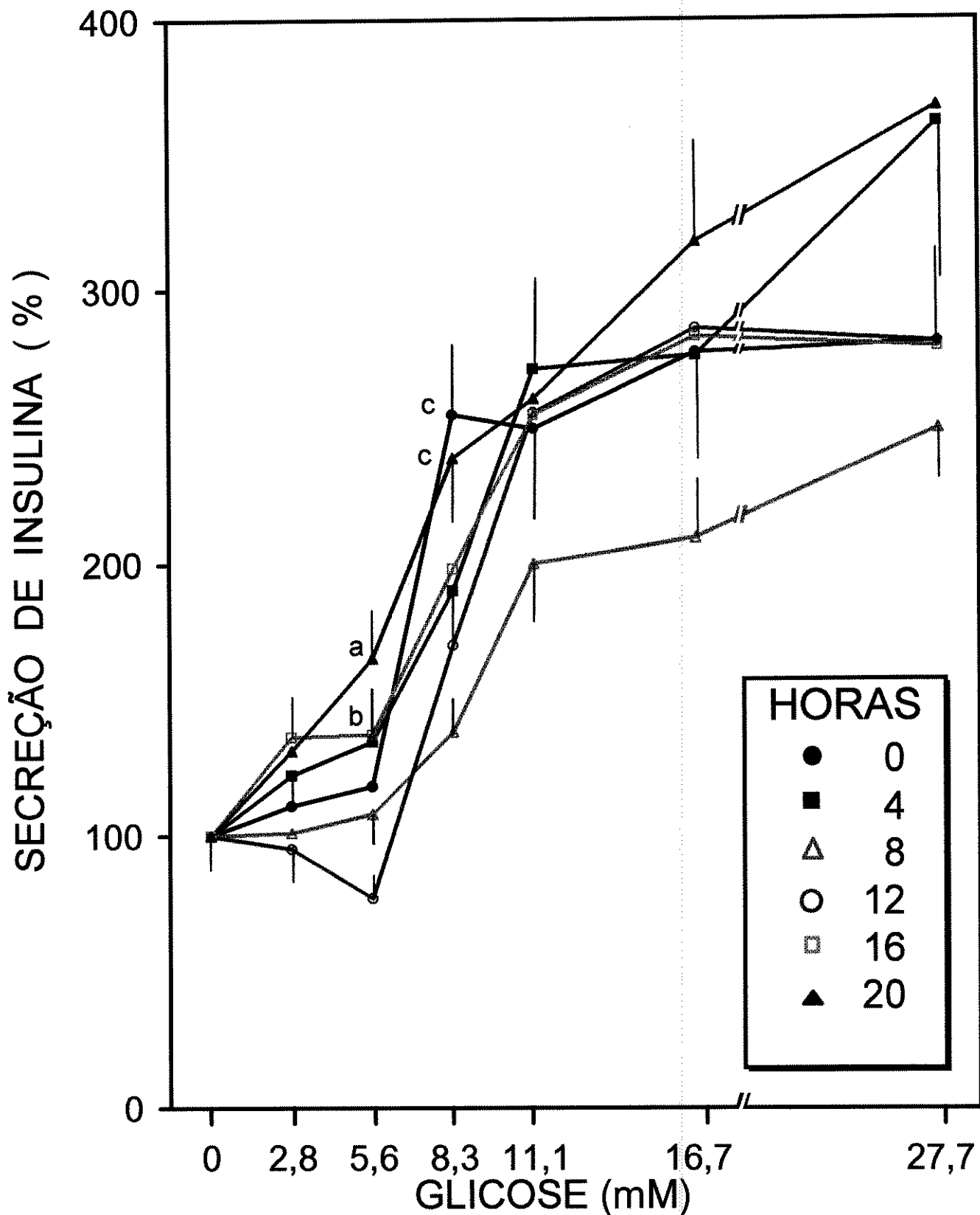


Figura 4. Efeito de concentrações crescentes de glicose sobre a secreção de insulina, por ilhotas de Langerhans isoladas de rato, em diferentes horas do dia, e incubadas (grupos de cinco) por 60 minutos, a 37 °C, em *Krebs*. Cada valor de secreção representa a média ($\pm$ epm) de 11 a 30 observações, após normalização dos resultados. Para normalização, em cada protocolo, os valores foram relacionados percentualmente à média da secreção obtida na ausência de glicose. a: $p < 0,05$ vs. G 0 e $p < 0,002$ vs. G 5,6 às 12 h; b: $p < 0,05$ vs. 12 h; c: $p < 0,01$ vs. 8h. Os horários indicam o momento de sacrifício dos ratos.

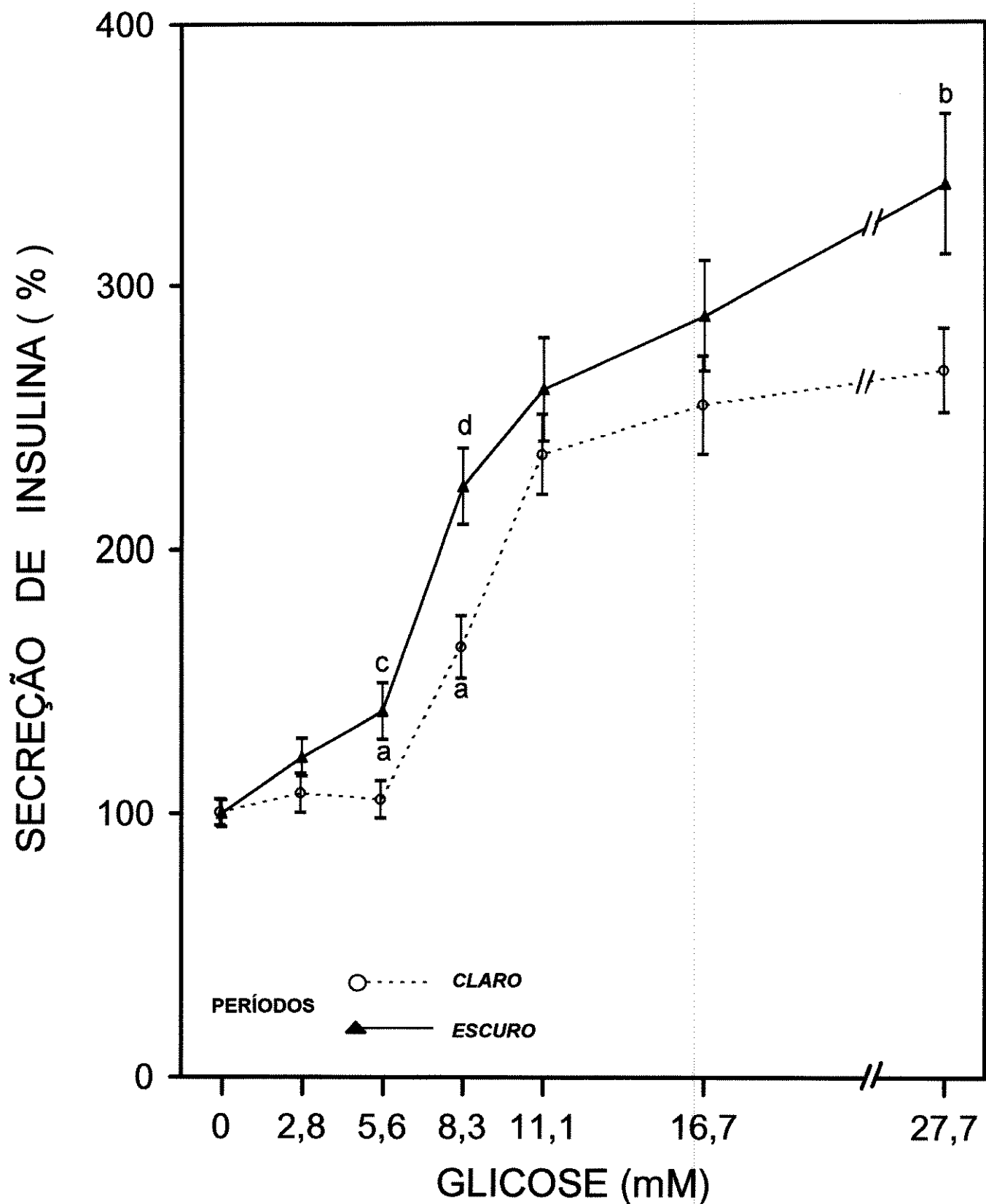


Figura 5. Comparação dos efeitos de doses crescentes de glicose sobre a secreção de insulina, por ilhotas de Langerhans (grupos de cinco) isoladas de rato, entre experimentos realizados nos períodos *claro* (8, 12 e 16 h) e *escuro* (20, 0 e 4 h) (horários de sacrifício dos ratos). As ilhotas foram incubadas por 60 minutos, a 37 °C, em *Krebs*. Os valores de secreção (normalizados) representam a média ($\pm$ epm) de 46 a 77 observações e foram extraídos da figura 4. a: $p < 0,05$ vs. G 0; b: $p < 0,025$ vs. *claro*; c: $p < 0,005$ vs. *claro*; d: $p < 0,0025$ vs. *claro*.

encontrado no grupo *claro* foi igual a 8,3 mM, no grupo *escuro* situou-se em 5,6 mM de glicose ($p < 0,05$ vs. G 0, em ambos os períodos). Nas concentrações de glicose acima de 8,3 mM, somente se observou efeito do período do dia, sobre a secreção, em G 27,7. Desse modo, enquanto em G 11,1 foram obtidos valores de $260 \pm 19,8$ e $235 \pm 15,3\%$, para os grupos *escuro* e *claro*, respectivamente, em G 16,7 os valores foram $288 \pm 21,1$ e $254 \pm 18,8\%$, respectivamente. Finalmente, com G 27,7, as secreções médias foram $339 \pm 26,5$ e $267 \pm 16,2\%$, para os grupos *escuro* e *claro*, respectivamente ($p < 0,025$).

A figura 6 mostra a secreção percentual de insulina em relação a G 0 (valores normalizados), por ilhotas incubadas em G 5,6, em seis momentos do dia. Os valores foram extraídos da figura 4 e mostram variação ao longo do dia ($H = 19,69$; $p < 0,005$). Assim, enquanto a secreção foi mínima às 12 h ($77 \pm 9\%$), seu valor aumentou progressivamente, perfazendo $137 \pm 15\%$ às 16 h ($p < 0,05$), até atingir valor máximo às 20 h ($165 \pm 18\%$) ($p < 0,002$). A partir deste horário, a secreção declinou até atingir, às 12 h, níveis que representam 47% do valor máximo.

A figura 7 mostra a secreção percentual de insulina, por ilhotas incubadas em G 8,3, em seis momentos do dia. Os valores foram extraídos da figura 4 e revelam variação ao longo do dia ($H = 18,46$) ($p < 0,005$). Desse modo, enquanto a secreção foi mínima às 8 h ($138 \pm 13\%$), ela cresceu gradativamente, até atingir valores máximos às 20 e 0 h ($238 \pm 22\%$ e $254 \pm 25\%$, respect.) ($p < 0,01$, para ambas as comparações). A partir de 0 h, a secreção reduziu-se até atingir, às 8 h, níveis que representam 54% do valor máximo.

G 5,6

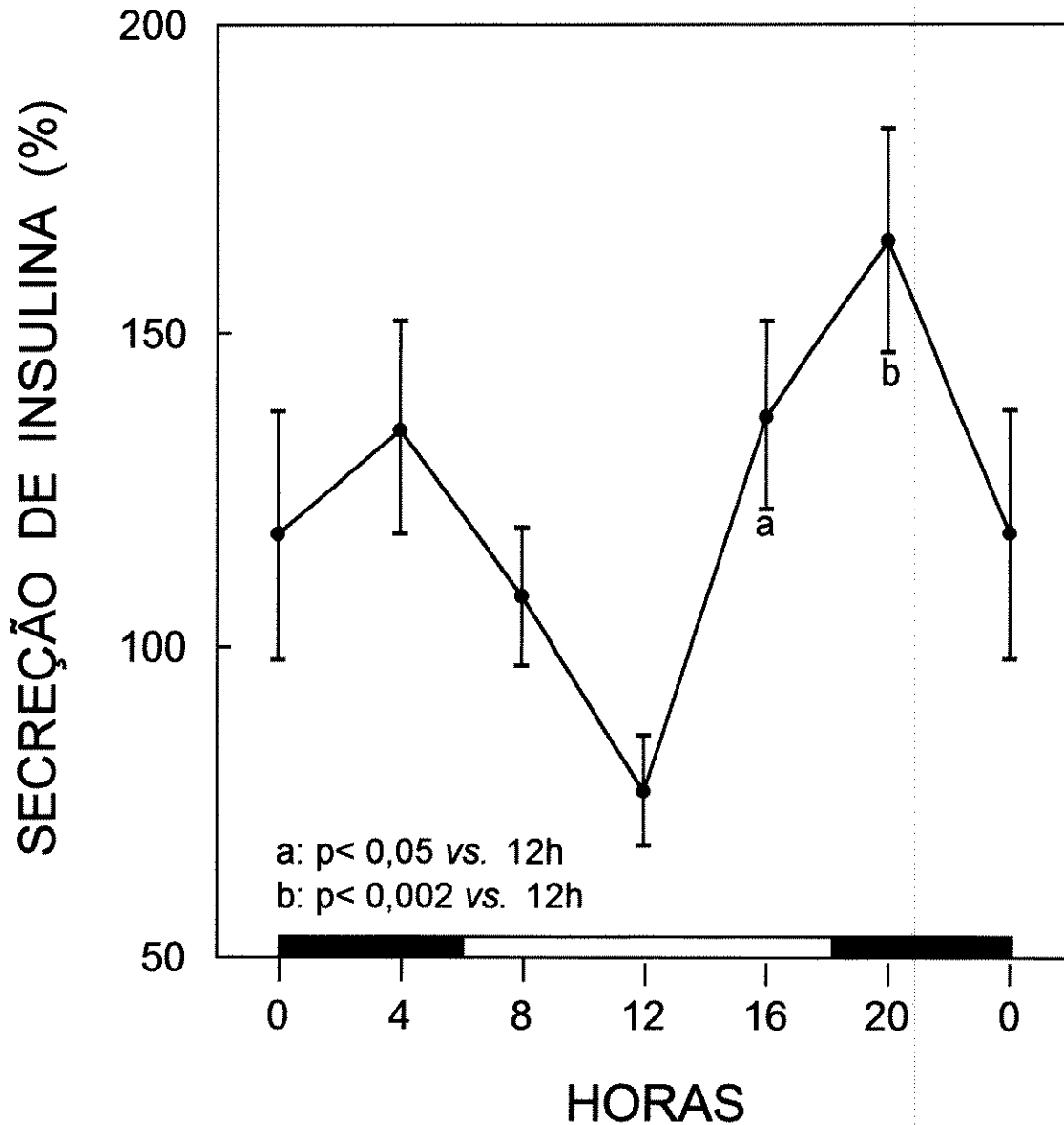


Figura 6. Variação diária da secreção de insulina por ilhotas de Langerhans isoladas de rato, em diferentes horas do dia, e incubadas por 60 minutos, a 37 °C, em *Krebs* contendo glicose (5,6 mM). Cada valor de secreção representa a média ($\pm$ epm) de 16 a 26 observações, após normalização dos resultados, e foi extraído da figura 4. As barras pretas, na parte inferior, indicam o período *escuro*.

G 8,3

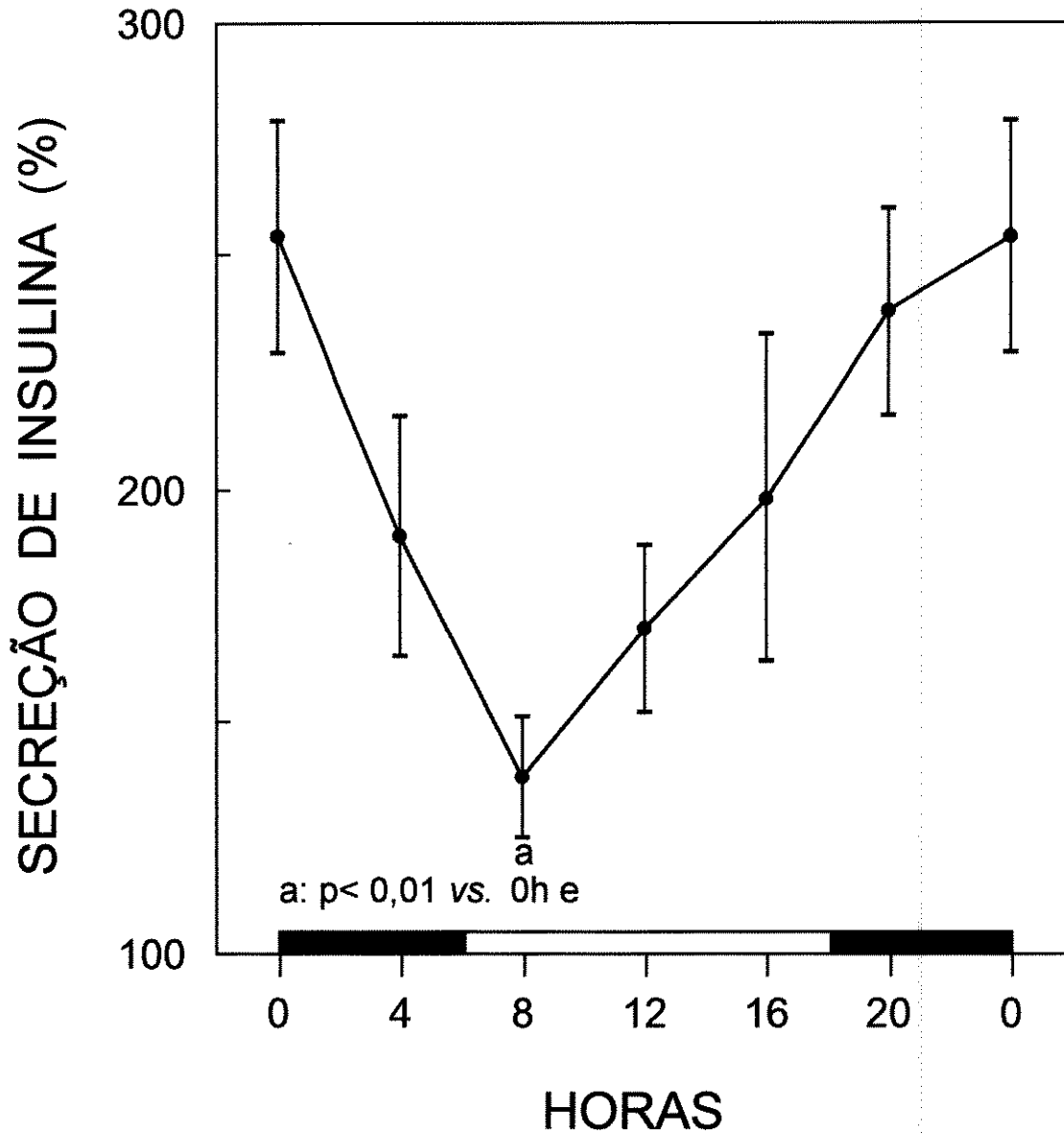


Figura 7. Variação diária da secreção de insulina por ilhotas de Langerhans isoladas de rato, em diferentes horas do dia, e incubadas por 60 minutos, a 37 °C, em *Krebs* contendo glicose (8,3 mM). Cada valor de secreção representa a média ($\pm$ epm) de 11 a 22 observações, após normalização dos resultados, e foi extraído da figura 4. As barras pretas, na parte inferior, indicam o período *escuro*.

As concentrações efetivas medianas (EC_{50}) de glicose, como estímulo da secreção de insulina, por ilhotas isoladas e incubadas nos diferentes horários, foram calculadas a partir das curvas dose-resposta, construídas com valores normalizados de secreção (Fig. 8). Para normalização, em todas as concentrações de glicose e em todos os horários, subtraiu-se o valor basal médio, da média de secreção ali obtida. O resultado foi, então, relacionado percentualmente à média da secreção máxima. Os valores extremos de EC_{50} (mM) ocorreram à 0 e às 8 h (7,8 e 12,4 , respect.). Para os demais horários, obtiveram-se os seguintes valores: 4 h = 11,4; 12 h = 10,0; 16 h = 9,3 e 20 h = 11,2. Constata-se que o limiar excitatório, nos experimentos do período *escuro*, apresentou-se menor que naqueles do período *claro*. Assim, verifica-se que, entre G 0 e G 5,6, as curvas dose-resposta do período *escuro* posicionaram-se à esquerda daquelas obtidas às 12 e 16 h, de onde derivam os menores valores de K às 4 e 20 h (13 e 15, respect.), em comparação com os K das 12 e 16 h (1962 e 42 558, respect.) (Tabela 1). Embora as curvas das 12 e 16 h tenham apresentado as maiores inclinações (refletidas nos valores de $\lambda = 757 \times 10^5$ e $1\,143 \times 10^5$), verifica-se que, para isso, contribuíram principalmente os valores de secreção verificados a partir de G 8,3. Assim, de maneira geral, no intervalo entre G 0 e G 8,3, as curvas do período *escuro* situaram-se à esquerda daquelas do período *claro*.

As curvas dose-resposta a glicose, da secreção de insulina, resultam da aplicação da equação:

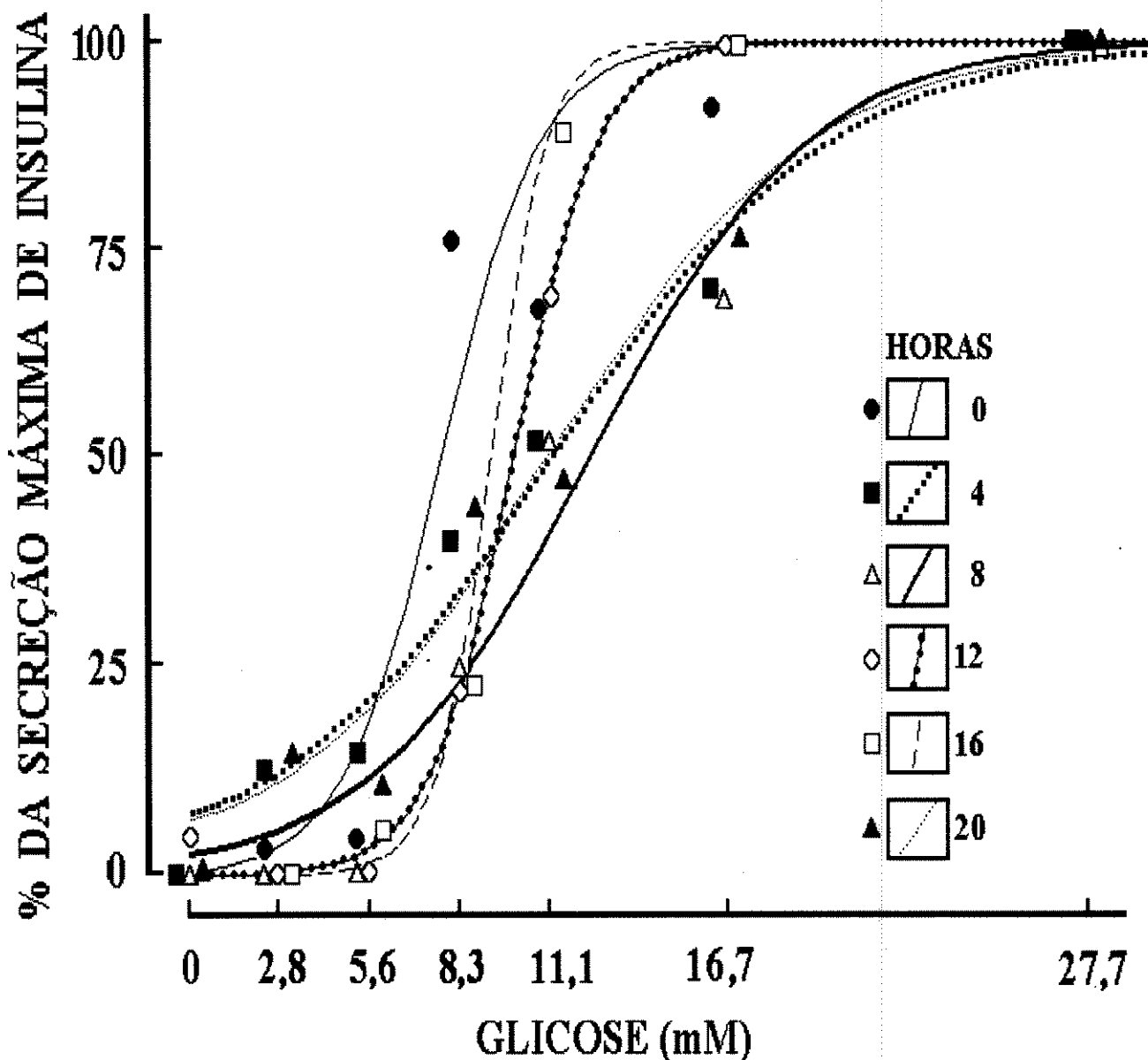


Figura 8. Curvas dose-resposta da secreção de insulina, em diferentes horas do dia. Mediu-se a secreção cumulativa de insulina, por ilhotas incubadas durante 60 minutos, a 37 °C, em presença de concentrações crescentes de glicose (zero a 27,7 mM). Normalizou-se cada valor subtraindo-se a secreção basal de insulina e expressando-se o resultado como percentagem da secreção máxima. Os pontos representam a secreção média de 11 a 30 observações. Para maior clareza, omitiram-se os erros padrões. As curvas sigmóides resultam do ajuste matemático, executado pela aplicação de regressão logística, com minimização de desvios. Os valores de EC_{50} (mM), para as diferentes horas do dia, foram: 0 h = 7,8; 4 h = 11,4; 8 h = 12,4; 12 h = 10,0; 16 h = 9,3; 20 h = 11,2.

Tabela 1. Valores das constantes que definem as curvas dose-resposta representadas na figura 8. **B** indica o valor percentual máximo da secreção de insulina. **K** representa a posição da curva no eixo da abscissa. λ indica a inclinação da curva. **EC₅₀** é a concentração efetiva mediana de glicose (mM).

Horas	0	4	8	12	16	20
Parâmetros						
B	100	100	100	100	100	100
K	160	13	39	1 962	42 558	15
$\lambda \times (10^5)$	650	226	295	757	1 143	243
EC₅₀	7,8	11,4	12,4	10,0	9,3	11,2

$$y = \frac{B}{1 + K e^{-\lambda B t}},$$

onde y e t são medidos em percentagem e concentração de glicose (mM), respectivamente. B indica o valor percentual máximo da secreção de insulina. K representa a posição da curva no eixo da abscissa, enquanto λ indica a sua inclinação.

3.2. EFLUXO DE ^{86}Rb

3.2.1. EFEITO DA SUPRESSÃO DE GLICOSE SOBRE O EFLUXO DE ^{86}Rb , EM ILHOTAS DE RATOS ALIMENTADOS

A figura 9 mostra o efeito da retirada de glicose, do meio de perfusão, sobre o efluxo fracional de ^{86}Rb de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos adultos, alimentados *ad libitum*, nas seis horas do dia estudadas. A influência da hora do dia foi determinada pela análise matemática dos seis conjuntos de curvas de efluxo, a partir do que se definiram quatro parâmetros, cujos cursos temporais diários (média $\pm$ epm; $n = 3$ a 7) são representados na figura 10.

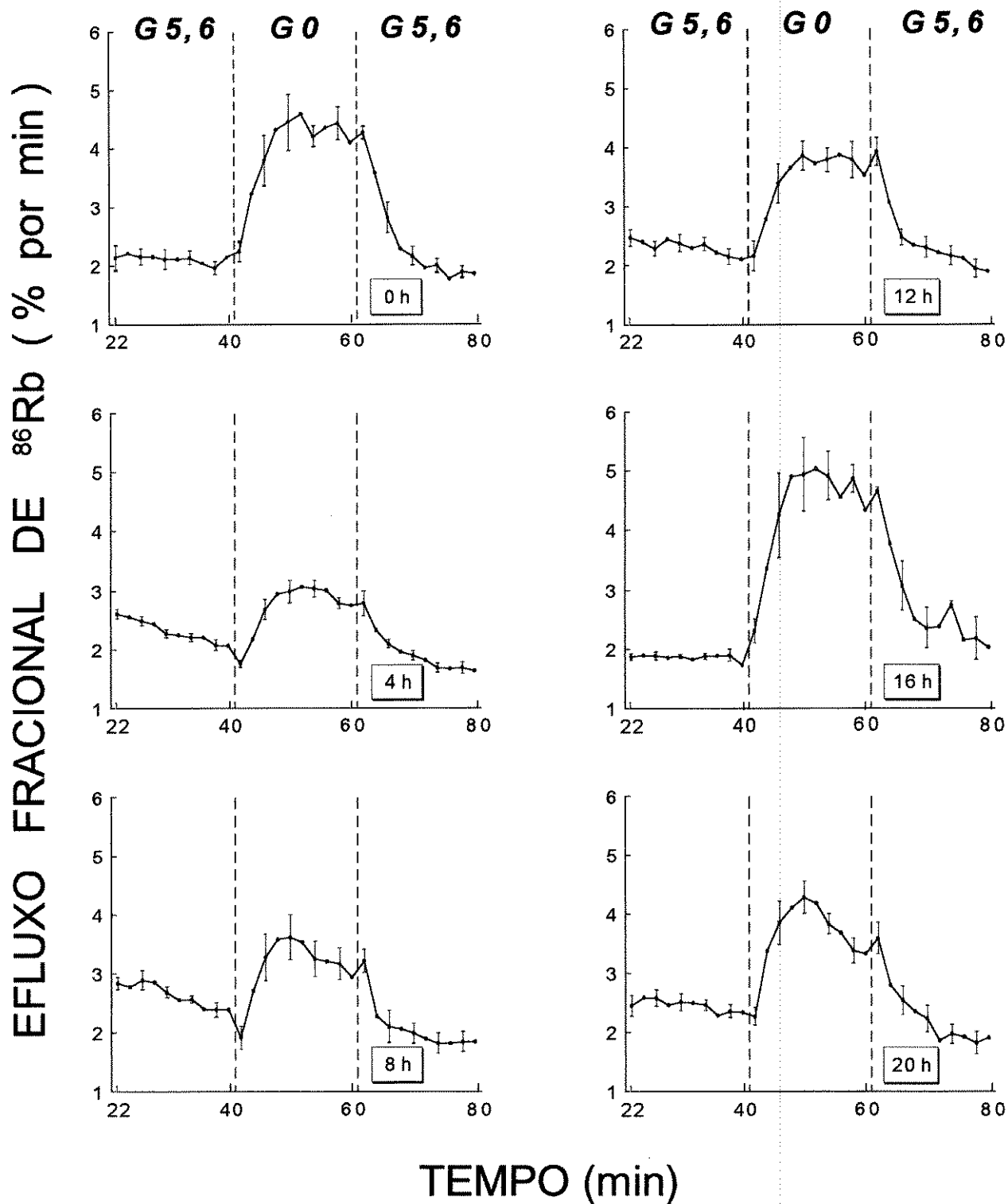
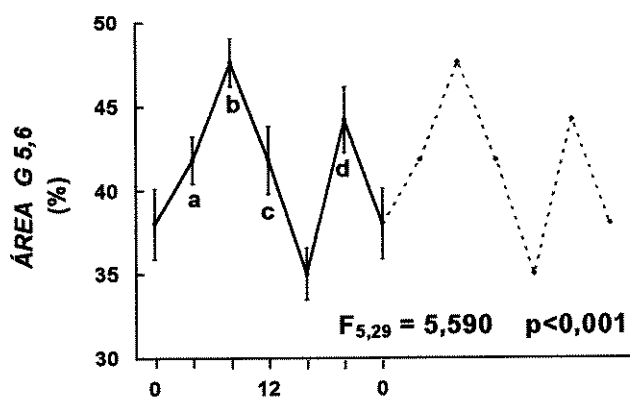


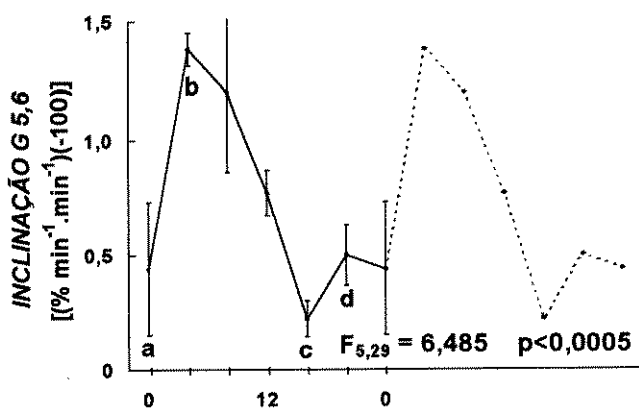
Figura 9. Efeito da supressão de glicose, do líquido de perfusão, sobre o efluxo fracional de ^{86}Rb de ilhotas pancreáticas de ratos adultos, alimentados *ad libitum*, nas seis horas do dia indicadas em cada gráfico (horário de sacrifício dos ratos). As ilhotas foram inicialmente marcadas com esse radioisótopo, durante 75 minutos, em presença de glicose (5,6 mM) e, a seguir, perfundidas durante 40 minutos por *Krebs* contendo igual concentração do secretagogo. O efluente foi coletado a cada dois minutos, a partir do 20º minuto. As linhas tracejadas verticais sinalizam o instante de mudança da concentração de glicose da solução. Os valores indicados são a média ($\pm$ epm) de quatro experimentos em cada horário (0, 8 e 12 h) e de três, seis e sete experimentos (16, 20 e 4 h, respectivamente).

Figura 10. Variação diária de diferentes parâmetros do efluxo fracional de ^{86}Rb , em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos alimentados e perfundidas por *Krebs* contendo, ou não, glicose (5,6 mM). Em cada horário, os valores (média $\pm$ epm) foram calculados a partir dos dados das curvas individuais de efluxo. A média destas curvas é apresentada na figura 9, com $n = 4$ (0, 8 e 12 h) e $n = 3$ a 7 (4, 16 e 20 h). As barras pretas, na parte inferior, indicam o período *escuro*. Os gráficos representam, para seis diferentes horas do dia: **(A) ÁREA G 5,6** é a área integrada **sob** a curva do efluxo fracional de ^{86}Rb , entre o 22° e o 40° minuto de perfusão (G 5,6), calculada tendo por base o valor zero da ordenada. a: $p < 0,025$ vs. 16 h; b: $p < 0,001$ vs. 0 ou 16 h; c: $p < 0,05$ vs. 16 h; d: $p < 0,01$ vs. 16 h. **(B) INCLINAÇÃO G 5,6** é a inclinação da curva de regressão exponencial dos valores do efluxo fracional de ^{86}Rb , entre o 22° e o 40° minuto de perfusão (G 5,6). a: $p < 0,01$ vs. 4 h; b: $p < 0,005$ vs. 16 h ou 20 h; c: $p < 0,01$ vs. 8 h; d: $p < 0,05$ vs. 8 h. **(C) $\Delta\%$** é o aumento percentual do efluxo fracional de ^{86}Rb , após a supressão de glicose da solução de perfusão, calculado pela equação: $[(\text{efluxo médio dos três valores de pico} \div \text{efluxo médio do 36° ao 40° min}) \times 100] - 100$. **(D) ÁREA G 0** é a área integrada **sob** a curva do efluxo fracional de ^{86}Rb , entre o 42° e o 60° minuto de perfusão (G 0), calculada tendo por base a projeção horizontal, nesse período, da média aritmética do efluxo fracional de ^{86}Rb , ocorrido entre o 32° e o 40° minuto. a: $p < 0,025$ vs. 4 h; b: $p < 0,005$ vs. 16 h; c: $p < 0,025$ vs. 16 h; d: $p < 0,01$ vs. 8 ou 20 h.

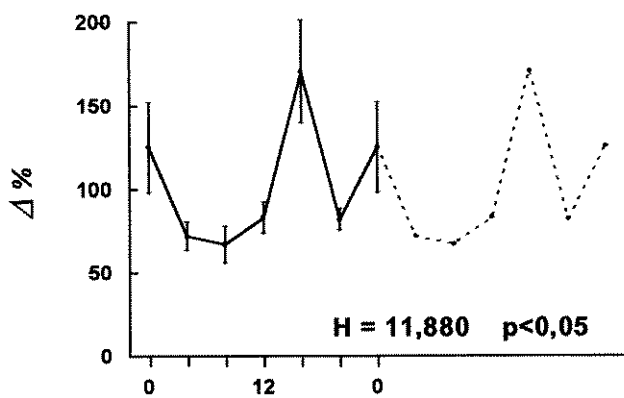
A



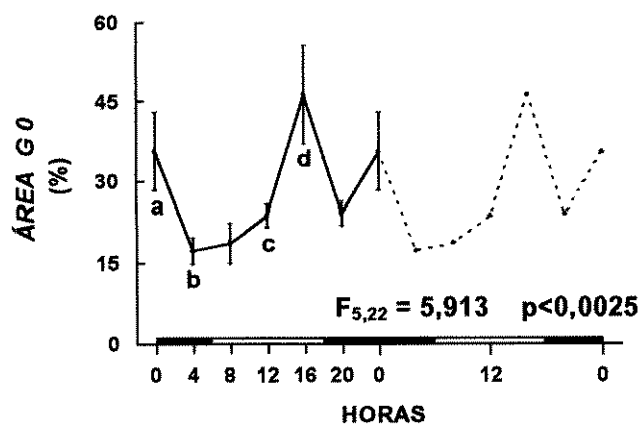
B



C



D



A área G 5,6 (área integrada sob a curva do efluxo fracional de ^{86}Rb , entre o 22° e o 40° minuto de perfusão com G 5,6) (Fig. 10A) variou entre $35,0 \pm 1,52$ e $47,6 \pm 1,42\%$, às 16 e às 8 h, respectivamente, apresentando dependência da hora do dia ($F_{5,29} = 5,590$; $p < 0,001$). A área obtida às 16 h foi menor que aquelas observadas às 4, 8, 12 e 20 h ($p < 0,05$ ou menos, para cada comparação). No conjunto, observou-se declínio da área no período *claro* e aumento no período *escuro*. Não encontramos, contudo, correlação linear entre os valores de área G 5,6 e de secreção de insulina, em G 5,6, nas diferentes horas do dia ($r = 0,48$ e $r = -0,09$, para valores absolutos e normalizados de secreção, respect.).

A inclinação G 5,6 (inclinação da curva de regressão exponencial dos valores do efluxo fracional de ^{86}Rb , entre o 22° e o 40° minuto de perfusão com G 5,6) (Fig. 10B) também foi influenciada pela hora do dia ($F_{5,29} = 6,485$; $p < 0,0005$). Assim, enquanto a inclinação apresentou-se máxima às 4 h ($-0,0138 \pm 0,0007$), declinou progressivamente até as 16 h, quando atingiu seu mínimo ($-0,0022 \pm 0,0008\% \text{ min}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) ($p < 0,005$), tornando-se progressivamente maior a partir daí, até às 4 h. A exemplo da variação do parâmetro anterior, aqui também se constatou declínio dos valores do parâmetro, no período *claro*, e aumento no período *escuro*. Não houve, porém, correlação, nas diferentes horas do dia, com a secreção de insulina em G 5,6 ($r = 0,29$ e $r = 0,24$, para valores absolutos e normalizados de secreção, respect.).

Embora a ANOVA tenha apontado efeito da hora do dia sobre $\Delta\%$ (aumento percentual do efluxo fracional de ^{86}Rb após a retirada de glicose do líquido de perfusão) ($H = 11,880$; $p < 0,05$), o pós-teste não revelou qualquer

diferença (Fig. 10C). Pode-se, contudo, observar uma tendência a elevação desse parâmetro, no período *claro*, e decréscimo no *escuro*.

Não obstante, detectou-se influência da hora do dia sobre o parâmetro *área G 0* (área integrada sob a curva do efluxo fracional de ^{86}Rb , entre o 42° e o 60° minuto de perfusão [com *G 0*]) ($F_{5,22} = 5,913$; $p < 0,0025$) (Fig. 10D). Além disso, os valores deste parâmetro, nas seis horas do dia, correlacionaram-se significativamente com os valores de $\Delta\%$ ($r = 0,99$; $p < 0,0005$). No período *claro*, a *área G 0* aumentou de $18,6 \pm 3,70$ (8 h) para $46,3 \pm 9,30\%$ (16 h) ($p < 0,01$), caindo então para $24 \pm 2,24\%$, às 20 h ($p < 0,01$ vs. 16 h), até atingir o mínimo às 4 h ($17,2 \pm 2,46\%$; $p < 0,005$ vs. 16 h e $p < 0,025$ vs. 0 h).

Tanto $\Delta\%$, quanto *área G 0*, apresentaram significativa correlação negativa com os valores da secreção de insulina, na ausência de glicose ($r = -0,87$ e $r = -0,81$, respect; $p < 0,025$ em ambos os casos).

Constataram-se correlações lineares negativas entre os parâmetros *área G 5,6* ou *inclinação G 5,6* vs. $\Delta\%$ ou *área G 0*, com r variando entre $-0,80$ e $-0,90$ ($p < 0,05$ ou menos, para as quatro correlações). Observa-se, assim, que aos valores de pico dos parâmetros *área G 5,6* e *inclinação G 5,6*, ocorridos às 8 h, corresponderam valores mínimos de $\Delta\%$ ou *área G 0*, enquanto aos valores mínimos daqueles parâmetros corresponderam os valores máximos destes. Não houve correlação significativa entre *área G 5,6* e *inclinação G 5,6* ($r = 0,67$).

3.2.2. EFEITO DA SUPRESSÃO DE GLICOSE SOBRE O

EFLUXO DE ^{86}Rb , EM ILHOTAS DE RATOS EM JEJUM DURANTE 48 HORAS

A figura 11 ilustra o efeito da retirada de glicose, do meio de perfusão, sobre o efluxo fracional de ^{86}Rb , de ilhotas isoladas de ratos adultos, submetidos a jejum durante 48 horas, nas seis horas do dia estudadas. A retirada de glicose, do tampão de perfusão, provocou rápido e sustentado aumento da taxa de efluxo de ^{86}Rb , efeito este prontamente revertido pela reintrodução de glicose (5,6 mM). O jejum não impediu a ocorrência de variação diária do efluxo de ^{86}Rb , embora alterações do comportamento desse efluxo tenham sido observadas. Os resultados da análise matemática dos quatro parâmetros, já discriminados na figura 10, são mostrados na figura 12.

A *área G 5,6* (Fig. 12A) mostrou dependência da hora do dia ($F_{5,15} = 3,186$; $p < 0,05$), oscilando entre $36,0 \pm 1,90$ e $43,2 \pm 0,60\%$, às 0 e 20 h, respectivamente ($p < 0,025$).

A *inclinação G 5,6* (Fig. 12B) também apresentou significativa oscilação diária ($F_{5,15} = 5,382$; $p < 0,005$), com valor mínimo à 0 h ($0,00116 \pm 0,00255$) e máximo às 4 h ($0,01558 \pm 0,00056\% \text{ min}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) ($p < 0,025$), bem como várias diferenças entre horários, cuja discriminação é feita na legenda.

O $\Delta\%$ (Fig. 12C), igualmente, mostrou flutuação nas 24 horas do dia ($H = 11,079$; $p < 0,05$), tendo o efeito máximo da retirada de glicose, do líquido de perfusão, ocorrido às 4 h ($105 \pm 10,0\%$), e o mínimo às 20 h ($35 \pm 11,2\%$) ($p < 0,05$).

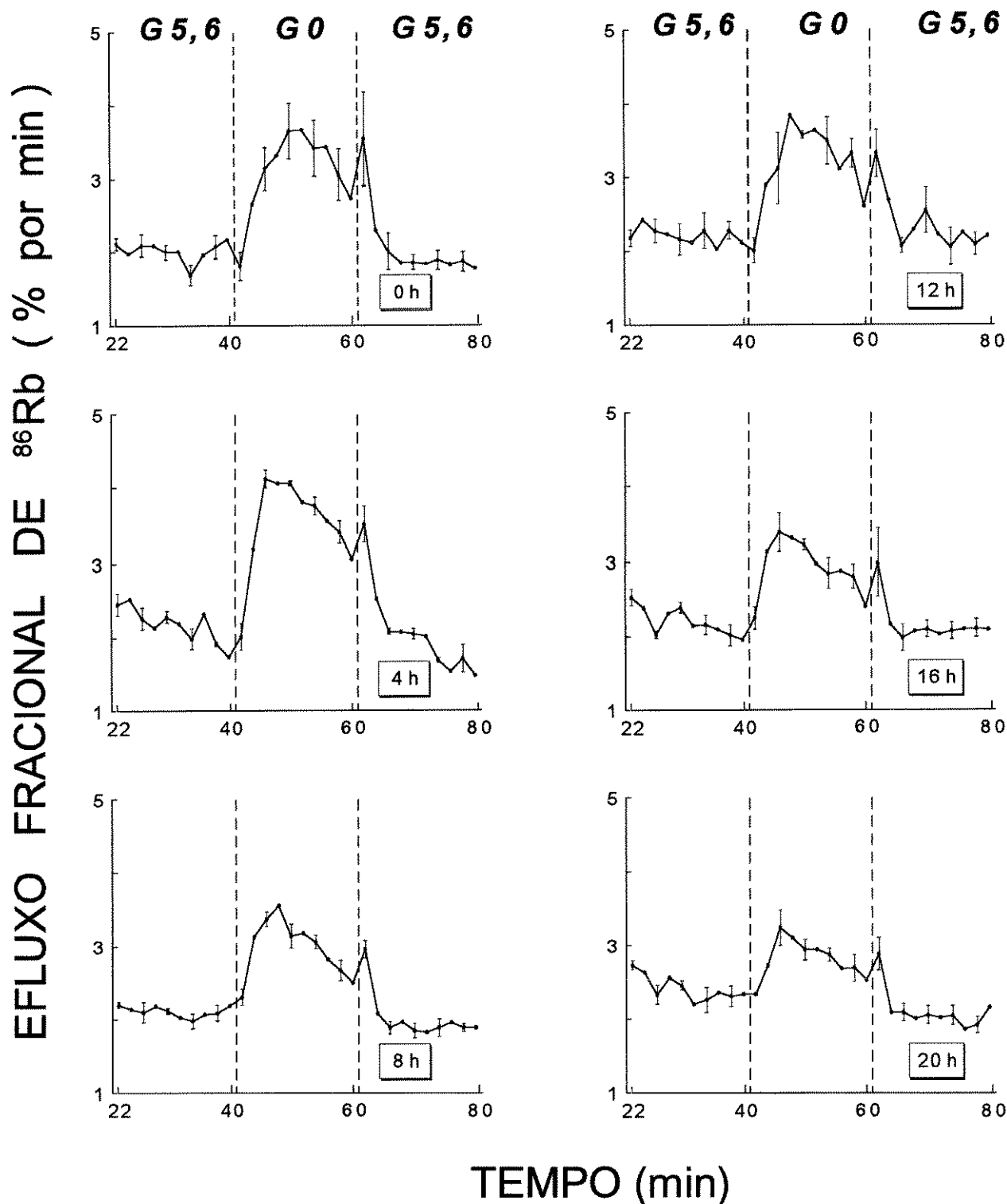
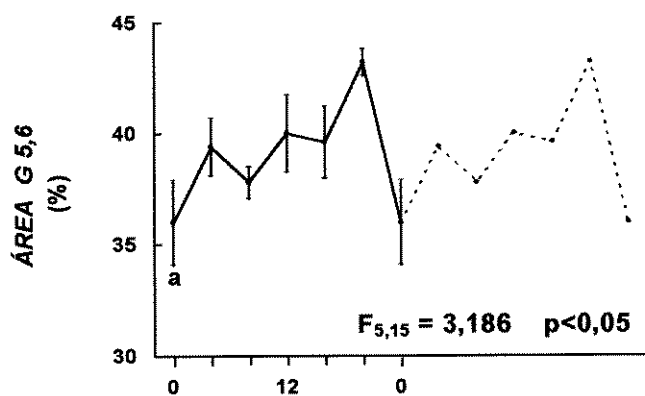


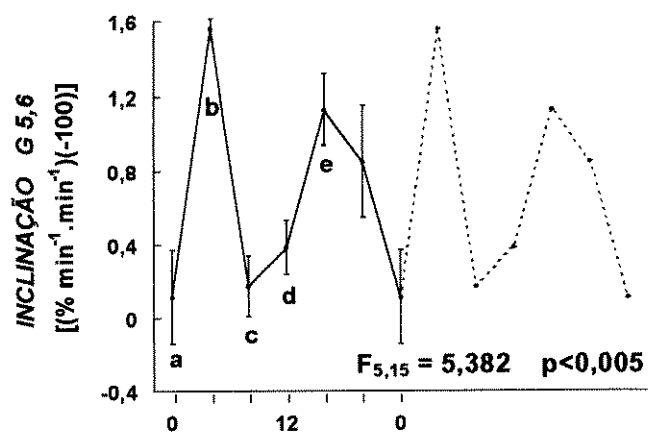
Figura 11. Efeito da supressão de glicose, do líquido de perfusão, sobre o efluxo fracional de ^{86}Rb de ilhotas pancreáticas de ratos adultos, submetidos a jejum durante 48 horas, nas seis horas do dia indicadas em cada gráfico (horário de sacrifício dos ratos). As ilhotas foram inicialmente marcadas com esse radioisótopo, durante 75 minutos, em presença de glicose (5,6 mM) e, a seguir, perfundidas durante 40 minutos por *Krebs* contendo igual concentração do secretagogo. O efluente foi coletado a cada dois minutos, a partir do 20º minuto. As linhas tracejadas verticais sinalizam o instante de mudança da concentração de glicose da solução. Os valores indicados são a média ($\pm$ epm) de quatro experimentos em cada horário (0, 8, 16 e 20h) e de dois e três experimentos (4 e 12 h, respectivamente).

Figura 12. Variação diária de diferentes parâmetros do efluxo fracional de ^{86}Rb , em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos submetidos a jejum durante 48 horas e perfundidas por *Krebs* contendo, ou não, glicose (5,6 mM). Em cada horário, os valores (média $\pm$ epm) de cada parâmetro foram calculados a partir dos dados das curvas individuais de efluxo. A média destas curvas é apresentada na figura 11, com $n = 4$ (0, 8, 16 e 20h) e $n = 2$ ou 3 (4 e 12 h), respectivamente. As barras pretas, na parte inferior, indicam o período *escuro*. Os gráficos representam, para seis diferentes horas do dia: **(A) ÁREA G 5,6** é a área integrada **sob** a curva do efluxo fracional de ^{86}Rb , entre o 22° e o 40° minuto de perfusão (G 5,6), calculada tendo por base o valor zero da ordenada. a: $p < 0,025$ vs. 20 h. **(B) INCLINAÇÃO G 5,6** é a inclinação da curva de regressão exponencial dos valores do efluxo fracional de ^{86}Rb , entre o 22° e o 40° minuto de perfusão (G 5,6). a: $p < 0,025$ vs. 4 h; b: $p < 0,025$ vs. 8 h; c: $p < 0,05$ vs. 16 h; d: $p < 0,05$ vs. 4 h; e: $p < 0,05$ vs. 0 h. **(C) $\Delta\%$** é o aumento percentual do efluxo fracional de ^{86}Rb , após a supressão de glicose da solução de perfusão, calculado pela equação: $\{[(\text{média dos três valores de pico} \div \text{média do } 36^\circ \text{ ao } 40^\circ \text{ min}) \times 100] - 100\}$. **(D) ÁREA G 0** é a área integrada **sob** a curva do efluxo fracional de ^{86}Rb , entre o 42° e o 60° minuto de perfusão (G 0), calculada tendo por base a projeção horizontal, nesse período, da média aritmética do efluxo fracional de ^{86}Rb , ocorrido entre o 32° e o 40° minuto. a: $p < 0,05$ vs. 20 h; b: $p < 0,025$ vs. 20 h.

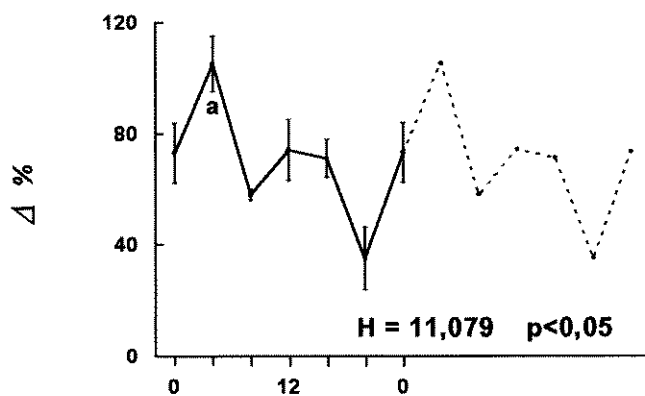
A



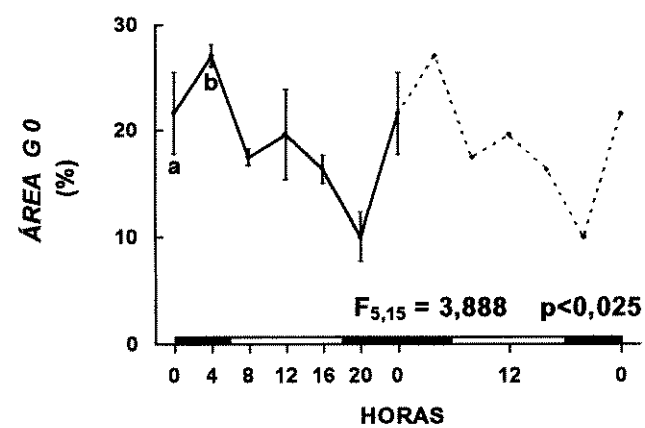
B



C



D



Em significativa correlação com esses resultados estão os valores de área $G 0$ ($r = 0,96$; $p < 0,0025$) (Fig. 12D), onde também se constata variação diária ($F_{5,15} = 3,888$; $p < 0,025$), com o valor máximo de área $G 0$ também ocorrendo às 4 h ($27,1 \pm 1,03\%$), e o mínimo às 20 h ($10,0 \pm 2,26\%$) ($p < 0,025$). Ao contrário do ocorrido com os resultados obtidos com ilhotas de ratos alimentados, não se registraram, aqui, correlações lineares entre os parâmetros apresentados nos gráficos A ou B e aqueles dos gráficos C ou D.

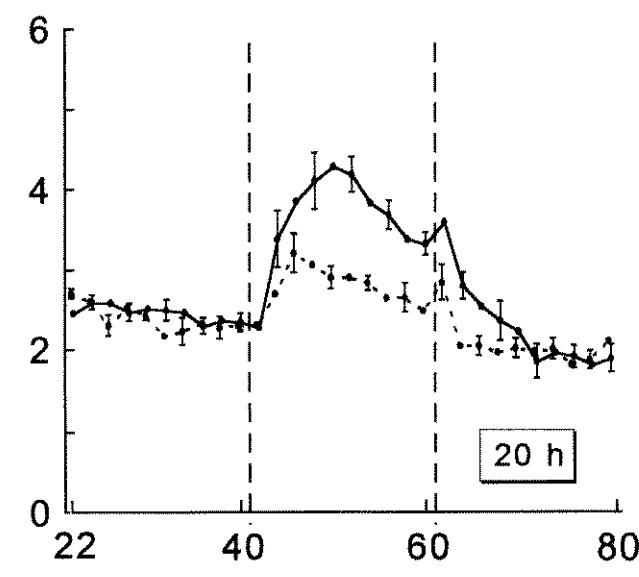
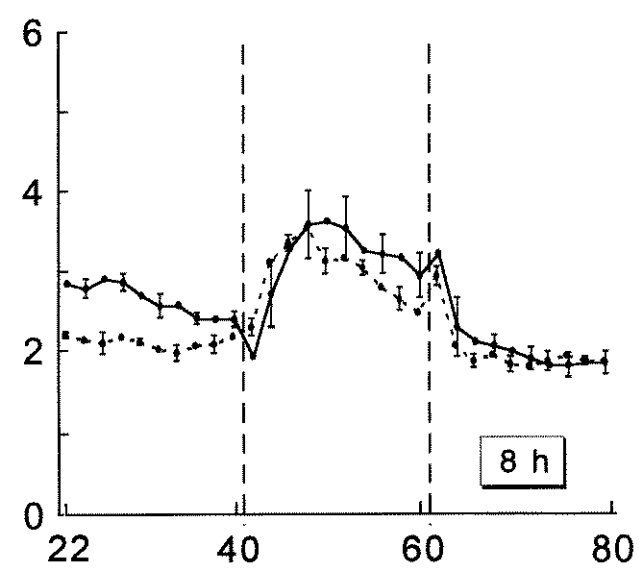
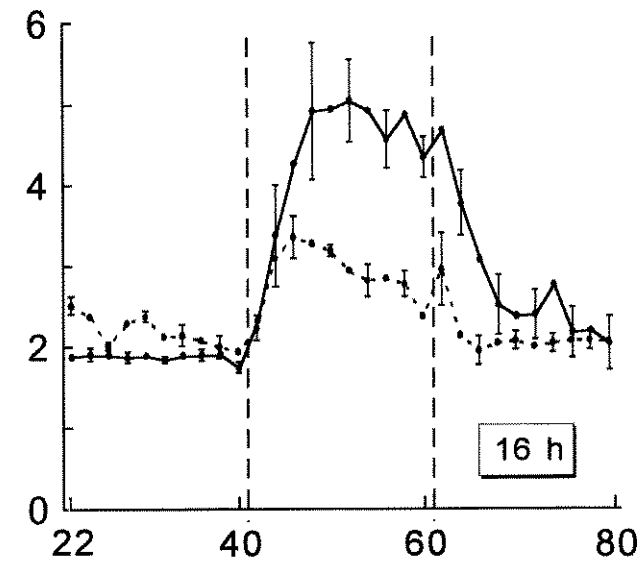
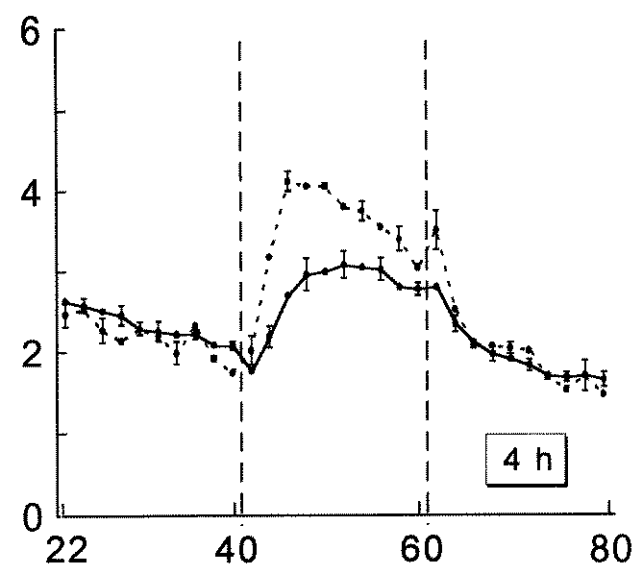
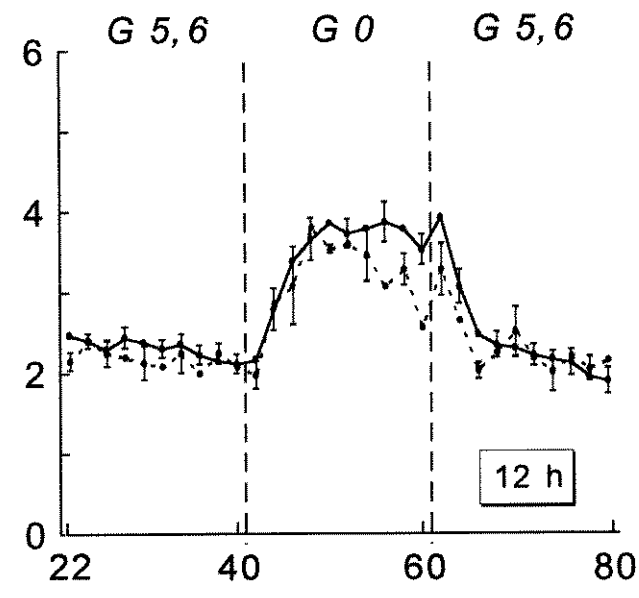
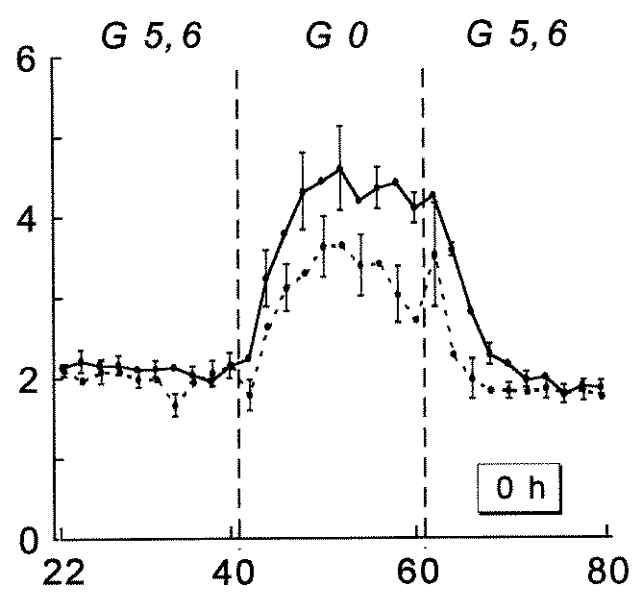
3.2.3. COMPARAÇÃO DE EFEITOS DA SUPRESSÃO DE GLICOSE SOBRE O EFLUXO DE ^{86}Rb , ENTRE RATOS ALIMENTADOS OU EM JEJUM

A figura 13 compara os efeitos da retirada de glicose, do meio de perfusão, sobre a taxa de efluxo de ^{86}Rb , entre ilhotas pancreáticas isoladas de ratos alimentados, ou submetidos a jejum durante 48 horas, conforme já apresentado nas figuras 9 e 11, respectivamente.

A figura 14, por sua vez, compara os parâmetros derivados da análise matemática dos gráficos da figura 13, da maneira já apresentada isoladamente nas figuras 10 e 12. A média diária da área $G 5,6$ foi $41,8 \pm 0,93\%$, no grupo de ratos alimentados, e $39,3 \pm 0,72\%$, no grupo em jejum ($p < 0,05$) (Fig. 14A). Contudo, os efeitos mais evidentes, decorrentes do jejum, foram a redução, tanto do $\Delta\%$ (Fig. 14C), quanto da área $G 0$ (Fig. 14D), na maioria dos horários estudados. Assim, o

Figura 13. Comparação entre os efeitos da supressão de glicose, do meio de perfusão, sobre o efluxo fracional de ^{86}Rb , de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos alimentados (—) ou submetidos a jejum durante 48 horas (- - -). As ilhotas foram, inicialmente, marcadas com esse isótopo (75 minutos), em presença de glicose (5,6 mM) e, a seguir, perfundidas durante 40 minutos por *Krebs* contendo igual concentração do secretagogo. As linhas tracejadas verticais sinalizam o instante de mudança da concentração de glicose, da solução. Os valores indicados são média ($\pm$ erro padrão) de dois a sete experimentos e foram extraídos das figuras 9 e 11.

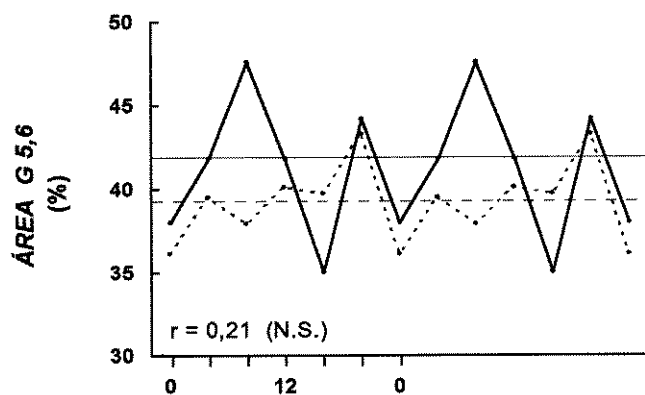
EFLUXO FRACIONAL DE ^{86}Rb (% por minuto)



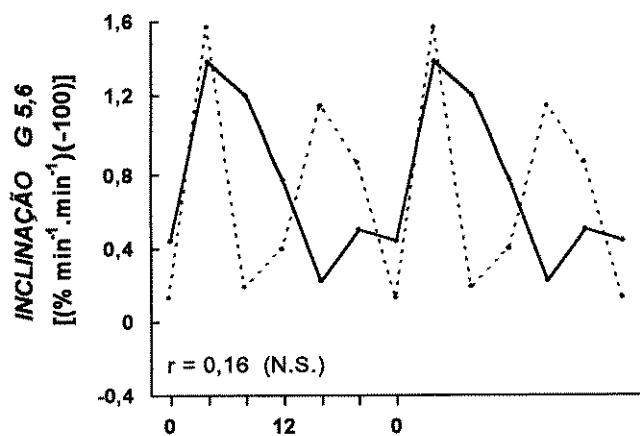
TEMPO (min)

Figura 14. Comparação entre a variação diária de diferentes parâmetros do efluxo fracional de ^{86}Rb , em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos alimentados (—) ou submetidos a jejum durante 48 horas (- - -) e perfundidas por *Krebs* contendo, ou não, glicose (5,6 mM). Os valores foram extraídos das figuras 10 e 12, respectivamente, onde também se encontram explicações sobre cada um dos parâmetros. Os erros padrões foram omitidos, para melhor visualização. As barras pretas, na parte inferior, indicam o período *escuro*.

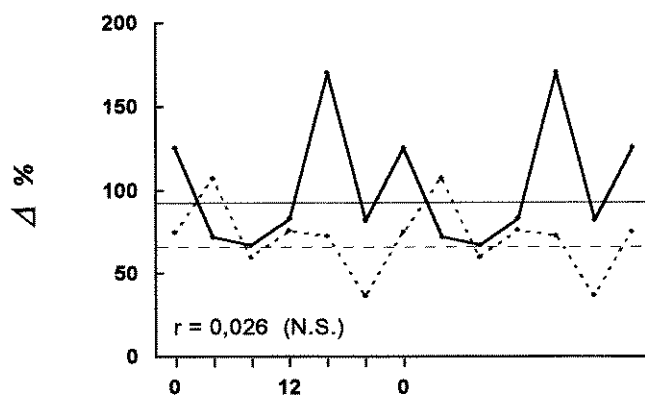
A



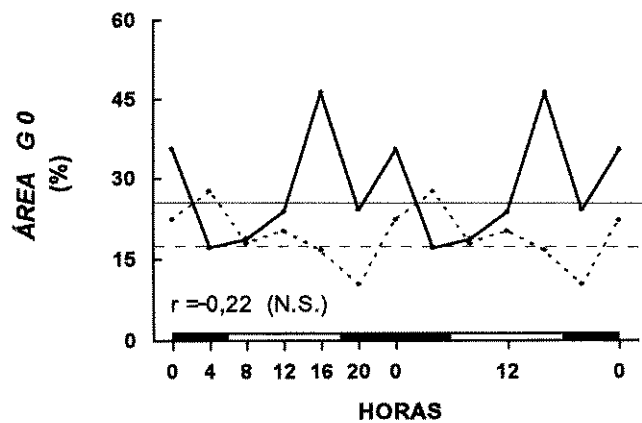
B



C



D

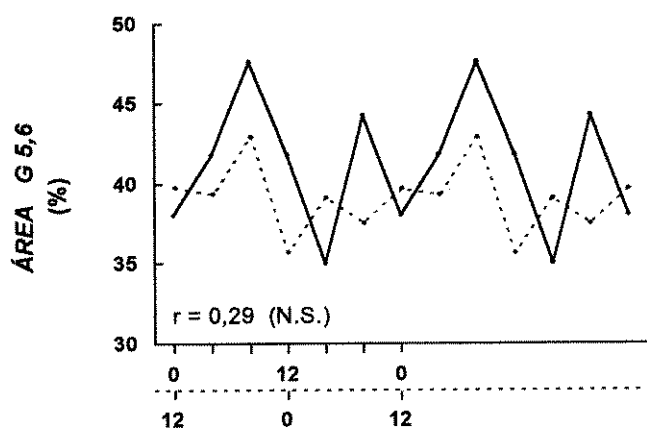


$\Delta\%$, que no grupo *alimentado* teve média $93,0 \pm 8,12\%$, no grupo *jejum* foi significativamente reduzido a $65,9 \pm 5,34\%$ ($p < 0,01$), o mesmo ocorrendo com a *área G 0*, que apresentou médias $25,6 \pm 2,35\%$ e $17,8 \pm 1,45\%$, respectivamente ($p < 0,01$). O jejum provocou, também, redução da amplitude aparente de variação da *área G 5,6*, calculada pela equação: $[(\text{valor máximo} \div \text{valor mínimo}) - 1] \times 50$. Desse modo, enquanto no grupo *alimentado* esse parâmetro apresentou valor igual a 18%, no grupo *jejum* o valor foi apenas 10%. Entretanto, não houve diferença da amplitude de variação da *área G 0*, entre os grupos *alimentado* e *jejum* (valores iguais a 85 e 86%, respect.). Finalmente, verifica-se que o jejum provocou aparente deslocamento de fase (ca. 12 horas) dos parâmetros $\Delta\%$ e *área G 0*, que indicam o efeito da supressão de glicose sobre o efluxo de ^{86}Rb (Fig. 15C e D).

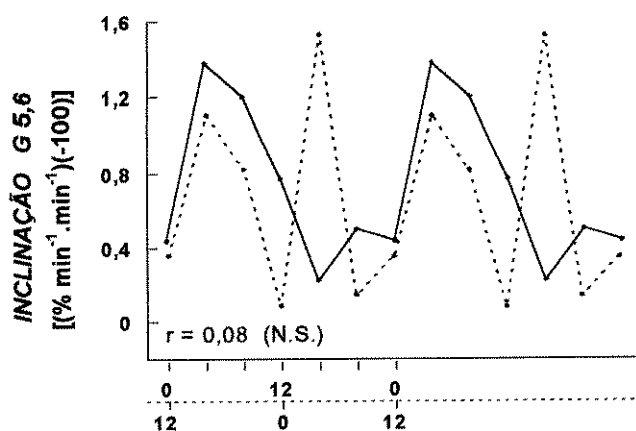
Não se constatarem correlações lineares, para cada um dos quatro parâmetros estudados, entre os valores obtidos nos dois grupos experimentais (*jejum vs. alimentado*). Assim, os valores de r variaram entre $-0,22$ e $0,21$. Entretanto, quando as figuras 10 e 12 foram sobrepostas, com defasagem de 12 horas entre as escalas de tempo (Fig. 15), evidenciaram-se correlações positivas entre os parâmetros $\Delta\%$ ($r = 0,84$; $p < 0,025$) e *área G 0* ($r = 0,81$; $p < 0,025$), na comparação *alimentados vs. jejum*. Os demais parâmetros não mostraram tal correlação ($r = 0,29$ e $r = 0,08$, para *área G 5,6* e *inclinação G 5,6*, respect.).

Figura 15. Variação diária de diferentes parâmetros do efluxo fracional de ^{86}Rb , em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos alimentados (—) ou submetidos a jejum, durante 48 horas, (- - -) e perfundidas por *Krebs* contendo, ou não, glicose (5,6 mM). Os valores foram extraídos das figuras 10 e 12, respectivamente, onde também encontram-se explicações sobre cada um dos parâmetros. As barras pretas, na parte inferior, indicam o período *escuro*. As escalas de tempo, representadas por linhas tracejadas, referem-se aos ratos mantidos em jejum, durante 48 horas, e foram deslocadas em 12 horas, para efeito de comparação.

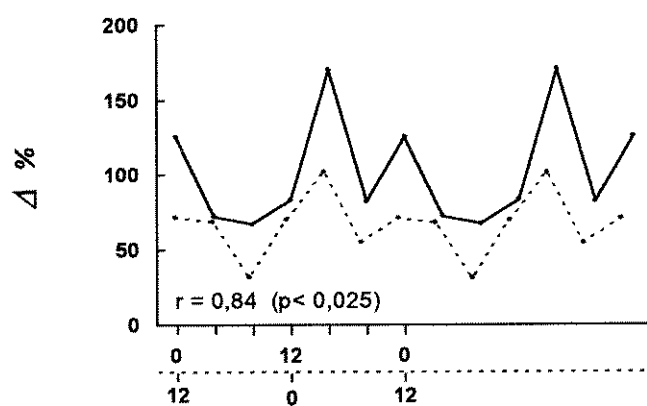
A



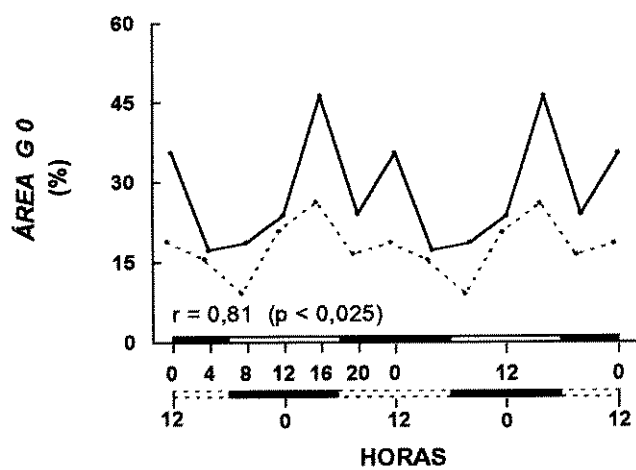
B



C



D



3.2.4. EFEITO DE GLICOSE (8,3 mM) SOBRE O EFLUXO DE ^{86}Rb , EM ILHOTAS DE RATOS ALIMENTADOS

A figura 16 mostra, em seis momentos do dia, o efluxo fracional médio de ^{86}Rb , de ilhotas perfundidas por Krebs contendo glicose (5,6 ou 8,3 mM). G 8,3 provocou redução do efluxo fracional de ^{86}Rb , nos diferentes horários. Este efeito é confirmado pelo incremento do efluxo após reintrodução de G 5,6. A análise matemática dos seis conjuntos de curvas de efluxo, com médias apresentadas nessa figura, resultou nos parâmetros, cujos cursos temporais são representados na figura 17.

O parâmetro *área* G 5,6 (Fig. 17A) não apresentou variação ao longo do dia ($F_{5,17} = 2,058$; N.S.).

A *inclinação* G 5,6 (Fig. 17B) apresentou variação diária ($F_{5,17} = 3,538$; $p < 0,025$), com valor mínimo à 0 h ($-0,00248 \pm 0,00263$) e máximo às 4 h ($-0,01196 \pm 0,00185\% \text{ min}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; $p < 0,025$).

O parâmetro $\Delta\%$ (redução percentual do efluxo de ^{86}Rb após incremento de glicose [de 5,6 para 8,3 mM] na solução de perfusão) mostrou variação temporal ($H = 15,014$; $p < 0,025$) (Fig. 17C), com valor máximo à 0 h ($25,5 \pm 3,86\%$) e declínio progressivo até às 12 h ($6,5 \pm 4,17\%$), seguido de crescimento até 0 h.

Finalmente, verificou-se efeito da hora do dia, sobre o parâmetro *área* G 8,3 (área integrada **sobre** a curva do efluxo fracional de ^{86}Rb entre o 42° e o 60° minuto de perfusão [com G 8,3]) ($F_{5,17} = 3,934$; $p < 0,025$) (Fig. 17D). Os valores

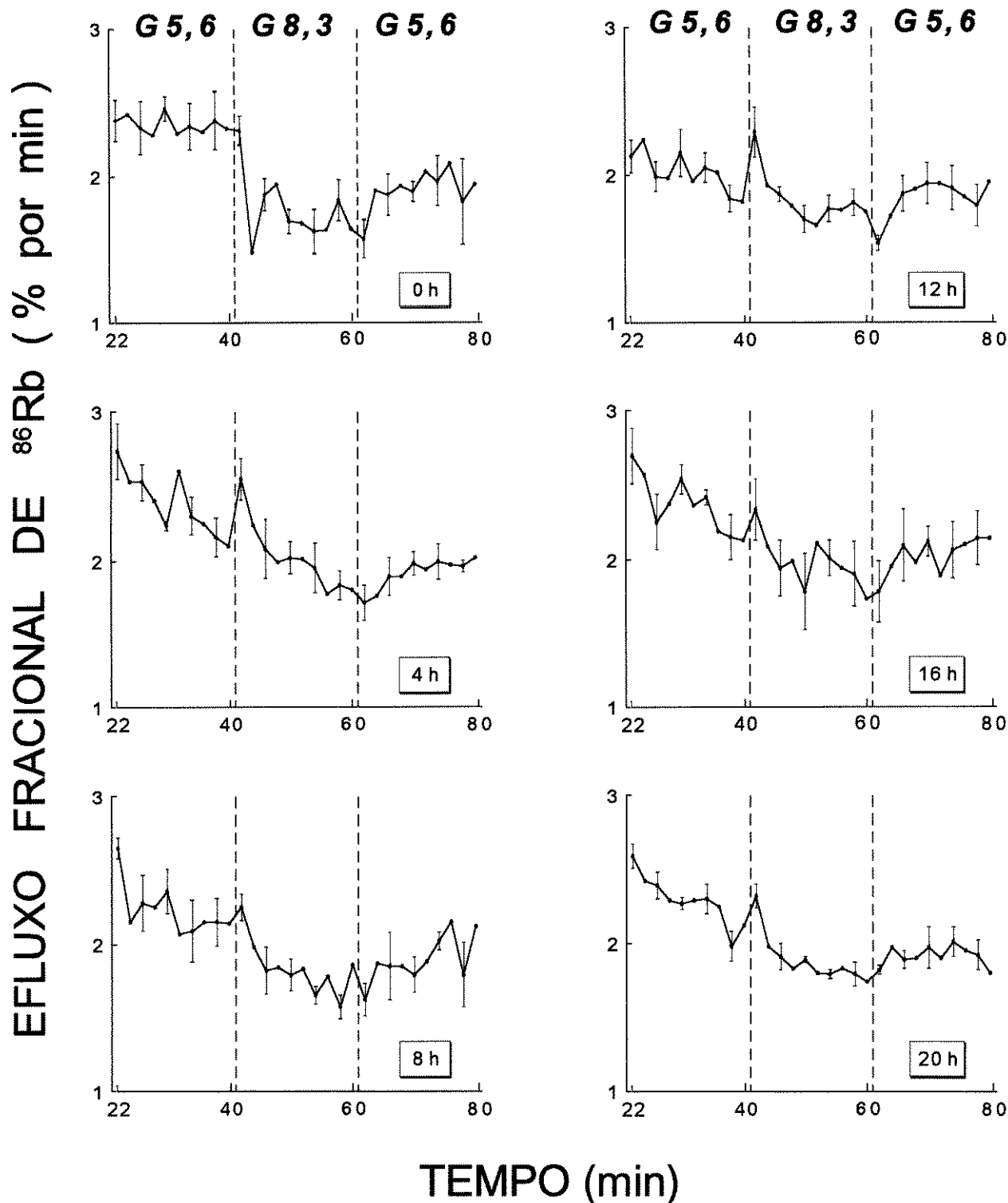
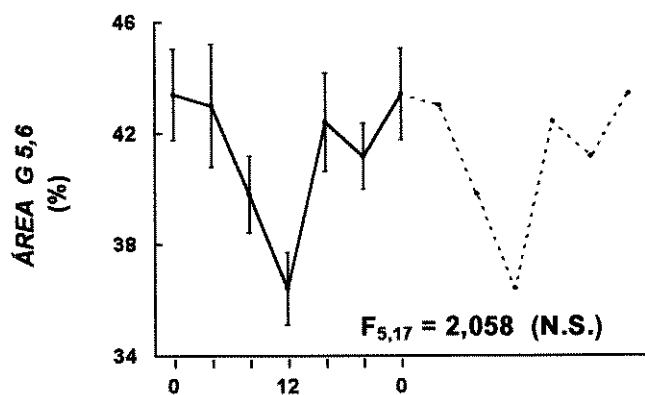


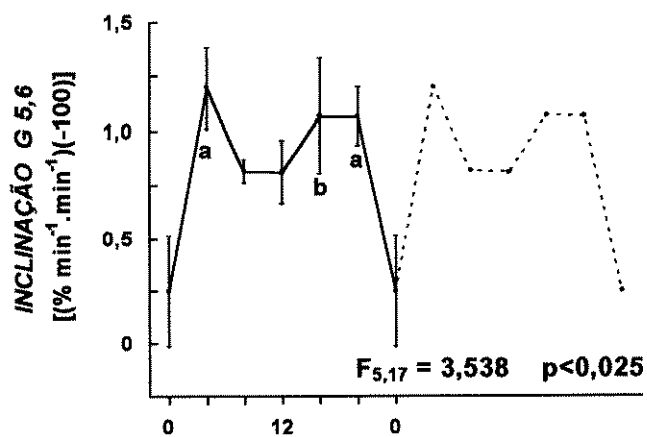
Figura 16. Efeito de glicose (8,3 mM) sobre o efluxo fracional de ^{86}Rb , em ilhotas pancreáticas de ratos adultos, alimentados *ad libitum*, nas seis horas do dia indicadas em cada gráfico (horário de sacrifício dos ratos). As ilhotas foram inicialmente marcadas com esse radioisótopo, durante 75 minutos, em presença de glicose (5,6 mM) e, a seguir, perfundidas durante 40 minutos por *Krebs* contendo igual concentração do secretagogo. O efluente foi coletado a cada dois minutos, a partir do 20º minuto. As linhas tracejadas verticais sinalizam o instante de mudança da concentração de glicose da solução. Os valores indicados são média ($\pm$ epm) de quatro experimentos, exceto às 16 h ($n = 3$).

Figura 17. Variação diária de diferentes parâmetros do efluxo fracional de ^{86}Rb , em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos alimentados e perfundidas por *Krebs* contendo glicose (5,6 ou 8,3 mM). As médias ($\pm$ epm) de cada parâmetro resultam da análise matemática da curva de efluxo de cada experimento. Os valores foram calculados a partir da figura 16, sendo $n = 4$ (exceto às 16 h [$n = 3$]). As barras inferiores, brancas ou pretas, indicam os períodos *claro* ou *escuro*, respectivamente. Os gráficos representam, para seis diferentes horas do dia: **(A) ÁREA G 5,6** é a área integrada **sob** a curva do efluxo fracional de ^{86}Rb , entre o 22° e o 40° minuto de perfusão (G 5,6), calculada tendo por base o valor zero da ordenada. **(B) INCLINAÇÃO G 5,6** é a inclinação da curva de regressão exponencial, dos valores do efluxo fracional de ^{86}Rb , entre o 22° e o 40° minuto de perfusão (G 5,6). a: $p < 0,025$ vs. 0 h; b: $p < 0,05$ vs. 0 h. **(C) $\Delta\%$** é a redução percentual do efluxo fracional de ^{86}Rb , após incremento de glicose (de 5,6 para 8,3 mM) na solução de perfusão, calculada pela equação: $[1 - (\text{efluxo médio do } 56^\circ \text{ ao } 60^\circ \text{ min} \div \text{efluxo médio do } 36^\circ \text{ ao } 40^\circ \text{ min})] \times 100$. b: $p < 0,05$ vs. 0 h. **(D) ÁREA G 8,3** é a área integrada **sobre** a curva do efluxo fracional de ^{86}Rb , entre o 42° e o 60° minuto de perfusão (G 8,3), calculada tendo por limite superior a projeção (nesse período) da regressão exponencial dos valores do efluxo, entre o 22° e o 40° minuto. a: $p < 0,025$ vs. 0 h; b: $p < 0,05$ vs. 0 h.

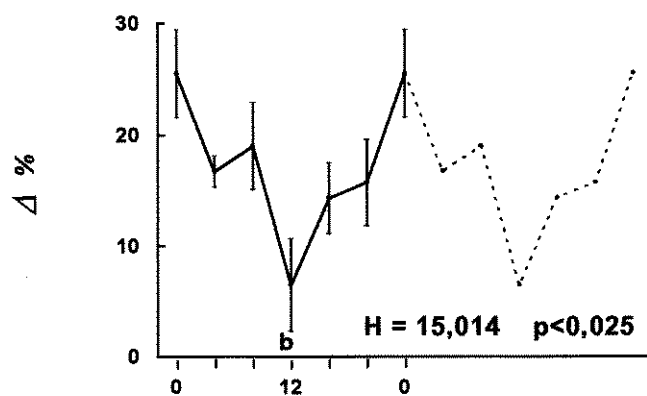
A



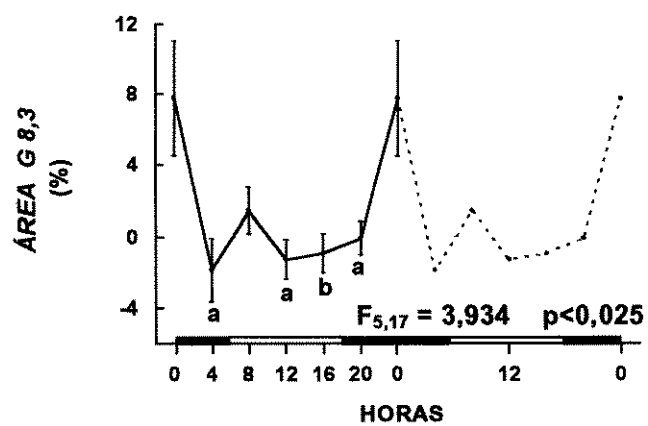
B



C



D



desse parâmetro apresentaram correlação linear positiva com aqueles de $\Delta\%$ ($r = 0,80$; $p < 0,05$), também mostrando-se máximos à 0 h ($7,78 \pm 3,262\%$) e mínimos às 4 h ($-1,87 \pm 1,800\%$) ($p < 0,025$).

3.3. CORRELAÇÃO ENTRE O EFLUXO DE ^{86}Rb E A SECREÇÃO DE INSULINA

A figura 18 mostra a correlação entre os valores de insulina secretada em G 8,3 e a variação percentual (redução) do efluxo fracional de ^{86}Rb , após aumento da concentração de glicose (de 5,6 para 8,3 mM) ($\Delta\%$). Os valores foram extraídos das figuras 2 e 17C, respectivamente. À 0 h foram máximos, tanto o valor de secreção ($8,6 \pm 0,90$ ng/ilhota por 60 min), quanto $\Delta\%$ ($25,5 \pm 3,86\%$). Os valores mínimos de secreção, ocorridos às 12 e 16 h ($5,3 \pm 0,60$ e $5,1 \pm 0,80$ ng/ilhota. respect.), tiveram correspondentes valores mínimos de $\Delta\%$ ($6,5 \pm 4,17$ e $14,3 \pm 3,18\%$, respect.). O valor de r entre as duas variáveis foi 0,77 ($p < 0,05$).

A figura 19 mostra a correlação entre os valores de insulina secretada em G 8,3 e aqueles de área G 8,3 (dados extraídos das figuras 2 e 17D). Ambos foram máximos à 0 h ($8,6 \pm 0,90$ ng/ilhota por 60 min e $7,8 \pm 3,26\%$, respect.). Os valores mínimos de secreção ocorreram às 8, 12 e 16 h ($5,7 \pm 0,85$; $5,3 \pm 0,60$ e $5,1 \pm 0,80$ ng/ilhota por 60 min, respect.), enquanto as menores áreas foram obtidas às 4, 12 e 16 h ($-1,87 \pm 1,800\%$; $-1,26 \pm 1,118\%$ e $-0,91 \pm 1,105\%$, respect.) O coeficiente de correlação linear entre as duas variáveis foi 0,76 ($p < 0,05$).

G 8,3

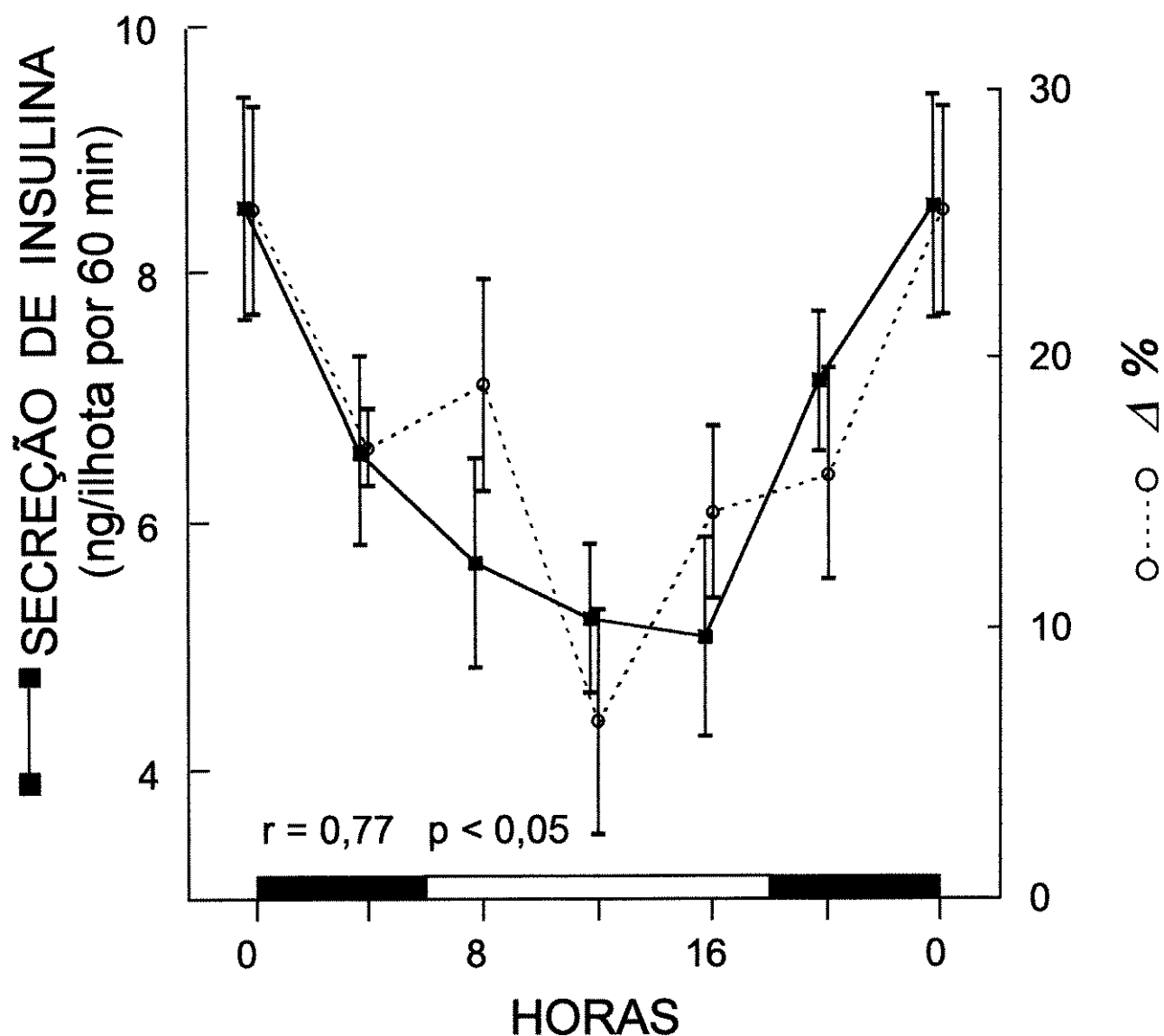


Figura 18. Correlação temporal entre a secreção de insulina estimulada por glicose (8,3 mM) (G 8,3) e a redução percentual do efluxo de ^{86}Rb após o aumento de glicose (de 5,6 para 8,3 mM) na solução de perfusão ($\Delta\%$). As secreções de insulina promovidas por ilhotas incubadas (grupos de cinco) durante 60 minutos, em G 8,3, em diferentes horas do dia, foram indicadas juntas com os valores de $\Delta\%$ provocados pela mesma concentração de glicose, em experimentos separados. O $\Delta\%$ foi calculado pela equação: $[1 - (\text{efluxo médio do } 56^{\circ} \text{ ao } 60^{\circ} \text{ min} : \text{efluxo médio do } 36^{\circ} \text{ ao } 40^{\circ} \text{ min}) \times 100]$. Os dados para secreção de insulina e $\Delta\%$ foram extraídos das figuras 2 e 17C, respectivamente. Os valores representam a média ($\pm$ epm) de 11 a 22 observações para a secreção de insulina e de quatro experimentos para $\Delta\%$ (exceto às 16 h, $[n=3]$). As barras pretas, na parte inferior, indicam o período *escuro*.

G 8,3

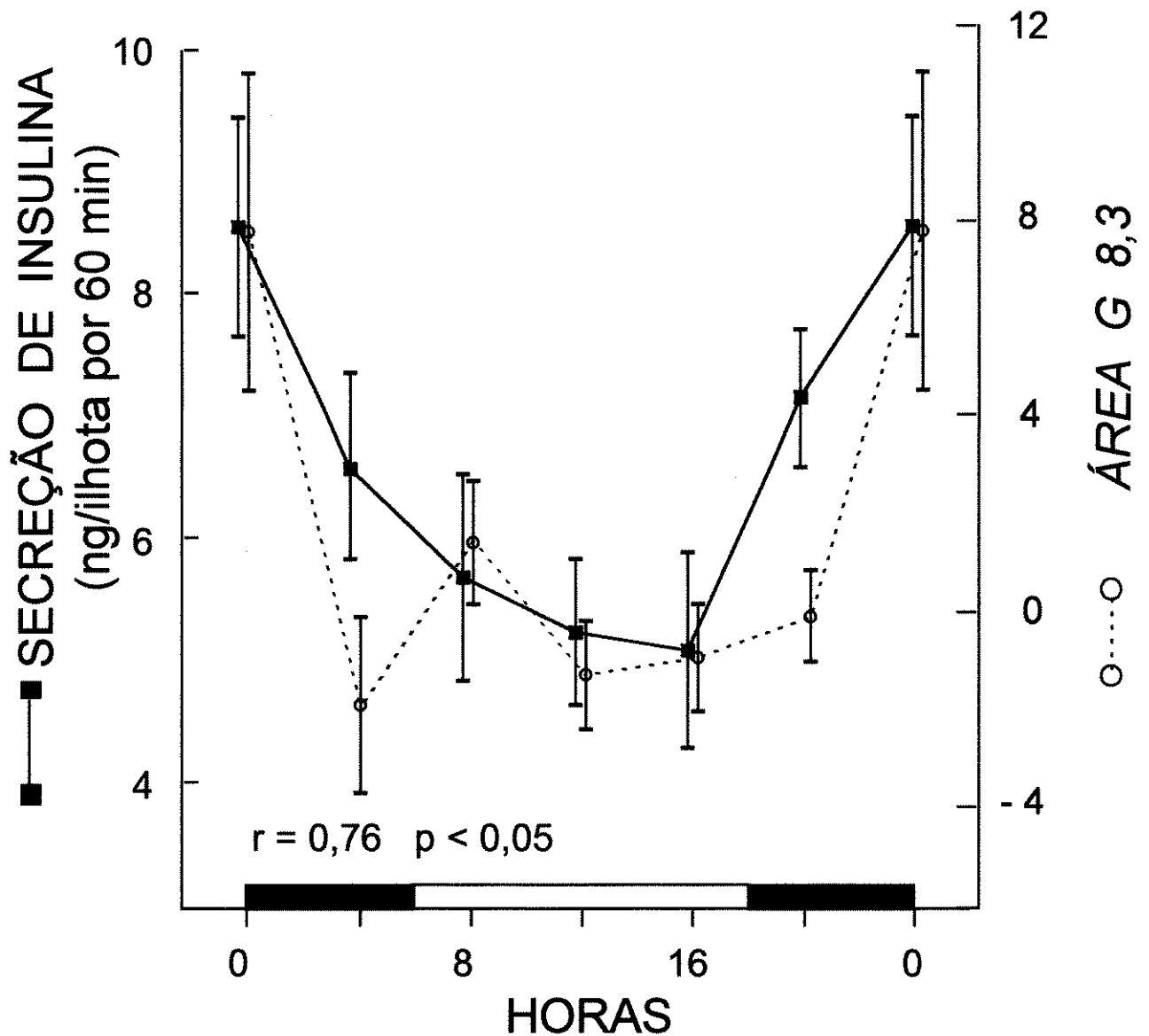


Figura 19. Correlação temporal entre a secreção de insulina estimulada por glicose (8,3 mM) (G 8,3) e a área **sobre** a curva de efluxo de ^{86}Rb após o aumento de glicose (de 5,6 para 8,3 mM) na solução de perfusão (área G 8,3). As secreções de insulina promovidas por ilhotas incubadas (grupos de cinco) durante 60 minutos, em G 8,3, em diferentes horas do dia, foram indicadas juntas com os valores de área G 8,3 decorrentes do efeito dessa concentração do secretagogo, em experimentos separados. Os dados para a secreção de insulina e área G 8,3 foram extraídos das figuras 2 e 17D, respectivamente. Os valores representam a média ($\pm$ epm) de 11 a 22 observações para a secreção de insulina e de quatro experimentos para área G 8,3 (exceto às 16 h [$n=3$]). As barras pretas, na parte inferior, indicam o período *escuro*.

3.4. EFEITO DE GLICOSE (16,7 mM) SOBRE O EFLUXO DE ^{45}Ca , EM ILHOTAS DE RATOS ALIMENTADOS

A figura 20 mostra, para seis horas do dia, o efeito do aumento da concentração de glicose, na solução de perfusão, de zero para 16,7 mM, sobre a taxa de efluxo de ^{45}Ca , em ilhotas isoladas de ratos alimentados e previamente carregadas desse radioisótopo. As ilhotas foram perfundidas por *Krebs* desprovido de glicose, durante 44 minutos, passando a ser estimuladas por glicose (16,7 mM) durante os 26 minutos adicionais. Glicose (16,7 mM) provocou, após dois a quatro minutos, inibição transitória do efluxo fracional de ^{45}Ca , seguida de aumento prolongado desse efluxo. A influência da hora do dia, sobre a taxa de efluxo de ^{45}Ca , foi determinada pela análise matemática da curva de efluxo fracional de cada experimento e pela definição dos quatro parâmetros mostrados na figura 21. O pico de efluxo, ocorrido cerca de um minuto após a inclusão de glicose no líquido de perfusão, foi considerado artefato e excluído dos cálculos.

O valor máximo do parâmetro *área G 0* (área integrada sob a curva do efluxo fracional de ^{45}Ca , entre o 31° e o 44° minuto de perfusão com *G 0*) (Fig. 21A) ocorreu às 4 h ($16,7 \pm 0,77\%$), caindo abruptamente para atingir o mínimo às 8 h ($11,5 \pm 0,87\%$). No período entre as 8 e as 4 h, os valores de *área G 0* aumentaram gradativamente. Embora a ANOVA não tenha apontado variação significativa, o valor de *F* obtido (2,506) aproximou-se do *F* crítico (2,74). Igualmente, o pós-teste (Student-Newman-Keuls) apresentou valores de *q*, para as comparações 4 vs. 8h e 4 vs. 12 h, muito próximos dos valores críticos (4,32 vs. 4,47, no primeiro caso e

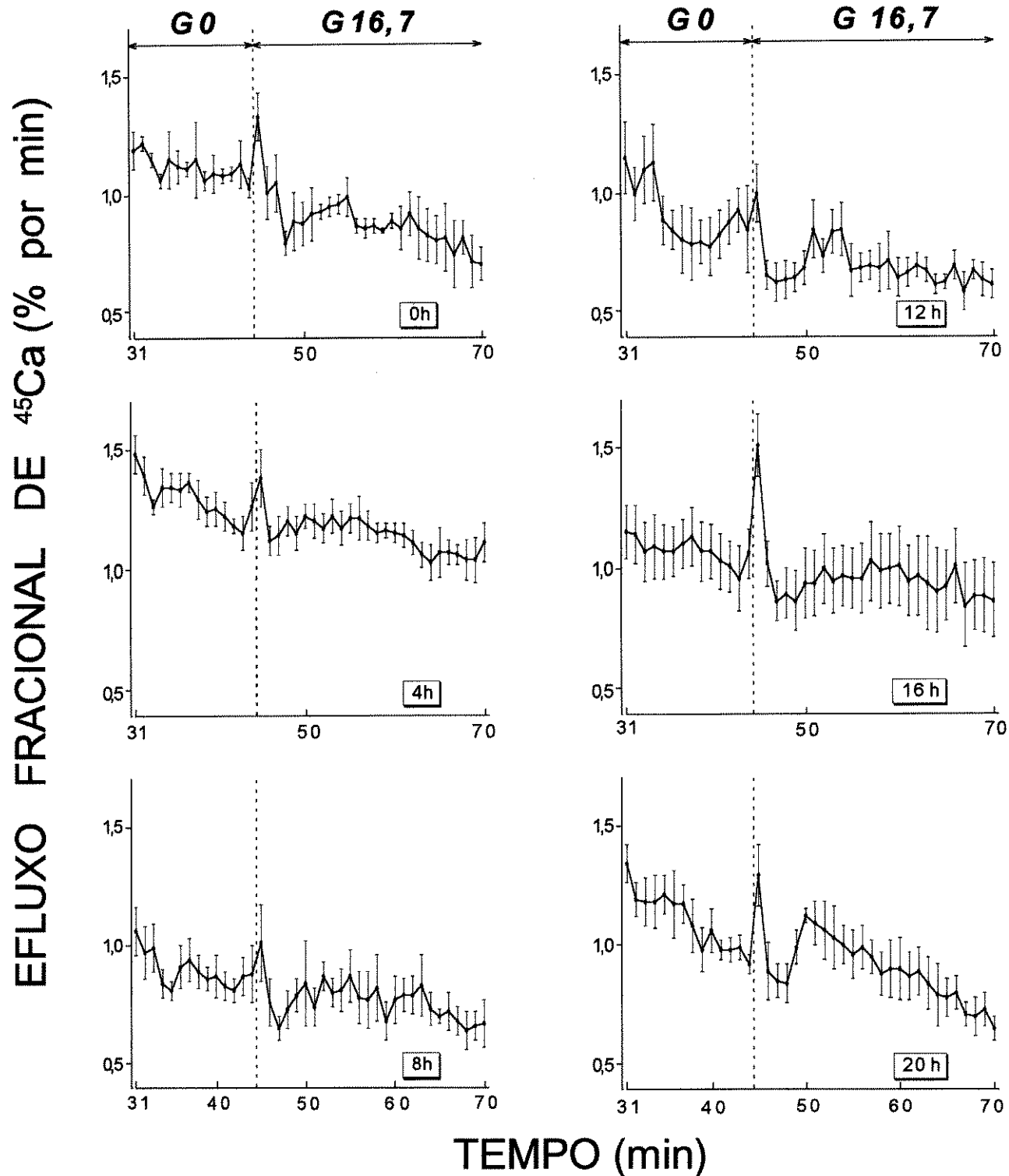
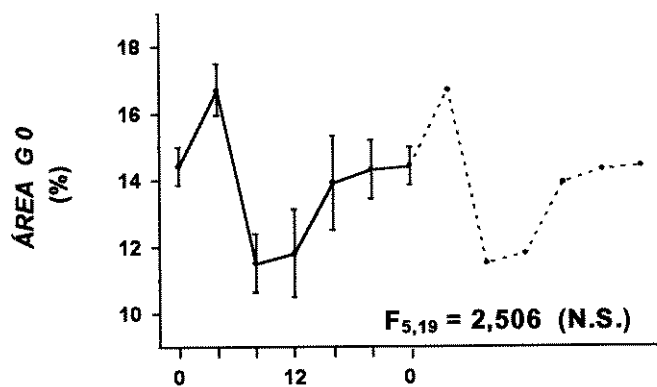


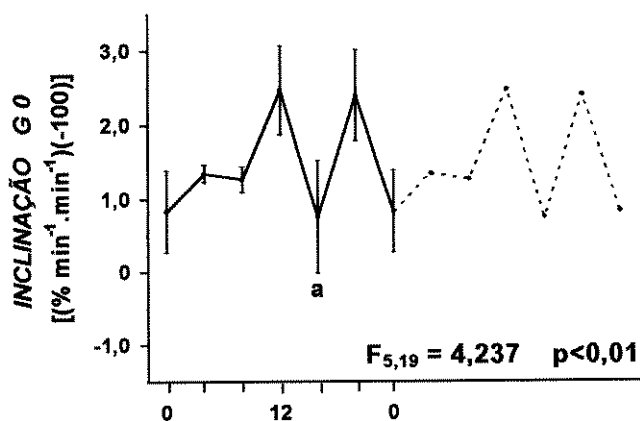
Figura 20. Efeito de glicose (16,7 mM) sobre o efluxo fracional de ^{45}Ca , em ilhotas pancreáticas de ratos adultos (alimentados), nas seis horas do dia indicadas em cada gráfico (hora de sacrifício dos ratos). As ilhotas foram inicialmente marcadas com o radioisótopo, durante 90 minutos, em presença de glicose (16,7 mM) e, em seguida, perfundidas durante 44 minutos por *Krebs* (contendo ^{40}Ca [1 mM]), desprovido de glicose. O efluente foi coletado a cada minuto, a partir do 30º minuto. As linhas tracejadas verticais sinalizam o instante de mudança da concentração de glicose da solução (44º minuto). Os valores indicados representam a média ($\pm$ epm) de quatro experimentos em cada horário (4, 8, 12 e 20 h) e de três e seis experimentos (0 e 16h, respectivamente).

Figura 21. Variação diária de diferentes parâmetros do efluxo fracional de ^{45}Ca , em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos alimentados e perfundidas por *Krebs* contendo, ou não, glicose (16,7 mM). Em cada horário, os valores (média $\pm$ epm) de cada parâmetro foram calculados a partir dos dados das curvas de efluxo individuais. A média destas curvas é apresentada na figura 20, com $n = 4$ (4, 8, 12 e 20 h) e $n = 3$ ou 6 (0 e 16 h, respect.). As barras pretas, na parte inferior, indicam o período escuro. Os gráficos representam, para seis diferentes horas do dia: **(A) ÁREA G 0** é a área integrada **sob** a curva do efluxo fracional de ^{45}Ca , entre o 31° e o 44° minuto de perfusão (G 0), calculada tendo por base o valor zero da ordenada. **(B) INCLINAÇÃO G 0** é a inclinação da curva de regressão exponencial, dos valores do efluxo fracional de ^{45}Ca , entre o 31° e o 44° minuto. a: $p < 0.025$ vs. 12 e 20 h. **(C). $\Delta\%$** é a redução percentual do efluxo fracional de ^{45}Ca , após incremento da concentração de glicose (de zero para 16,7 mM), no meio de perfusão, calculada pela equação: $[1 - (\text{efluxo médio do } 46^\circ \text{ ao } 49^\circ \text{ min} \div \text{efluxo médio do } 40^\circ \text{ ao } 44^\circ \text{ min})] \times 100$. **(D) ÁREA G 16,7** é a área integrada **sob** a curva do efluxo fracional de ^{45}Ca , do 46° ao 58° minuto de perfusão, calculada tendo por limite inferior a projeção (nesse período) da regressão exponencial dos valores de efluxo, entre o 31° e o 44° minuto. a: $p < 0,005$ vs. 20 h.

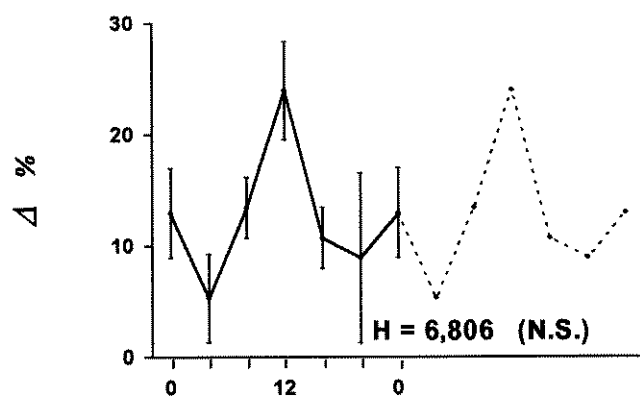
A



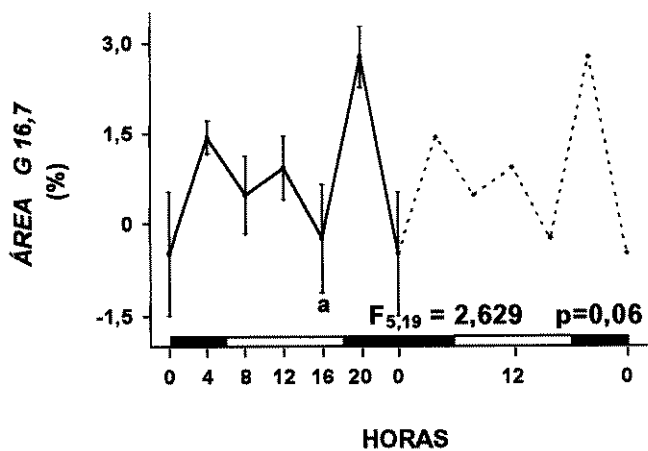
B



C



D



4,07 vs. 4,25, no segundo. Por outro lado, a média das áreas do período *escuro* ($15,2 \pm 0,55\%$) foi maior que aquela obtida para o período *claro* ($12,6 \pm 0,77\%$) ($p < 0,01$).

A inclinação $G 0$ (inclinação da curva de regressão exponencial dos valores do efluxo fracional de ^{45}Ca , entre o 31° e o 44° minuto de perfusão com $G 0$) (Fig. 21B) apresentou variação diária ($F_{5,19} = 4,237$; $p < 0,01$). Assim, a inclinação média da regressão exponencial das curvas de efluxo, no período de ausência de glicose (31° ao 44° min), variou do mínimo $-0,0075 \pm 0,00773$ às 16 h, aos máximos $-0,0247 \pm 0,00597$ às 12 h e $-0,0240 \pm 0,00608$, às 20 h ($p < 0,025$ para ambas as comparações). Não houve, entretanto, diferença entre as inclinações médias dos períodos *claro* e *escuro* ($-0,0139 \pm 0,00286$ vs. $-0,0159 \pm 0,00266$).

Conquanto $\Delta\%$ (redução percentual do efluxo fracional de ^{45}Ca , após introdução de glicose [16,7 mM] na solução perfusora) (Fig. 21C) tenha apresentado valor mínimo às 4 h ($5,28 \pm 4,001\%$) e máximo às 12 h ($23,92 \pm 4,403\%$), a ANOVA não-paramétrica revelou a inexistência de diferenças significativas entre os diferentes horários ($H = 6,806$). Não obstante, enquanto no período *escuro* a média desse parâmetro foi $8,67 \pm 3,142\%$, no período *claro* atingiu $15,25 \pm 2,328\%$ ($p = 0,05$).

Finalmente, o parâmetro área $G 16,7$ (Fig. 21D) (área integrada sob a curva do efluxo fracional de ^{45}Ca , entre o 46° e o 58° minuto de perfusão [com $G 16,7$]) apresentou variação diária, revelada pelo pós-teste, que mostrou diferença entre a média das 16 h, quando se registrou a segunda menor área ($-0,23 \pm 0,885\%$), e aquela das 20 h, momento de área máxima ($2,77 \pm 0,504\%$) ($p < 0,05$). A análise conjunta (períodos *claro* e *escuro*) não mostrou diferença significativa entre

áreas G 16,7. Assim, as médias desse parâmetro foram $1,39 \pm 0,507$ e $0,30 \pm 0,439\%$, nos períodos *escuro* e *claro*, respectivamente.

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

4.1. SECREÇÃO DE INSULINA

Nosso trabalho parte da hipótese de que, se a secreção de insulina por ilhotas de Langerhans isoladas sofre variação ao longo do dia, então os rearranjos dos fluxos de potássio e cálcio, nas células beta, também estão sujeitos a essa variação, uma vez que essa remodelação iônica constitui etapa crucial da secreção.

Os presentes resultados (Figs. 2 a 8) confirmam, em ilhotas isoladas de rato, observações anteriores de que a secreção de insulina e/ou a insulinemia sofrem variação diária, tanto *in vitro* (GAGLIARDINO & HERNÁNDEZ, 1972⁸⁷), quanto *in vivo*, em humanos (LAMBERT & HOET, 1965¹⁴⁸; FREINKEL, MAGER & VINNICK, 1968⁸⁵; RIGAS et al, 1968²¹⁹; MALHERBE et al, 1969¹⁸⁰; SENSI et al, 1971²³⁴; BARTER, CARROLL & NESTEL, 1971¹⁹; BAKER & JARRETT, 1972¹⁸; CAPANI et al, 1972⁴³; JARRETT et al, 1972¹³⁸; CARROLL & NESTEL, 1973⁴⁹; SENSI et al, 1973²³³; APARICIO et al, 1974⁷; HAUTECOUVERTURE et al, 1974¹⁰⁸; JARRETT, 1974¹³⁴; WHICHELOW et al, 1974²⁷⁷; ZIMMET et al, 1974²⁸⁷; GOETZ et al, 1976⁹⁴; LEWIS et al, 1976¹⁶³; MELANI et al, 1976¹⁹¹; WOJTCZAK-JAROSZOWA, 1977²⁷⁸; COSCELLI, ALPI & BUTTURINI, 1978⁶⁵; SERVICE et al, 1983²³⁵; GAGLIARDINO, HERNÁNDEZ & REBOLLEDO, 1984⁸⁸; VERRILLO, DE TERESA &

RUCCO, 1984²⁶⁸; KOFINAS, MEIS & ROSE, 1988¹⁴⁴; MÉJEAN et al, 1988¹⁹⁰; POLONSKY, GIVEN & VAN CAUTER, 1988²⁰⁷; LEE, BRAY & KLETZKY, 1991¹⁵⁴; VAN CAUTER et al, 1991²⁶⁶; LEE et al, 1992¹⁵⁵; VAN CAUTER et al, 1992²⁶⁴), roedores (GAGLIARDINO & HERNÁNDEZ, 1971⁸⁶; PESSACQ, REBOLLEDO & GAGLIARDINO, 1972²⁰³; JOLIN & MONTES, 1973¹⁴⁰; BELLINGER, MENDEL & MOBERG, 1975²²; POLAK et al, 1975²⁰⁶; PESSACQ et al, 1976²⁰⁴; ZUCKER, RUSAK & KING Jr, 1976²⁸⁸; LOUIS-SYLVESTRE, 1978¹⁶⁶; MARTIN, WANGSNESS & GAHAGAN, 1978¹⁸³; HARA & SAITO, 1980¹⁰⁵; TIEDGEN & SEITZ, 1980²⁵⁵; LIMA et al, 1981¹⁶⁴; MLEKUSCH et al, 1981¹⁹⁵; LARUE-ACHAGIOTIS & LE MAGNEN, 1983¹⁵²; IKONOMOV et al, 1985¹³⁰; AHLERSOVÁ, AHLERS & TOROPILA, 1986²; DE SOUZA & MEIER, 1987⁶⁸; YAMAMOTO, NAGAI & NAKAGAWA, 1987²⁸⁴; WATANABE & UCHIYAMA, 1988²⁷²; LESAULT, ELCHINGER & DESBALS, 1991¹⁵⁹; IWASHITA et al, 1996¹³²), ovinos (HOLLEY & EVANS, 1974¹²⁵), cães (FISCHER et al, 1985⁸³) e aves (TEDFORD & MEIER, 1993²⁵³).

Nossos resultados também confirmam que a resposta da célula beta a um estímulo particular parece, em parte, ser dependente da hora do dia em que o mesmo é aplicado (BYRNE et al, 1996⁴¹).

Mostram, igualmente, que na faixa fisiológica de concentrações, as curvas dose-resposta a glicose, obtidas no período *escuro*, tendem a situar-se à esquerda daquelas do período *claro* (Figs. 2 a 5). Ao contrário da observação de GAGLIARDINO & HERNÁNDEZ (1972⁸⁷), em fragmentos de pâncreas de camundongo, não verificamos efeito da hora do dia sobre a secreção de insulina, em *G 0* ou *G 2,8* (Figs. 2 a 5). Embora esses autores tenham constatado variação

circadiana da secreção estimulada por glicose (3,3 mM), a solução que utilizaram fora enriquecida com piruvato, glutamato e fumarato (ca. 5 mM, no total), os quais potencializam a secreção de insulina (COORE & RANDLE, 1964⁶²).

Glicose (5,6 mM) foi suficiente para provocar secreção suprabasal apenas às 20 h (Fig. 4), o que sugere maior sensibilidade das células beta a esse estímulo, nesse horário. Neste particular, há concordância com GAGLIARDINO & HERNÁNDEZ (1972⁸⁷), que usando glicose (3,3 mM) como estimulante (acrescida dos nutrientes acima citados), obtiveram máxima secreção às 20 h. Por outro lado, na média dos experimentos do período *escuro*, a secreção em G 5,6 também superou aquela verificada em G 0, o que, para o período *claro*, só ocorreu com G 8,3 (Fig. 5). HARA & SAITO (1980¹⁰⁵), variando o horário de alimentação de ratos, constataram, no GTT oral, maior resposta insulínica, associada ao período de ingestão alimentar. Diante disso, defenderam a idéia de que a sensibilidade das células beta, a glicose, é maior durante esse período. Vale mencionar que a ingestão alimentar pelo rato, em condições normais, ocorre de 70 a 86% no período de ausência de luz (SMAJDA, JALC & AHLERS, 1982²⁴¹; IKONOMOV et al, 1985¹³⁰). Reforçando o entendimento acima, APARICIO et al (1974⁷), COSCELLI, ALPI & BUTTURINI (1978⁶⁵), LEE et al (1992¹⁵⁵) e VAN CAUTER et al (1992²⁶⁴) atribuíram a menor tolerância a carboidratos, verificada em humanos, nos períodos da tarde e noite, à variação circadiana da sensibilidade e/ou da responsividade das células beta pancreáticas a glicose. Diante disso, nossos resultados são compatíveis com a proposição de maior responsividade das células beta de rato, a glicose, à 0 h, e mínima responsividade às 8 h. Assim, comparando as curvas dose-resposta a glicose (Fig. 8 e Tabela 1), verificamos que aquela referente à 0 h está

acentuadamente deslocada à esquerda da curva das 8 h, as quais apresentam valores de EC_{50} iguais a 7,8 e 12,4, respectivamente.

O efeito da hora do dia, sobre a secreção de insulina, manifestou-se especialmente em G 5,6 e G 8,3, portanto, concentrações fisiológicas ou próximas delas. De maneira geral, incremento da glicose extracelular (de 5,6 para 8,3 mM) provocou maior aumento da secreção nos experimentos do período *escuro* (Figs. 2 a 5 e Fig. 8). Assim, a secreção obtida com G 8,3, no período *escuro*, foi equivalente àquela obtida com G 11,1, no período *claro* (Fig. 5). Embora os valores de EC_{50} , às 12 e 16 h, tenham sido menores que os valores das 4 e 20 h, pode-se constatar que, na faixa fisiológica das concentrações de glicose, a secreção de insulina naqueles horários foi inferior à secreção verificada na ausência de luz (Fig. 8). Por outro lado, foi precisamente às 12 h que se detectou a menor intensidade da ação de glicose (8,3 mM), ao reduzir a taxa do efluxo de ^{86}Rb (Figs. 18 e 19), o que é consistente com os resultados da secreção de insulina por nós obtidos e concordante com os autores que constataram, em rato, insulinemia mínima entre 12 e 14 h (BELLINGER, MENDEL & MOBERG, 1975²²; MARTIN, WANGSNESS & GAHAGAN, 1978¹⁸³; TIEDGEN & SEITZ, 1980²⁵⁵). Por outro lado, o posicionamento à direita, das curvas do período *claro* (Figs. 2 a 5), somado à elevação do limiar secretório perante glicose (Figs. 4 e 5), são indicativos de sensibilidade diminuída da célula beta, a esse estímulo, nesse período.

Notável, entretanto, foi a constatação de que nossos resultados de secreção à 0 h, em G 8,3, são diametralmente opostos aos obtidos por GAGLIARDINO & HERNÁNDEZ (1972⁸⁷), em fragmentos isolados de pâncreas de

camundongo, os quais, nesse horário, constataram um mínimo efeito de glicose (16,7 mM). Três aspectos poderiam ser lembrados, como tentativa de explicar essa discrepância: (1) espécies utilizadas; (2) período de incubação, uma vez que o tempo de 20 minutos, por eles fixado ressalta a participação da primeira fase da secreção de insulina e (3) tipos de preparações.

Assumindo que os valores da insulinemia reflitam estreitamente a intensidade de secreção das células beta, verificamos que nossos resultados, em G 5,6 e G 8,3, são consistentes com os apresentados por diversos grupos de pesquisadores, que verificaram, em rato, valores mínimos da insulinemia no período de luz e máximos durante o período de atividade dessa espécie (BELLINGER, MENDEL & MOBERG, 1975²²; TIEDGEN & SEITZ, 1980²⁵⁵; MARTIN, WANGSNESS & GAHAGAN, 1978¹⁸³; MLEKUSCH et al, 1981¹⁹⁵; LARUE-ACHAGIOTS & LE MAGNEN, 1983¹⁵²; IKONOMOV et al, 1985¹³⁰; YAMAMOTO, NAGAI & NAKAGAWA, 1987²⁸⁴). Nossos resultados também concordam com aqueles obtidos em camundongo, por PESSACQ et al (1976²⁰³), que registraram valores mínimos e máximos da insulinemia durante os períodos de luz e *escuro*, respectivamente. Concordam, em parte, com LIMA et al (1981¹⁸⁴) e AHLERSOVÁ, AHLERS & TOROPILA (1986²), que observaram, em rato, máximas insulinemias entre 20 e 2 h. Não obstante, esses dois grupos de pesquisadores obtiveram valores mínimos da insulinemia ao final do período de atividade do rato, o que contraria nossas observações. Igualmente, nossos resultados concordam parcialmente com GAGLIARDINO & HERNÁNDEZ (1971⁸⁶), que registraram, em camundongo, insulinemia mínima entre 0 e 8 h e máxima às 16 e 20 h. Por outro lado, há grande discordância com resultados de GAGLIARDINO & HERNÁNDEZ (1972⁸⁷), que

constatarem, em camundongo, insulinemias máximas no período entre 12 e 20 h, e mínimas entre 0 e 8 h. Discordam frontalmente dos nossos, e do conjunto de resultados da literatura, aqueles de JOLIN & MONTES (1973¹⁴⁰), que observaram insulinemias máxima e mínima durante os períodos de inatividade e atividade do rato, respectivamente. Finalmente, WATANABE & UCHIYAMA (1988²⁷²) encontraram, no sangue portal de rato, as maiores concentrações de insulina às 4 e 8 h e as menores às 16 e 20 h.

Desse modo, apesar de grande número de pesquisadores ter constatado insulinemias maiores ao final do período de repouso, ou durante o período de atividade, tanto em animais experimentais (acima mencionados), quanto em humanos (FREINKEL, MAGER & VINNICK, 1968⁸⁵; MALHERBE et al, 1969¹⁸⁰; SENSI et al, 1971²³⁴; JARRETT et al, 1972¹³⁸; CARROLL & NESTEL, 1973⁴⁹; SENSI et al, 1973²³³; APARICIO et al, 1974⁷; WHICHELOW et al, 1974²⁷⁷; MELANI et al, 1976¹⁹¹; ZUCKER, RUSAK & KING Jr, 1976²⁸⁸; WOJTCZAK-JAROSZOWA, 1977²⁷⁸; LOUIS-SYLVESTRE, 1978¹⁶⁶; HARA & SAITO, 1980¹⁰⁵; AHLERSOVÁ, AHLERS & TOROPILA, 1986²; POLONSKY, GIVEN & VAN CAUTER, 1988²⁰⁷; VAN CAUTER et al, 1991²⁶⁶), houve, também, resultados discordantes. Deve-se considerar, porém, que flutuações dos níveis plasmáticos hormonais refletem, não somente variações da intensidade de secreção, mas, também, os efeitos da diluição, distribuição e degradação do hormônio (VAN CAUTER, 1990²⁶²).

Correlatos morfológicos das variações funcionais de insulina foram descritos por HELLMAN & HELLERSTRÖM (1959¹¹¹), ao observarem variação diária

da área nuclear de células beta de rato, que apresentou valor máximo às 20 h e mínimo às 4 h.

WATANABE & UCHIYAMA (1988²⁷²), por sua vez, constataram que a síntese peptídica nas células beta de rato está aumentada por volta das 4 h. Nesse sentido, POLAK et al (1975²⁰⁶) mostraram, por técnicas imunocitoquímicas, que o conteúdo de insulina das ilhotas, nessa mesma espécie, está aumentado durante o final do período de luz e reduzido ao final do período *escuro*. Estas observações são concordantes com nossos resultados, de menor secreção em G 5,6 e G 8,3 às 8 e 12 h, e maior durante o período *escuro* (Figs. 2, 4 e 8). Também é consistente com estes resultados a verificação de que as densidades volumétricas de lisossomos e crinofagossomos, em células beta de rato, estão aumentadas durante o período de luz, especialmente às 12 h (WATANABE & UCHIYAMA, 1988²⁷²), na medida em que se constatou que a densidade volumétrica de crinofagossomos, em células beta, aumenta quando a atividade secretória dessas células é diminuída (CREUTZFELDT et al, 1969⁸⁶; HALBAN et al, 1979⁹⁸). Igualmente, concorda com nossos resultados a observação de que, em células beta de rato, as densidades volumétricas dos grânulos de secreção variam significativamente com a hora do dia, apresentando valores máximo e mínimo às 16 e 4 h, respectivamente (UCHIYAMA & WATANABE, 1987²⁶⁰). Estes mesmos autores (WATANABE & UCHIYAMA, 1988²⁷²) constataram que, na veia porta de ratos, a insulinemia variou nas 24 horas do dia, apresentando valor máximo às 4 h, quando as densidades volumétricas dos grânulos de secreção das células beta são mínimas. Verificaram, também, que as densidades superficiais do retículo endoplasmático, das células beta, variaram sincronicamente com a insulinemia portal e inversamente com a densidade dos

grânulos de secreção dessas células. Não obstante, permanece incógnito se a variação quantitativa da secreção dos grânulos das células beta reflete a concentração da insulina sangüínea (UCHIYAMA & WATANABE, 1987²⁶⁰).

Nas concentrações de glicose superiores a 8,3 mM, menos conspícuas foram as diferenças de secreção, por efeito da hora do dia (Figs. 2 a 4), exceção à maior secreção em G 27,7, no período *escuro* (Fig. 5). Em G 16,7 observamos, contudo, tendência a maior secreção às 20 h (52% superior), comparada com a secreção das 8 h. Essas observações são consistentes com resultados de GAGLIARDINO & HERNÁNDEZ (1972⁸⁷), que verificaram, em fragmentos de pâncreas de camundongo, secreção 115% maior às 20, que às 8 h.

4.2. EFLUXO DE ^{86}Rb

Em nossos experimentos iniciais, ilhotas pancreáticas isoladas de ratos, alimentados ou mantidos em jejum durante 48 horas, e carregadas de ^{86}Rb , foram perfundidas por *Krebs* que continha, sucessivamente, glicose (5,6; 0 e 5,6 mM), tendo-se medido o efluxo fracional desse isótopo (Figs. 9 e 11).

A medida do efluxo de ^{86}Rb é útil para se interpretar a seqüência de eventos iônicos envolvidos na resposta secretória de insulina (MALAISSE, 1987¹⁷⁰). Diferentes pesquisadores demonstraram que ^{86}Rb pode ser utilizado como análogo funcional (marcador ou traçador) de K^+ , em ilhotas pancreáticas isoladas

(BOSCHERO et al, 1977³⁵; MALAISSE et al, 1978¹⁷⁶; HENQUIN, 1980¹¹⁵; DAWSON et al, 1986⁶⁹).

Os efluxos de ^{86}Rb e K^+ , na célula beta, ocorrem, provavelmente, por difusão passiva (CROGHAN et al, 1986⁶⁷). O canal K^+_{ATP} é permeável, tanto a K^+ , quanto a Rb^+ (ASHCROFT, 1988⁹) e é a principal via de saída desses cátions, na célula beta em repouso (COOK & HALES, 1984⁶⁰; ASHCROFT et al, 1992¹⁷). A medida do efluxo de ^{86}Rb , a partir de ilhotas perfundidas por tampão desprovido de glicose, ou dela contendo baixas concentrações, é o mais simples e, provavelmente, o mais sensível teste para se determinar se uma substância fecha canais K^+_{ATP} nas células beta (HENQUIN et al, 1992¹¹⁷).

Conquanto medidas da taxa de efluxo (efluxo fracional ou *efflux rate constant*), por si só, não caracterizem propriedades da membrana plasmática (v.g. permeabilidade) (CROGHAN et al, 1986⁶⁷), resultados desses mesmos autores mostraram existir paralelismo (ainda que parcial) entre o efluxo fracional de ^{86}Rb e a permeabilidade da membrana da célula beta a esse íon. Outrossim, o efluxo de ^{86}Rb , em ilhotas pré-carregadas e perfundidas, tem sido extensamente usado como índice de permeabilidade da membrana plasmática a K^+ (MALAISSE, 1987¹⁷⁰; BEST, 1992²⁷).

4.2.1. EFEITOS DA SUPRESSÃO DE GLICOSE SOBRE O EFLUXO DE ^{86}Rb , EM ILHOTAS PANCREÁTICAS DE RATOS ALIMENTADOS

Diante das considerações descritas acima, parece-nos razoável considerar o parâmetro área G 5,6 (Figs. 10A e 12A) como indicativo da permeabilidade, a K^+ , da membrana de células beta submetidas a essa concentração basal de glicose. Apesar de havermos constatado variação diária desse parâmetro (Figs. 9 e 10), não encontramos correlação entre os valores de área G 5,6 e da secreção de insulina, em G 5,6, nas diferentes horas do dia. cremos que a explicação para esse fato deva, inicialmente, levar em conta a multiplicidade dos tipos de canais responsáveis pelo efluxo de K^+ e ^{86}Rb , na condição de G 5,6. Assim, considera-se a existência de, pelo menos, cinco tipos de canais de K^+ no plasmalema da célula beta, sendo mais preeminentes os canais K^+_{ATP} , $\text{K}^+_{\text{Ca}^{2+}}$ e K^+_{DR} (ASHCROFT & ASHCROFT, 1992¹¹). Entretanto, ASHCROFT, HARRISON & ASHCROFT (1984¹⁵) constataram que concentrações de glicose menores que 7 mM inibiram, em maior proporção, os canais K^+_{ATP} . Igualmente, glicose (5 mM) promoveu fechamento, superior a 90%, dos canais K^+_{ATP} ainda abertos na ausência desse nutriente (MISLER et al, 1986¹⁹⁴; ASHCROFT, ASHCROFT & HARRISON, 1988¹⁴). Parece não haver dúvidas de que os outros dois canais (K^+_{DR} e $\text{K}^+_{\text{Ca}^{2+}}$) contribuem muito pouco para a permeabilidade, a K^+ , nas células beta em repouso, e de que o fechamento de canais K^+_{ATP} provoca decréscimo da permeabilidade a K^+ , gerando a despolarização inicial, até o

potencial limiar (HENQUIN et al, 1992¹¹⁷). Também se deve considerar que, tanto os níveis de ATP, quanto a inibição do efluxo de K^+ , atingem seu máximo em concentrações de glicose próximas a 5,6 mM (WAHL, WALDNER & AMMON, 1992²⁷⁰; AMMON & WAHL, 1994⁵). O mesmo ocorre com a razão ATP/ADP (ERECINSKA et al, 1992⁷⁸), que controla o fechamento dos canais K^+_{ATP} (DUNNE et al, 1988⁷⁵; ASHCROFT & RORSMAN, 1990¹³). Ademais, AMMON & WAHL (1994⁵) consideram improvável que a intensidade da inibição do efluxo de K^+ , por ação nos canais K^+_{ATP} , determine, sozinha, o montante da insulina secretada. Diante dos argumentos acima, acreditamos não seja o parâmetro área G 5,6 indicativo da intensidade da secreção de insulina, em concentrações de glicose próximas ao limiar.

O parâmetro *inclinação G 5,6* (Fig. 10B), apesar de mostrar variação nas 24 horas do dia, também não apresentou correlação com os valores da secreção de insulina, na mesma concentração de glicose. Não encontramos, na literatura, qualquer referência ao significado funcional (se existir) desse parâmetro. Em princípio, maior valor absoluto de inclinação negativa representaria maior desaceleração do efluxo fracional, ou seja, mais rápida redução da velocidade desse efluxo. Isso significaria, portanto, redução da permeabilidade da membrana a K^+ . Entretanto, não há como explicar funcionalmente essa redução, numa situação de aparente constância, tanto da glicose extracelular, quanto dos demais fatores. Uma explicação alternativa é a possibilidade de que o ^{86}Rb intracelular seja *diluído* pela entrada de K^+ , via atividade da Na^+/K^+ -ATPase. De qualquer maneira, esse parâmetro, também, não parece ser indicativo da intensidade da secreção de insulina, nas condições utilizadas.

Os parâmetros $\Delta\%$ (Fig. 10C) e área G 0 (Fig. 10D) podem ser analisados em conjunto, porque: (1) representam um aspecto funcional singular, *i.e.*, a intensidade do efeito da supressão de glicose, do meio de perfusão, sobre o efluxo de ^{86}Rb ; (2) mostram significativa correlação linear, ao longo do dia ($p < 0,0005$), e (3) apresentam variação, nas 24 horas do dia. Ambos os parâmetros apresentam valores que se correlacionam inversamente com os valores da secreção de insulina, na ausência de glicose, embora não tenhamos verificado variação diária da insulina secretada, em G 0. Assim, enquanto às 16 h registramos os maiores valores dos parâmetros $\Delta\%$ e área G 0 (Fig. 10C e D), menor foi a secreção de insulina, em G 0 (Fig 2). Considerando que maiores valores desses parâmetros são indicativos de maior permeabilidade da membrana a potássio, verificamos que ao final do período *claro* (período de repouso do rato), a retirada de glicose do líquido de perfusão teria provocado o maior aumento da permeabilidade a esse cátion. Nesse sentido, DAWSON et al (1986⁶⁹) obtiveram máximos valores do efluxo fracional de ^{86}Rb e da permeabilidade a esse marcador, ao perfundirem ilhotas de camundongo por tampão desprovido de glicose. Por outro lado, glicose (5,6 mM) já foi suficiente para que AMMON & WAHL (1994⁵) registrassem os valores mínimos do efluxo fracional de ^{86}Rb , e os máximos de ATP, em ilhotas isoladas de rato. Sabe-se também que, na ausência de glicose, o potencial de repouso da célula beta é determinado, principalmente, pela atividade dos canais K^+_{ATP} (ASHCROFT & RORSMAN, 1990¹³). Diante disso, podemos supor que às 16 h, em comparação com os demais horários, a retirada de glicose tenha provocado abertura de maior número de canais K^+_{ATP} , determinando maior aumento do efluxo de ^{86}Rb , nesse horário. A esse respeito, verificou-se que, mesmo na ausência de glicose, apenas

cerca de 4% dos canais K^+_{ATP} , das células beta de rato, estão ativos (COHEN et al, 1990⁵⁹).

De uma perspectiva funcional, podemos aventar a hipótese de que, em células beta de rato, maior resposta dos canais K^+_{ATP} à glicopenia ocorreria ao final do período de repouso, quando maior é a tendência à hipoglicemia nessa espécie (STEFFENS, 1970²⁴⁶). A propósito, YAMAMOTO, NAGAI e NAKAGAWA (1987²⁸⁴) constataram, em rato, às 16 h, a máxima glucagonemia, simultânea com a mínima insulinemia. IKONOMOV et al (1985¹³⁰) também registraram, nessa mesma espécie, insulinemia mínima às 16 h. Em concordância, verificou-se que esses roedores apresentam conteúdo mínimo de glicogênio hepático, ao final do período de luz (HOLMGREN & SWENSSON, 1953, *apud* JOLIN & MONTES, 1973¹⁴⁰; LIMA et al, 1981¹⁶⁴).

Por outro lado, considerando a ocorrência de significativas correlações negativas, entre os valores de área G 5,6 e de $\Delta\%$ ou área G 0, não podemos descartar a possibilidade de que o maior efeito da supressão de glicose, às 16 h, seja resultante do relativo acúmulo de ^{86}Rb (K^+), conseqüente aos menores valores do efluxo fracional de ^{86}Rb , em G 5,6. Igualmente, maior efluxo fracional, em G 5,6, provocaria menor efeito da retirada de glicose, sobre o efluxo fracional de ^{86}Rb .

4.2.2. EFEITOS DA SUPRESSÃO DE GLICOSE SOBRE O EFLUXO DE ^{86}Rb , EM ILHOTAS DE RATOS SUBMETIDOS A JEJUM

Ritmos circadianos de um grande número de variáveis, estudadas em diversas espécies animais, incluindo-se o homem, não são primariamente determinados pela ingestão de alimentos energéticos. Esta observação suporta a hipótese, aceita pela maioria dos cronobiologistas, de que muitos ritmos circadianos têm base endógena (REINBERG, 1983²¹⁷). Ao contrário, EVEN et al (1987⁷⁹) especularam que a atividade rítmica endócrina poderia estar causalmente relacionada à alimentação. O ritmo circadiano da insulinemia, entretanto, parece ser, ao menos em parte, primariamente endógeno quanto à sua origem, *i.e.*, não provocado pela ingestão alimentar (MÉJEAN et al, 1988¹⁹⁰).

Em animais de atividade noturna, como camundongos e ratos, a ingestão alimentar ocorre principal, senão exclusivamente, durante o período de ausência de luz, mesmo quando o alimento está disponível *ad libitum* em quantidade e tempo. Em tais condições experimentais, a alternância claro-escuro é o sincronizador mais poderoso (REINBERG, 1974²¹⁶). Em animais superiores, incluindo-se o rato de laboratório, a ritmicidade circadiana da maioria dos parâmetros metabólicos é mantida durante 24 a 48 horas de jejum (AHLERSOVÁ, AHLERS & TOROPILA, 1986²).

Diversos pesquisadores mostraram persistência do ritmo da insulinemia, em roedores submetidos a jejum durante 24 a 48 horas (BELLINGER, MENDEL & MOBERG, 1975²²; PESSACQ et al, 1976²⁰⁴; LESAULT, ELCHINGER & DESBALS, 1991¹⁵⁹). Contraditoriamente, PESSACQ et al (1976²⁰⁴) apresentaram, também, resultados que demonstram a perda do ritmo circadiano da insulinemia, por ratos submetidos a jejum durante 29 horas.

Por outro lado, em pâncreas ou ilhotas isoladas de rato, jejum durante um a seis dias provocou efeitos inibitórios drásticos sobre a secreção de insulina (MATSCHINSKY et al, 1971¹⁸⁴; BOSBOOM, ZWEENS & BOUMAN, 1973³⁰; FINK et al, 1974⁸²; WOLTERS, KONIJNENDIJK & BOUMAN, 1977²⁸¹; BODEN et al, 1981²⁹; GIROIX et al, 1984⁹³; TAMARIT-RODRIGUEZ, VARA & TAMARIT, 1984²⁵²; VARA et al, 1988²⁶⁷).

Diante dos resultados apresentados, procuramos verificar a possibilidade de que a variação diária do efluxo de ^{86}Rb , por nós observada, decorresse do ciclo alimentar do rato, ou fosse, de alguma forma, por ele influenciada.

Confirmando e estendendo resultados mencionados acima, constatamos que jejum, durante 48 horas, não impediu a ocorrência da variação diária do efluxo fracional de ^{86}Rb , em ilhotas isoladas de rato, perfundidas na ausência ou presença de glicose (5,6 mM) (Fig. 11), o que pode ser comprovado pela análise matemática de quatro parâmetros do efluxo (Fig. 12). Embora não haja publicações sobre variação circadiana de fluxos iônicos, em ilhotas pancreáticas, estudos mostrando variação diária da insulinemia, tanto em situação de alimentado,

quanto em jejum, servem de referência a comparações. Assim, AHLERSOVÁ, AHLERS & TOROPILA (1986²) observaram que, tanto jejum durante 24 horas, quanto durante 48 horas, não impediram a ocorrência de variação circadiana da insulinemia, em ratos. Idêntico resultado obtiveram LESAULT, ELCHINGER & DESBALS (1991¹⁵⁹), em coelhos submetidos a jejum durante 48 horas. Outrossim, IKONOMOV et al (1985¹³⁰) demonstraram que, em ratos, o ritmo circadiano de alimentação não determina, necessariamente, o ritmo da insulinemia.

Nossos resultados são, portanto, consistentes com a verificação de que a maioria dos ritmos circadianos, senão todos, persistem durante jejum ou durante dieta bastante restrita (REINBERG, 1974²¹⁶).

Embora o jejum não tenha impedido a variação diária do efluxo de ⁸⁶Rb, algumas alterações foram notadas no comportamento do efluxo desse traçador. Assim, o jejum reduziu, tanto a média diária do parâmetro área G 5,6, quanto a sua amplitude aparente de variação (Figs. 13 e 14A). Igualmente, atenuou o efeito médio diário da retirada de glicose do meio de perfusão, sobre o efluxo de ⁸⁶Rb (Fig. 14C e D). Esses resultados são compatíveis com aqueles apresentados por CARPINELLI et al (1986⁴⁷), nos quais, embora sem mostrar significância estatística, a taxa de efluxo fracional de ⁸⁶Rb na ausência de glicose, em ilhotas de ratos mantidos em jejum durante 48 horas e carregadas do radioisótopo em presença de glicose (16,7 mM), foi sensivelmente menor que em ilhotas de ratos alimentados. Entretanto, esses autores consideram possível que o jejum afete o metabolismo de glicose sem, contudo, alterar os efluxos de ⁸⁶Rb e ⁴⁵Ca. Segundo os mesmos, no jejum, o efeito inibitório de glicose, sobre o efluxo fracional desses íons,

apresenta-se quase normal, em concentrações de glicose bem abaixo daquelas requeridas para evocar máxima resposta metabólica ou secretória. Portanto, redução parcial do fluxo glicolítico, como observado em ilhotas removidas de ratos em jejum, poderia, não-necessariamente, resultar em menor inibição do efluxo de ^{86}Rb ou ^{45}Ca . Fundamentados nessa explicação, acreditamos que o uso de menor concentração de glicose, em nosso protocolo (5,6 contra os 16,7 mM por eles utilizada), possa ter facilitado a manifestação do efeito inibitório do jejum, sobre o efluxo de ^{86}Rb . Mesmo porque, o efeito inibitório sobre o efluxo fracional de ^{86}Rb , provocado por um determinado incremento da concentração de glicose (v.g. 1 mM), é significativamente maior nas menores concentrações de glicose (v.g. na faixa de zero a 4,4 mM) (CARPINELLI & MALAISSE, 1981⁴⁶).

Resultados igualmente concordantes com os nossos são mostrados por AHLERSOVÁ, AHLERS & TOROPILA (1986²), os quais constataram redução (ca. 70%) do mesor¹ do ritmo circadiano da insulinemia, em ratos submetidos a jejum durante 24 ou 48 horas. Acentuada redução da insulinemia também ocorreu em coelhos submetidos a jejum durante 48 horas (LESAULT, ELCHINGER & DESBALS, 1991¹⁵⁹).

A constatação de menor amplitude aparente da variação diária do parâmetro área G 5,6, no grupo em jejum (Fig. 14A), está em acordo com os resultados de AHLERSOVÁ, AHLERS & TOROPILA (1986²), que verificaram menor

¹ Mesor é o valor médio de uma variável rítmica, em um ciclo único, determinado como a média de uma curva cosseno ajustada.

amplitude da oscilação circadiana da insulinemia, em ratos submetidos a jejum durante 24 ou 48 horas. Contrariamente, PESSACQ et al (1976²⁰⁴) apresentaram resultados obtidos com ratos, sugestivos da falta do efeito de jejum (29 horas), sobre a amplitude da oscilação da insulinemia.

Finalmente, verificamos que o jejum provocou aparente deslocamento de fase, em cerca de 12 horas, dos parâmetros $\Delta\%$ e área G_0 , indicadores da intensidade do efeito da supressão de glicose, sobre o efluxo de ^{86}Rb (Figs. 14C e D; 15C e D). Nosso resultado concorda com a verificação de que alterações da temporização alimentar podem deslocar a fase do ritmo circadiano da insulinemia (REINBERG, 1983²¹⁶), efeito que, em animais de laboratório, estaria associado a mudanças drásticas de atividade e busca de alimentos (REINBERG, 1974²¹⁶). É consistente, também, com resultados de AHLERSOVÁ, AHLERS & TOROPILA (1986²). Assim, em ratos mantidos em jejum durante 24 horas, estes autores verificaram que o ritmo circadiano da insulinemia apresentou acentuado deslocamento da acrofase², das 19:08 para as 09:48 h. Contrariamente, no mesmo grupo de experimentos, também constataram que jejum durante 48 horas teve pouco efeito sobre aquele ritmo, uma vez que a acrofase ocorreu às 19:56 h.

Resultados de PESSACQ et al (1976²⁰⁴), em ratos submetidos a jejum

² *Acrofase* é o tempo de máximo de uma curva cosseno ajustada, sendo estabelecida como o retardo, em relação a dada fase de referência. Frequentemente, é expressa em unidade de tempo ou em graus.

durante 29 horas, também não evidenciaram deslocamento de fase do ritmo circadiano da insulinemia.

Em outro sentido, MALATOVÁ & AHLERS (1977¹⁷⁹) observaram deslocamento de fase, provocado por jejum, durante 48 horas, do ritmo circadiano da corticosterona plasmática de rato. Por sua vez, HUGUES et al (1982¹²⁸) constataram que jejum, durante três dias, não impediu a ocorrência do ritmo circadiano do TSH plasmático. Houve redução dos níveis plasmáticos médios, porém, sem alteração da amplitude e fase do ritmo.

Em síntese, pudemos constatar que, embora o jejum, durante 48 horas, não tenha impedido a ocorrência de variação diária do efluxo de ⁸⁶Rb, provocou redução dos valores médios de parâmetros que avaliam esse efluxo, além de causar eventual redução da amplitude de variação. Provocou, também, aparente deslocamento de fase dos parâmetros que representam o efeito da retirada de glicose, do meio de perfusão. Isso permite supor que o ciclo alimentar exerça efeito mascarador sobre o ritmo diário do efluxo de potássio, nas ilhotas pancreáticas, à semelhança do efeito exercido sobre a secreção de insulina.

4.2.3. EFEITOS DE GLICOSE (8,3 mM) SOBRE O EFLUXO DE ^{86}Rb , EM ILHOTAS PANCREÁTICAS DE RATOS ALIMENTADOS

Uma vez demonstrada a ocorrência de variação diária do efluxo de ^{86}Rb , tanto em ratos alimentados, quanto em jejum, numa situação operacional equivalente a extrema glicopenia, decidimos investigar a possibilidade de que essa variação pudesse ocorrer, também, na faixa fisiológica de concentração extracelular de glicose, uma vez que as concentrações utilizadas correspondem às glicemias basal e pós-prandial. Para tanto, ilhotas carregadas de ^{86}Rb foram perfundidas com solução contendo, em seqüência, glicose (5,6 e 8,3 mM) (Fig. 16).

O parâmetro *área G 5,6* (Fig. 17A) não apresentou variação diária, o que está de acordo com a interpretação, já descrita, de que o mesmo não é indicativo da intensidade da secreção de insulina, em concentrações de glicose próximas ao limiar estimulatório. Por outro lado, a *inclinação G 5,6* (Fig. 17B), embora apresentando variação diária, representaria apenas uma particularidade inerente à técnica, qual seja, uma diluição isotópica, como já referido anteriormente.

O aumento da concentração extracelular de glicose (de 5,6 para 8,3 mM) provocou redução da taxa de efluxo de ^{86}Rb . Aumento do efluxo fracional de ^{86}Rb , após redução da concentração extracelular de glicose (de 8,3 para 5,6 mM), nos diferentes horários, é outro indicativo do efeito inibitório de G 8,3 sobre aquele efluxo (Fig. 16). Esses resultados são concordantes com os obtidos por HENQUIN

(1978¹¹⁴) e CARPINELLI & MALAISSE (1981⁴⁶), para condições experimentais equivalentes. Observamos que o efeito máximo de G 8,3, ao reduzir a taxa de efluxo de ⁸⁶Rb, ocorreu à 0 h, enquanto o mínimo foi registrado às 12 h (Figs. 16 e 17C e D). Coerentes com esses efeitos estão os valores da secreção de insulina, estimulada por G 8,3, que foram máximos à 0 h e mínimos durante o período *claro* (Figs. 2 e 7). Igualmente, o efeito mínimo de G 8,3, às 12 h, concorda com resultados de BELLINGER, MENDEL & MOBERG (1975²²), MARTIN, WANGSNESS & GAHAGAN (1978¹⁸³) e TIEDGEN & SEITZ (1980²⁵⁵), que constatarem, em rato, insulinemia mínima entre 12 e 14 h. Correlação positiva, altamente significativa, entre a concentração extracelular de glicose e o conseqüente efeito inibitório dessa hexose sobre o efluxo fracional de ⁸⁶Rb, foi obtida por CARPINELLI & MALAISSE (1981⁴⁶), em ilhotas pancreáticas isoladas de rato. Estes autores mostraram significativa redução do efluxo fracional de ⁸⁶Rb, após aumento da concentração de glicose (de 5,6 para 8,3 mM). Por outro lado, demonstrou-se que o efeito de glicose, ao reduzir a taxa de efluxo de potássio, está diretamente vinculado ao metabolismo desse nutriente nas células insulares (BOSCHERO & MALAISSE, 1979³²), não obstante esse efeito atinja um valor quase-máximo, em concentrações de glicose bem abaixo daquelas requeridas para provocar máxima resposta metabólica ou secretória (CARPINELLI et al, 1986⁴⁷). Pode-se inferir, daí, uma correlação direta entre o efeito inibitório do efluxo de ⁸⁶Rb e a secreção de insulina. A propósito, HENQUIN (1978¹¹⁴) estabeleceu correlação entre a redução do efluxo fracional de ⁴²K e a secreção de insulina, por ilhotas isoladas, em função da concentração extracelular de glicose. Nesse sentido, demonstramos a ocorrência de significativa correlação, ao longo do dia, entre os valores da secreção de insulina e a

intensidade da inibição do efluxo de ^{86}Rb , provocada por glicose (8,3 mM) (Figs. 18 e 19). Os menores valores de insulina secretada, ocorridos no período *claro*, estão associados a reduzidos efeitos de G 8,3 como inibidor do efluxo de ^{86}Rb , enquanto aos valores, relativamente elevados, de secreção do período *escuro* correspondem maiores efeitos de G 8,3, como inibidor desse efluxo. Esses resultados se harmonizam com a verificação de que há relação direta entre o efeito redutor do efluxo fracional de ^{86}Rb , provocado por glicose, e a secreção de insulina (MALAISSE et al, 1979¹⁷⁷). Em consequência, podemos supor que os maiores valores da secreção de insulina, estimulada por glicose (8,3 mM), constatados no período *escuro*, resultem do maior efeito de glicose, ao inibir o efluxo de ^{86}Rb , em comparação com menor efeito durante o período *claro*. Fechamento de canais K^+_{ATP} , seguido de relativa retenção de potássio, é etapa crucial da secreção de insulina e decorre do aumento da relação ATP/ADP, no citosol das células beta, processo este subsequente à metabolização de glicose (MALAISSE & SENER, 1987¹⁷²).

São desconhecidas as causas da variação circadiana da secreção de insulina. Entretanto, já se constatou a existência de oscilações ultradianas da glicólise, em células beta pancreáticas, tendo-se demonstrado grande similaridade entre os padrões de oscilação de lactato e insulina, durante perfusão de ilhotas com glicose (16,7 mM) (CHOU, BERMAN & IPP, 1992⁵²). Por outro lado, CORKEY et al (1988⁶⁴) detectaram oscilações da razão ATP/ADP, em células do insulinoma RIN m5F. Não se pode afirmar, contudo, se tais oscilações são a causa ou o resultado do ritmo endógeno. Maior efeito de glicose, no período *escuro*, poderia decorrer de vários fatores. Assim, pode-se especular a possibilidade de mais intenso

metabolismo de glicose, na célula beta, com maior aumento da relação citosólica ATP/ADP. Afinal, conforme anteriormente citado, o efeito de glicose, ao reduzir o efluxo fracional de potássio, está diretamente ligado ao metabolismo (fluxo da glicólise) desse carboidrato, nas células insulares (BOSCHERO & MALAISSE, 1979³²). A possível participação do metabolismo de glicose, no processo de variação diária da redução do efluxo de ⁸⁶Rb e da secreção de insulina, não foi por nós enfocada neste trabalho e deverá receber atenção na seqüência dos estudos.

De outro lado, pode-se cogitar maior responsividade de canais K^+_{ATP} à relação ATP/ADP, no período *escuro*. É notável a recente constatação da existência de canais iônicos, regulados por um relógio circadiano, em neurônios da retina de molusco (MICHEL et al, 1993¹⁹²) e em cultura de células da pineal de frango (D'SOUZA & DRYER, 1996⁷³).

Alternativamente, pode-se até aventar uma possível ação de glicose, independente de canais K^+_{ATP} , ou seja, um reconhecimento direto da molécula de glicose, pela célula beta (AIZAWA et al, 1994⁴), processo esse que, no rato, poderia ser melhor efetivado no período *escuro*. Entretanto, embora GEMBAL, GILON & HENQUIN (1992⁸⁹) tenham demonstrado a possibilidade de as células beta secretarem insulina, em condições que independem do fechamento de canais K^+_{ATP} , foi, por eles, ressaltada a participação essencial desses canais no processo de secreção e confirmado que os mesmos permanecem como o maior alvo de glicose.

Em resumo, as células beta de ilhotas pancreáticas isoladas de rato, quando estimuladas por concentrações fisiológicas de glicose, secretam mais

insulina no período de atividade dessa espécie, o que decorreria de maior efeito de glicose ao reduzir a permeabilidade a potássio, no período *escuro*.

4.3. EFLUXO DE ^{45}Ca

Demonstramos a existência de variação diária do efluxo de ^{86}Rb , em ilhotas pancreáticas isoladas, em diferentes situações fisiológicas, bem como em diferentes concentrações extracelulares de glicose. Considerando que as alterações celulares, decorrentes da modulação da atividade dos canais de potássio (v.g. K^+_{ATP}), acabam se refletindo nos fluxos de cálcio através das membranas, realizamos experimentos de medida do efluxo de ^{45}Ca , em diferentes horários, em ilhotas isoladas e previamente carregadas desse radioisótopo.

O Ca^{2+} livre citoplasmático desempenha função fundamental como transdutor de sinal, para a secreção de insulina pelas células beta (BERGGREN & LARSSON, 1994²³). Em consequência, os canais de cálcio executam atividade essencial na fisiologia das células beta. Esses canais regulam o fluxo de cálcio através do plasmalema, controlando, assim, a concentração citosólica desse cátion e a secreção de insulina (ASHCROFT, KELLY & SMITH, 1990¹⁶; RAJAN et al, 1990²¹⁴).

Alterações do efluxo de ^{45}Ca parecem representar um aspecto essencial da resposta catiônica das células insulares a agentes insulínótropicos

(MALAISSE, 1987¹⁷⁰). A monitoração do efluxo de ^{45}Ca , de ilhotas marcadas e perfundidas, representa uma técnica sensível de estudo da dinâmica do movimento de Ca^{2+} , nas células insulares (HERCHUELZ & MALAISSE, 1980¹¹⁹).

Os resultados apresentados nas figuras 20 e 21 sugerem a existência de ritmo diário, em processos pelos quais as células beta pancreáticas controlam os efluxos de cálcio, tanto em presença, quanto na ausência de glicose. O parâmetro *área G 0* reflete a magnitude do efluxo de ^{45}Ca , entre o 31º e o 44º minuto de perfusão e, por extensão, é indicativo da permeabilidade da membrana a cálcio. Os valores relativamente baixos de efluxo são determinados pela falta de glicose no meio de perfusão, sendo consistentes com resultados obtidos por MALAISSE, BRISSON & BAIRD (1973¹⁷³). Nesse mesmo sentido, LEBRUN, MALAISSE & HERCHUELZ (1982¹⁵³) verificaram que ilhotas, perfundidas por solução que continha glicose (8,3 mM), apresentaram maior efluxo de ^{45}Ca , em comparação com ilhotas perfundidas na ausência da hexose. Não obstante, nossos valores de efluxo em *G 0* foram relativamente maiores no período *escuro*, o que poderia estar refletindo maior intensidade de um ou outro, dentre os processos de extrusão do Ca^{2+} citosólico. Três são os processos conhecidos por retirar Ca^{2+} das células beta. O primeiro é uma Ca^{2+} -ATPase, que consome energia da hidrólise do ATP (PRENTKI & MATSCHINSKY, 1987²¹⁰). O segundo é um contratransporte Na^{+} - Ca^{2+} , promovido pelo gradiente de Na^{+} e pelo potencial da membrana plasmática (SIEGEL et al, 1980²³⁷), e cuja intensidade é atenuada por glicose e outros nutrientes (HERCHUELZ et al, 1980¹²²). Este processo parece contribuir com cerca de 30% do efluxo basal de Ca^{2+} , em ilhotas de rato mantidas em cultura (JANJIC & WOLLHEIM,

1983¹³³). Finalmente, há um mecanismo de troca $\text{Ca}^{2+} \times \text{Ca}^{2+}$, entre os meios extra e intracelular (HERCHUELZ, COUTURIER & MALAISSE, 1980¹²¹).

Diante dos processos acima mencionados, poder-se-ia aventar que, no período *escuro*, estaria ocorrendo, em células beta de rato, maior atividade da Ca^{2+} -ATPase e/ou maior troca de ^{45}Ca intracelular por Na^+ e/ou Ca^{2+} extracelular. Em outro sentido, pode-se considerar que, apesar de as ilhotas encontrarem-se em meio desprovido de glicose, as células beta seriam capazes de executar glicogenólise, liberar glicose no citosol e promover a glicólise (MALAISSE et al, 1977¹⁷⁸). Em conseqüência, podemos especular sobre a possibilidade de que alguma etapa crítica, dentre essas reações, esteja relativamente mais intensa no período *escuro*. Nesse sentido, MALAISSE, BRISSON & BAIRD (1973¹⁷³), utilizando ilhotas pancreáticas de rato, constataram que, mesmo concentrações de glicose ainda insuficientes para estimular a secreção de insulina, já foram suficientes para promover aumento do efluxo de ^{45}Ca .

O parâmetro *inclinação G 0* (Fig. 21B) apresentou valores negativos em todos os horários estudados. Maior valor (em módulo) da inclinação negativa significa mais rápida redução da intensidade do efluxo fracional de ^{45}Ca . Em outros termos, significa maior desaceleração desse efluxo. Não obstante às 16 h, a inclinação ter sido menor que às 12 ou 20 h, não houve diferença de inclinação entre os períodos *claro* e *escuro*. Esta igualdade, entre os dois períodos, é consistente com a expectativa de estabilização da permeabilidade do plasmalema da célula beta a cálcio, diante da manutenção das condições de perfusão.

O parâmetro $\Delta\%$ (Fig. 21C) é indicativo do efeito inibitório inicial de glicose, sobre o efluxo de cálcio. Glicose exerce efeito bifásico, sobre o efluxo de ^{45}Ca de ilhotas perfundidas. Após cerca de um minuto de exposição a esse estímulo, ocorre queda rápida do efluxo, seguida, poucos minutos depois, de grande aumento secundário da saída de ^{45}Ca , coincidente com o início da secreção de insulina (MALAISSE, BRISSON & BAIRD, 1973¹⁷³; MALAISSE, 1987¹⁷⁰). O efeito inibitório inicial de glicose, sobre o efluxo de ^{45}Ca , decorre da ação inibitória dessa hexose sobre o contratransporte $\text{Na}^+ \times \text{Ca}^{2+}$ (HERCHUELZ et al, 1980¹²²), através da geração de prótons, que competem com Ca^{2+} , no processo de saída (CARPINELLI et al, 1980⁴⁸). Esse efeito, contudo, não foi influenciado pela hora do dia (Fig. 21C), além de não haver sido constatado em alguns horários (v.g. 4, 16 e 20 h) (Fig. 20). Isto seria explicado pela presença de Ca^{2+} , no líquido de perfusão, que impediria ou atenuaria a manifestação daquele efeito (WOLLHEIM & SHARP, 1981²⁷⁹; MALAISSE, 1987¹⁷⁰). Desse modo, o processo de troca do Ca^{2+} extracelular, pelo ^{45}Ca intracelular, mascararia o efeito inibitório inicial de glicose, sobre o efluxo de ^{45}Ca (MALAISSE, 1987¹⁷⁰). Não obstante, a comparação entre os períodos *claro* e *escuro* mostrou maiores valores de variação percentual nos horários do período *claro*, que poderiam, teoricamente, resultar de: (1) maior efeito de glicose, ao inibir o contratransporte $\text{Na}^+ \times \text{Ca}^{2+}$, nesse período; (2) maior duração do período de inibição, conseqüente a retardo do início da segunda fase da ação de glicose, tal como ocorrido às 12 h; (3) ausência do efeito inibitório inicial de glicose, em determinados horários (v.g. 4 e 20 h) e (4) interferência decorrente da presença de Ca^{2+} (1 mM) no meio de perfusão.

O parâmetro área $G_{16,7}$ (Fig. 21D) mostrou variação nas 24 horas do dia, apresentando-se máximo às 20 h, o que é consistente com a elevada secreção de insulina observada nesse horário, quando ilhotas de rato foram estimuladas por $G_{16,7}$ (Fig. 4). Nesse sentido, é verificação usual que glicose, em presença de Ca^{2+} extracelular (1-2 mM), provoca, após imediata e rápida queda inicial, grande aumento do efluxo de ^{45}Ca , concomitante com a secreção de insulina (MALAISSE, BRISSON & BAIRD, 1973¹⁷³; HERCHUELZ et al, 1980¹²²). Esse aumento do efluxo de ^{45}Ca reflete a entrada de Ca^{2+} , na célula beta, através dos VDCCs tipo L (FINDLAY et al, 1989⁸¹; SMITH, RORSMAN & ASHCROFT, 1989²⁴²; ASHCROFT, KELLY & SMITH, 1990¹⁶; PLASMAN et al, 1990²⁰⁵) e corresponde a processo de troca Ca^{2+} x Ca^{2+} , no qual a entrada de ^{40}Ca , nas células beta, desloca ^{45}Ca dos sítios intracelulares de ligação (HERCHUELZ et al, 1980¹²²). É sugestiva a constatação, já discutida acima, de que os maiores valores de área G_0 também ocorreram no período *escuro*. Assim, deve-se considerar a possibilidade de que esses mecanismos de troca de Ca^{2+} estejam mais ativos, nas células beta de rato, durante o período *escuro*, o que parece ocorrer também na ausência de glicose.

Não houve, contudo, correspondência entre o reduzido valor de área $G_{16,7}$ e a elevada secreção de insulina, em $G_{16,7}$, às 16 h (Figs. 2 e 21D). Entretanto, foi precisamente às 16 h que a retirada de glicose, do meio perfusor, provocou maior aumento do efluxo de ^{86}Rb (Fig. 9). Inexplicavelmente, à 0 h, o efeito de $G_{16,7}$, sobre o efluxo de ^{45}Ca , foi mínimo. É importante, no entanto, ressaltar que não verificamos efeito da hora do dia sobre a secreção de insulina, em $G_{16,7}$ (Figs. 2 e 4). Igualmente, a análise conjunta dos dados de área $G_{16,7}$, em períodos *claro* e *escuro*, não revelou diferença, o que é consistente com nossas

observações de que, em G 16,7, a secreção de insulina, nos dois períodos, foi idêntica (Figs. 3 e 5). Sendo assim, não parece surpreendente a reduzida variação desse parâmetro, ao longo do dia, com limítrofe falta de significância ($p = 0,06$).

Finalmente, considerando os resultados da secreção de insulina por nós obtidos, acreditamos que mais expressivos efeitos da hora do dia, sobre os efluxos de ^{45}Ca , poderiam se manifestar na faixa fisiológica de concentrações de glicose, quais sejam, concentrações em que as secreções de insulina apresentaram variação diária (Figs. 2 a 5).

5. RESUMO E CONCLUSÕES

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Investigaram-se a secreção de insulina e os efluxos de K^+ e Ca^{2+} , em ilhotas pancreáticas de rato, isoladas em seis diferentes momentos do dia (0, 4, 8, 12, 16 e 20 h).

Para o estudo da secreção de insulina, utilizaram-se ilhotas de ratos, alimentados ou submetidos a jejum durante 48 horas, incubadas (60 min a 37 °C) em condição estática, em tampão-*Krebs* contendo glicose (entre zero e 27,7 mM), após pré-incubação durante 30 minutos.

Os efluxos de K^+ e Ca^{2+} foram determinados pela medida das taxas de efluxo de ^{86}Rb e ^{45}Ca , respectivamente, em ilhotas previamente carregadas desses traçadores e perfundidas por *Krebs* contendo diferentes concentrações de glicose.

Ritmo diário da secreção de insulina foi observado em G 5,6 (*Krebs* contendo glicose [5,6 mM]) e em G 8,3, concentrações nas quais a maior secreção ocorreu no período *escuro*.

O grupo do período *escuro* apresentou deslocamento, para a esquerda, da curva de secreção de insulina em resposta a glicose, com menor limiar estimulatório que o grupo do período *claro*.

Incremento da concentração extracelular de glicose (de 5,6 para 8,3 mM) provocou maior aumento da secreção de insulina, no período *escuro*.

O EC_{50} das curvas de secreção de insulina foi mínimo à 0 h e máximo às 8 h.

Verificou-se correlação negativa, ao longo do dia, entre o efeito da retirada de glicose do *Krebs*, sobre o efluxo fracional de ^{86}Rb , e os valores da secreção de insulina em G 0.

Constatou-se variação diária do efeito da supressão de glicose do *Krebs*, sobre o efluxo de ^{86}Rb , com valores máximo e mínimo às 16 e 4 h, respectivamente.

Jejum durante 48 horas não impediu a ocorrência de variação diária do efluxo de ^{86}Rb . Contudo, provocou redução, tanto dos valores de parâmetros que medem esse efluxo, quanto da amplitude de variação dos mesmos, nas 24 horas do dia. Provocou, também, aparente deslocamento de fase dos parâmetros que representam o efeito da retirada de glicose do meio de perfusão.

O efeito máximo de glicose (8,3 mM), ao reduzir a taxa de efluxo de ^{86}Rb , foi observado à 0 h, enquanto o mínimo foi registrado às 12 h.

Verificou-se significativa correlação, ao longo do dia, entre os valores da secreção de insulina e a intensidade da inibição do efluxo de ^{86}Rb , provocada por glicose (8,3 mM).

Embora se tenha constatado variação diária do efluxo de ^{45}Ca , em G 16,7, com valor máximo às 20 h, não se observou correlação entre este parâmetro e os valores da secreção de insulina, em presença de G 16,7.

Diante desses resultados, conclui-se que, em células beta de ilhotas pancreáticas isoladas de rato:

A sensibilidade a glicose está diminuída no período *claro*.

A responsividade a glicose é máxima à 0 h e mínima às 8 h.

A secreção de insulina, estimulada por concentrações fisiológicas de glicose, é maior durante o período de atividade dessa espécie, o que decorreria do maior efeito de glicose, ao reduzir a permeabilidade a potássio, no período *escuro*.

A ativação de canais K^+_{ATP} provocada por glicopenia é, aparentemente, mais extensa ao final do período de repouso dessa espécie.

O ciclo alimentação-jejum, aparentemente, exerce efeito mascarador sobre o ritmo diário do efluxo de potássio.

SUMMARY

SUMMARY

This thesis examines the insulin secretion and the K^+ and Ca^{2+} effluxes in pancreatic islets at different times of the day. Insulin secretion was measured during a 60 min incubation (37 °C) of islets from fed or 48 h-starved rats. The K^+ and Ca^{2+} effluxes were determined by measuring the rate of Rb^+ and Ca^{2+} efflux, respectively, from islets preloaded with these tracers and incubated in Krebs solution containing different concentrations (0; 2.8; 5.6; 8.3; 11.1; 16.7 and 27.7 mM) of glucose.

A diary rhythm was observed in insulin secretion, with the highest release occurring during the dark period in G 5.6 (Krebs containing 5.6 mM glucose) and G 8.3. The dark period insulin secretion curve in response to glucose was shifted to the left compared with the light period response and showed a lower stimulatory threshold. Thus, the lowest EC_{50} for stimulation by glucose was observed at 12:00 a.m. (7.8 mM) and the highest at 8:00 a.m. (12.4 mM).

During the day, a negative correlation was shown between the effect of the glucose withdraw from the Krebs, on the fractional efflux of the ^{86}Rb and the level of insulin secretion in G 0. For the former, the maximum and minimum occurred at 4:00 p.m. and 4:00 a.m., respectively.

Starvation for 48 h did not inhibit the occurrence of ^{86}Rb efflux although there was a reduction in the absolute values and in the range of variation over a 24 h period. It also induced apparent shift of phase of the parameters that represents the effect of the glucose removal from the perfusion medium. The

maximum and minimum effects of 8.3 mM glucose in reducing the efflux rate were observed at 12:00 a.m. and 12:00 p.m., respectively. Over a 24 h period, there was a significant correlation between the level of insulin secretion and the inhibition of ^{86}Rb efflux induced by 8.3 mM glucose.

Although the efflux of ^{45}Ca in G 16.7 peaked at 8:00 p.m., there was no correlation between this parameter and the level of insulin secretion in this concentration of glucose.

These results indicate that in response to physiological concentrations of glucose, beta cells of the rat's isolated pancreatic islets release more insulin during the normal activity period of the species. This higher secretion may be related to an improved ability of glucose to reduce the permeability of these cells to potassium during the dark period. The glycopenia-mediated activation of K^+_{ATP} channels in rat pancreatic beta cells is greater at the end of this species' rest period. The feeding-starvation cycle appears to mask the daily rhythm of potassium efflux from beta cells.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUILAR-BRYAN, L.; CLEMENT IV, J.P.; GONZALEZ, G.; KUNJILWAR, K.; BABENKO, A. & BRYAN, J. Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels. *Physiol. Rev.*, 78:227-45, 1998.
2. AHLERSOVÁ, E; AHLERS, I. & TOROPILA, M. Circadian oscillations of thyroid hormones and insulin in the serum of fasting rats. *Physiol. Bohemosl.*, 35:233-41, 1986.
3. _____; _____; SMAJDA, B. & KASSAYOVÁ, M. The effect of various photoperiods on daily oscillations of serum corticosterone and insulin in rats. *Physiol Res.*, 41:315-21, 1992.
4. AIZAWA, T.; SATO, Y.; KOMATSU, M.; ISHIHARA, F.; TAGUCHI, N. & HASHIZUME, K. ATP-sensitive K^+ channel-independent, glucose-induced signalling in the pancreatic B-cell. In: FLATT, P.R. & LENZEN, S., ed. *Frontiers of insulin secretion and pancreatic B-cell research*. London, Smith-Gordon & Nishimura, 1994. p. 167-72.
5. AMMON, H.P.T. & WAHL, M.A. Islet redox ratios: their role in insulin release. In: FLATT, P.R. & LENZEN, S., ed. *Frontiers of insulin secretion and pancreatic B-cell research*. London, Smith-Gordon & Nishimura, 1994. p. 113-22.
6. ANOKHIN, P.K. The biological roots of the conditioned reflex. In: ANOKHIN, P.K., ed. *Biology and neurophysiology of the conditioned reflex and its role in adaptative behavior*. Oxford, Pergamon, 1974. p. 1-24.

7. APARICIO, N.J.; PUCHULU, F.E.; GAGLIARDINO, J.J.; RUIZ, M.; LLORENS, J.M.; RUIZ, J.; LAMAS, A. & DE MIGUEL, R. Circadian variation of the blood glucose, plasma insulin and human growth hormone levels in response to an oral glucose load in normal subjects. *Diabetes*, 23:132-7, 1974.
8. ARENDT, J. Melatonin and the mammalian pineal gland. Londres, Chapman & Hall, 1995. p. 161-200.
9. ASHCROFT, F.M.; Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annu. Rev. Neurosci.*, 11:97-118, 1988.
10. ASHCROFT, S.J.H. Metabolic controls of insulin secretion. In: COOPERSTEIN, S.J. & WATKINS, D., ed. *The islets of Langerhans*. New York, Academic, 1981. p. 117-48.
11. ASHCROFT, F.M. & ASHCROFT, S.J.H. Mechanism of insulin secretion. In: _____, ed. *Insulin: molecular biology to pathology*. New York, Oxford University, 1992. p. 97-150.
12. _____ & RORSMAN, P. Electrophysiology of the pancreatic β -cell. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 54:87-143, 1989.
13. _____ & _____. ATP-sensitive K^+ channels: A link between B-cell metabolism and insulin secretion. *Biochem. Soc. Trans.*, 18:109-11, 1990.
14. _____; ASHCROFT, S.J.H. & HARRISON, D.E. Properties of single potassium channels modulated by glucose in rat pancreatic B-cells. *J. Physiol.*, 400:501-27, 1988.
15. _____; HARRISON, D.E.; ASHCROFT, S.J.H. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic β -cells. *Nature*, 312:446-8, 1984.
16. _____; KELLY, R.P. & SMITH, P.A. Two types of Ca channel in rat pancreatic β -cells. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, 415:504-6, 1990.

17. ASHCROFT, F.M.; WILLIAMS, B.; SMITH, P.A. & FEWTRELL, C.M.S. Ion channels involved in the regulation of nutrient-stimulated insulin secretion. *In: FLATT, P.R., ed. Nutrient regulation of insulin secretion.* London, Portland, 1992. p. 193-212.
18. BAKER, I.A. & JARRETT, R.J. Diurnal variation in the blood-sugar and plasma-insulin response to tolbutamide. *Lancet*, 4:945-7, 1972.
19. BARTER, P. J.; CARROLL, K.F. & NESTEL, P. J. Diurnal fluctuations in triglyceride, free fatty acids, and insulin during sucrose consumption and insulin infusion in man. *J. Clin. Invest.*, 50:583-91, 1971.
20. BECK-NIELSEN, H. & PEDERSEN, O. Diurnal variation in insulin binding to human monocytes. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 47:385-90, 1978.
21. BEDOYA, F. J.; APPEL, M.C.; GOBERNA, R. & MATSCHINSKY, F.M. Induction of the glucokinase-glucose sensor in pancreatic islets of insulinoma-bearing rats following tumor removal. *In: ATWATER, I.; ROJAS, E. & SORIA, B., ed. Biophysics of the pancreatic β -cell.* New York, Plenum, 1986. p.447-57, 1986.
22. BELLINGER, L.L.; MENDEL, V.E. & MOBERG, G.P. Circadian insulin, GH, prolactin, corticosterone and glucose rhythms in fed and fasted rats. *Horm. Metab. Res.*, 7:132-5, 1975.
23. BERGGREN, P.-O. & LARSSON, O. Ca^{2+} and pancreatic B-cell function. *Biochem. Soc. Trans.*, 22:12-8, 1994.
24. _____; ARKHAMMAR, P.; ISLAM, M.S.; JUNTITI-BERGGREN, L.; KINDMARK, H.; KOHLER, M.; LARSSON, O.; NILSSON, T.; SZECOWKA, J. & ZHANG, Q. Molecular mechanisms involved in regulating cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in pancreatic B-cells. *In: FLATT, P.R. & LENZEN, S., ed. Frontiers of insulin secretion and pancreatic B-cell research.* London, Smith-Gordon & Nishimura, 1994. p.201-11.

25. BERGSTEN, P.; GRAPENGIESSER, E.; GYLFE, E.; TENGHOLM, A. & HELLMAN, B. Synchronous oscillations of cytoplasmic Ca^{2+} and insulin release in glucose-stimulated pancreatic islets. *J. Biol. Chem.*, 269:8749-53, 1994.
26. BERGSTROM, R.W.; FUJIMOTO, W.Y.; TELLER, D.C. & DE HAËN, C. Oscillatory insulin secretion in perfused isolated rat islets. *Am. J. Physiol.*, 257:E479-E485, 1989.
27. BEST, L. Intracellular pH and B-cell function. *In*: FLATT, P.R., ed. *Nutrient regulation of insulin secretion*. London, Portland, 1992. p. 157-71.
28. _____; YATES, A.P. & TOMLINSON, S. Stimulation of insulin secretion by glucose in the absence of diminished (^{86}Rb) permeability. *Biochem. Pharmacol.*, 43:2483-5, 1992.
29. BODEN, G.; BAILE, C.A.; McLAUGHLIN, C.L. & MATSCHINSKY, F.M. Effects of starvation and obesity on somatostatin, insulin, and glucagon release from an isolated perfused organ system. *Am. J. Physiol.*, 241:E215-E220, 1981.
30. BOSBOOM, R.S.; ZWEENS, J. & BOUMAN, P.R. Effects of feeding and fasting on the insulin secretory response to glucose and sulfonylureas in intact rats and isolated perfused rat pancreas. *Diabetologia*, 9:243-50, 1973.
31. BOSCHERO, A.C. Acoplamento da estimulação-secreção de insulina pelas células β pancreáticas. *Arq. Bras. Endocrinol. & Metab.*, 40:149-55, 1996.
32. _____ & MALAISSE, W.J. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXIX. Regulation of ^{86}Rb efflux from perfused islets. *Am. J. Physiol.*, 236:E139-E146, 1979.
33. _____; DELATTRE, E. & SANTOS, M.L. Isolamento de ilhotas de Langerhans de rato. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA, 12. *Anais...* Ribeirão Preto, Soc. Bras. Fisiologia, 1980. p. 117.

34. BOSCHERO, A.C.; CREPALDI-ALVES, S.C.; CARNEIRO, E.M. & BOSQUEIRO, J.R. Canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e a secreção de insulina: aspectos fisiopatológicos da hiperinsulinemia familiar (HF). *Arq. Bras. Endocrinol & Metab.*, 1998. (in press).
35. _____; KAWAZU, S.; DUNCAN, G. & MALAISSE, W. Effect of glucose on K^+ handling by pancreatic islets. *Febs Lett.*, 83:151-4, 1977.
36. BOUMAN, P.R.; WOLTERS, G.H.J. & KONIJNENDIJK, W. Insulin secretion and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate levels in pancreatic islets of fed and fasted rats. Time course and dose kinetics during glucose stimulation. *Diabetes*, 28:132-40, 1979.
37. BOWEN, A.J. & REEVES, R.L. Diurnal variation in glucose tolerance. *Arch. Intern. Med.*, 119:261-4, 1967.
38. BRANDENBERGER, G.; SIMON, C. & FOLLENIUS, M. Ultradian endocrine rhythms: a multioscillatory system. *J. Interdiscipl. Cycle Res.*, 18:307-15, 1987.
39. BRODOWS, R.G. Starvation enhances the ability of insulin to inhibit its own secretion. *Metabolism*, 34:53-7, 1985.
40. BURCH, P.T.; TRUS, M.D.; BERNER, D.K.; LEONTIRE, A.; ZAWALISH, K.C. & MATSCHINSKY, F.M. Adaptation of glycolytic enzymes. Glucose use and insulin release in rat pancreatic islets during fasting and refeeding. *Diabetes*, 30:923-8, 1981.
41. BYRNE, M.M.; STURIS, J.; O'MEARA, N.M. & POLONSKY, K.S. Insulin secretion in humans: physiologic regulation and alterations in disease states. In: LE ROITH, D.; TAYLOR, S.I. & OLEFSKY, J.M., ed. *Diabetes mellitus*. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996.

42. CAMPBELL, I.T.; JARRETT, R. J.; RUTLAND, P. & STIMMLER, L. The plasma insulin and growth hormone response to oral glucose: diurnal and seasonal observations in the Antarctic. *Diabetologia*, 11:147-150, 1975.
43. CAPANI, F.; CARADONNA, P.; CAROTENUTO, M.; CAMELLI, G. & SENSI, S. Circadian rhythm of immunoreactive insulin under glycemic stimulus. *Biochem. Biol. Sper.*, 10:115-24, 1972.
44. CAPITO, K. & HEDESKOV, C. J. The effect of starvation on phosphodiesterase activity and the content of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in isolated mouse pancreatic islets. *Biochem. J.*, 142:653-8, 1974.
45. _____ & _____. Inosine-stimulated insulin release and metabolism of inosine in isolated mouse pancreatic islets. *Biochem J.*, 158:335-40, 1976.
46. CARPINELLI, A.R. & MALAISSE, W. J. Regulation of ⁸⁶Rb outflow from pancreatic islets: the dual effect of nutrient secretagogues. *J. Physiol.*, 315:143-56, 1981.
47. _____; MATHIAS, P.C.F.; LECLERCQ-MEYER, V. & MALAISSE, W. J. Fasting-induced dissociation of cationic and secretory events in pancreatic islets. *Cell Biochem. & Funct.*, 4:123-30, 1986.
48. _____; SENER, A.; HERCHUELZ, A. & MALAISSE, W.J. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Effect of intracellular acidification upon calcium efflux from islet cells. *Metabolism*, 29:540-5, 1980.
49. CARROLL, K.F. & NESTEL, P. J. Diurnal variation in glucose tolerance and insulin secretion in man. *Diabetes*, 22:333-48, 1973.
50. CATTERALL, W. & EPSTEIN, P.N. Ion channels. *Diabetologia*, 35 (Suppl.2):S23-S33, 1992.
51. CHOU, H.-F. & IPP, E. Pulsatile insulin secretion in isolated rat islets. *Diabetes*, 39:112-7, 1990.

52. CHOU, H.-F. ; BERMAN, N. & IPP, E. Oscillations of lactate released from islets of Langerhans: evidence for oscillatory glycolysis in β -cells. *Am. J. Physiol.*, 262:E800-E805, 1992.
53. _____; _____ & _____. Evidence for pancreatic pacemaker for insulin oscillations in low-frequency range. *Am. J. Physiol.*, 266:R1786-R1791, 1994.
54. _____; McGIVERN, R.; BERMAN, N. & IPP, E. Oscillations of circulating plasma insulin concentrations in the rat. *Life Sci.*, 48:1463-9, 1991a.
55. _____; IPP, E.; BOWSHER, R.R.; BERMAN, N.; EZRIN, C. & GRIFFITHS, S. Sustained pulsatile insulin secretion from adenomatous human β -cells. Synchronous cycling of insulin, C-peptide, and proinsulin. *Diabetes*, 40:1453-8, 1991b.
56. CINCOTTA, A.H. & MEIER, A.H. Circadian rhythms of lipogenesis and hypoglycaemic responses to insulin in the golden hamster *Mesocricetus auratus*. *J. Endocrinol.*, 103:141-6, 1984.
57. CIPOLLA-NETO, J. Fisiologia do sistema de temporização circadiana. In: _____; MARQUES, N. & MENNA-BARRETO, L.S., ed. *Introdução ao estudo da cronobiologia*. São Paulo, Ícone, 1988. p. 65-146.
58. _____ & CAMPA, A. Ritmos biológicos. In: MELO AIRES, M., ed. *Fisiologia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. p. 17-9.
59. COHEN, D.R.; MATTESON, R.; PARSEY, V. & SALA, S. Ionic currents in rat pancreatic β -cells recorded with the perforated patch technique. *Biophys. J.*, 57:509A, 1990.
60. COOK, D.L. & HALES, C.N. Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic β -cells. *Nature*, 311:271-3, 1984.

61. COOK, D.L.; SATIN, L.S.; ASHFORD, M.L. J. & HALES, C.N. ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic β -cells. Spare-channel hypothesis. *Diabetes*, 37:495-8, 1988.
62. COORE, H.G. & RANDLE, P.J. Regulation of insulin secretion studied with pieces of rabbit pancreas incubated *in vitro*. *Biochem. J.*, 93:66-78, 1964.
63. CORKEY, B.E.; DEENEY, J.T.; CUNNINGHAM, B.A.; CIVELEK, V.N.; TORNHEIM, K. & PRENTKI, M. Metabolic basis for glucose-induced insulin secretion in pancreatic B-cells. *In*: FLATT, P.R. & LENZEN, S., ed. *Frontiers of insulin secretion and pancreatic B-cell research*. London, Smith-Gordon & Nishimura, 1994. p. 91-6.
64. _____; TORNHEIM, K.; DEENEY, J.T.; GLENNON, M.C.; PARKER, J.C.; MATSCHINSKY, F.M.; RUDERMAN, N.B. & PRENTKI, M. Linked oscillations of free Ca²⁺ and the ATP/ADP ratio in permeabilized RINm5F insulinoma cells supplemented with a glycolyzing cell-free muscle extract. *J. Biol. Chem.*, 263:4254-8, 1988.
65. COSCELLI, C.; ALPI, O. & BUTTURINI, U. The response of glucose, insulin and FFA to intravenous glucose and glucagon in elderly subjects in the course of morning and afternoon tests. *Chronobiologia*, 5:387-90, 1978.
66. CREUTZFELDT, W.; CREUTZFELDT, C.; FRERICH, H.; PERINGS, E. & SICKINGER, K. The morphological substrate of the inhibition of insulin secretion by diazoxide. *Horm. Metab. Res.*, 1:53-64, 1969.
67. CROGHAN, P.C.; DAWSON, C.M.; SCOTT, A.M. & BANGHAM, J.A. Contribution of isotope flux studies to understanding the mechanism of the β -cell membrane. *In*: ATWATER, I.; ROJAS, E. & SORIA, B., ed. *Biophysics of the pancreatic β -cell*. New York, Plenum, 1986. p. 207-223.
68. DE SOUZA, C.J. & MEIER, A.H. Circadian and seasonal variations of plasma insulin and cortisol concentrations in the syrian hamster, *Mesocricetus auratus*. *Chronobiol. Int.*, 4:141-51, 1987.

69. DAWSON, C.M.; CROGHAN, P.C.; SCOTT, A.M. & BANGHAM, J.A. Potassium and rubidium permeability and potassium conductance of the β -cell membrane in mouse islets of Langerhans. *Q. J. Exp. Physiol.*, 71:205-22, 1986.
70. DESBUQUOIS, B & AURBACH, G.D. Use of polyethylene-glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. *J. Clin. Endocrinol., & Metab.*, 33:732-8, 1971.
71. DETIMARY, P.; GILON, P.; NENQUIN, M. & HENQUIN, J-C. Two sites of glucose control of insulin release with distinct dependence on the energy state in pancreatic B-cells. *Biochem. J.*, 297:455-61, 1994.
72. DEUEL, H.J.Jr; BUTTS, J.S.; HALLMAN, L.F.; MURRAY, S. & BLUNDEN, H. Studies on ketosis. XIII. Diurnal changes in liver glycogen. *J. Biol. Chem.*, 123:257-65, 1938.
73. D'SOUZA, T. & DRYER, S.E. A cationic channel regulated by a vertebrate intrinsic circadian oscillator. *Nature*, 382:165-7, 1996.
74. DUNNE, M.J.; HARDING, E.A.; JAGGAR, J.H. & SQUIRES, P.E. Ion channels and the molecular control of insulin secretion. *Biochem. Soc. Trans.*, 22:6-12, 1994.
75. _____; WEST-JORDAN, J.A.; ABRAHAM, R. J.; EDWARDS, R.H.T. & PETERSEN, O.H. The gating of ATP-sensitive K-channels in insulin-secreting cells can be modulated by changes in the ratio of ATP^4/ADP^3 and by non-hydrolysable analogues of both ATP and ADP. *J. Membr. Biol.*, 104:165-77, 1988.
76. EFENDIC, S.; CERASI, E. & LUFT, R. Effect of phentolamine and preperfusion with glucose on insulin release from the isolated perfused pancreas from fasted and fed rats. *Diabetologia*, 11:407-10, 1975.

77. EFENDIC, S.; CERASI, E.; LUFT, R. & GLADNIKOFF, G. Potentiation of glucose-induced insulin release by glucose in the isolated pancreas of fed and fasted rats. *Diabetes*, 25:949-54, 1976.
78. ERECINSKA, M.; BRYLA, J.; MICHALIK, M.; MEGLASSON, M.D. & NELSON, D. Energy metabolism in islets of Langerhans. *Biochim. Biophys. Acta*, 1101:273-95, 1992.
79. EVEN, P.; DANGUIR, J.; NICOLAIDIS, S.; ROUGEOT, C. & DRAY, F. Pulsatile secretion of growth hormone and insulin in relation to feeding in rats. *Am. J. Physiol.*, 253: R772-R778, 1987.
80. FELDMAN, J.M. & LEOVITZ, H.E. Role of pancreatic monoamines in the impaired insulin secretion of the fasting state. *Endocrinology*, 92:1469-74, 1973.
81. FINDLAY, I.; ASHCROFT, F.M.; KELLY, R.P.; RORSMAN, P.; PETERSEN, O.H. & TRUBE, G. Calcium currents in insulin-secreting β -cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 560:387-90, 1989.
82. FINK, G.; GUTMAN, R.A.; CRESTO, J.C.; SELAWRY, H.; LAVINE, R. & RECENT, L. Glucose-induced insulin release patterns: effect of starvation. *Diabetologia*, 10:421-5, 1974.
83. FISCHER, U.; FREYSE, E-J.; ALBRECHT, G.; GEBEL, G.; HEIL, M. & UNGER, W. Daily glucose and insulin rhythms in diabetic dogs on the artificial beta cell. *Exp. Clin. Endocrinol.*, 85:27-37, 1985.
84. FOULKES, N.S.; BORJIGIN, J.; SNYDER, S.H. & SASSONE-CORSI, P. Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. *Trends Neurosci.*, 20:487-92, 1997.
85. FREINKEL, N.; MAGER, M. & VINNICK, L. Cyclicity in the interrelationships between plasma insulin and glucose during starvation in normal young men. *J. Lab. Clin. Med.*, 71:171-8, 1968.

86. GAGLIARDINO, J.J. & HERNÁNDEZ, R.E. Circadian variation of the serum glucose and immunoreactive insulin levels. *Endocrinology*, 88:1529-31, 1971.
87. _____ & _____. Relationship between differential responsiveness of pancreatic β cells and the circadian variation of serum immunoreactive insulin levels. *Endocrinology*, 91:822-4, 1972.
88. _____; _____ & REBOLLEDO, O.R. Chronobiological aspects of blood glucose regulation: a new scope for the study of diabetes mellitus. *Chronobiologia*, 11:357-79, 1984.
89. GEMBAL, M.; GILON, P. & HENQUIN, J-C. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K^+ channels in mouse B cells. *J. Clin. Invest.*, 89:1288-95, 1992.
90. _____; DETIMARY, P.; GILON, P.; GAO, Z-Y. & HENQUIN, J-C. Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on adenosine triphosphate-sensitive K^+ channels in mouse B cells. *J. Clin. Invest.*, 91:871-80, 1993.
91. GILLIS, K.D.; GEE, W.M.; HAMMOUD, A.; McDANIEL, M.L.; FLAKE, L.C. & MISLER, M. Effects of sulfonamides on a metabolite-regulated ATPi - sensitive K^+ -channel in rat pancreatic β -cell. *Am. J. Physiol.*, 257:C1119-C1127, 1989.
92. GILON, P.; YAKEL, J.; GROMADA, J.; ZHU, Y.; HENQUIN, J-C. & RORSMAN, P. G protein-dependent inhibition of L-type Ca^{2+} currents by acetylcholine in mouse pancreatic B-cells. *J. Physiol.*, 499:65-76, 1997.
93. GIROIX, M.-H.; DUFRANE, S.P.; MALAISSE-LAGAE, F.; SENER, A. & MALAISSE, W. J. Fasting-induced impairment of glucose-1,6-bisphosphate synthesis in pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 119:543-8, 1984.

94. GOETZ, F.; BISHOP, J.; HALBERG, F.; SOTHERN, R.B.; BRUNNING, R.; SENSKE, B.; GREENBERG, B.; MINORS, D.; STONEY, P.; SMITH, I.D.; ROSEN, G.D.; CRESSEY, D.; HAUS, E. & APFELBAUM, M. Timing of single daily meal influences relations among human circadian rhythms in urinary cyclic AMP and hemic glucagon, insulin and iron. *Experientia*, 32:1081-4, 1976.
95. GRAPENGIESSER, E.; GYLFE, E. & HELLMAN, B. Dual effect of glucose on cytoplasmic Ca^{2+} in single pancreatic β -cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 150:419-25, 1988.
96. GYLFE, E. Glucose-induced early changes in cytoplasmic calcium of pancreatic β -cells studied with time-sharing dual-wavelength fluorometry. *J. Biol. Chem.*, 263:5044-8, 1988.
97. _____; BUITRAGO, A.; BERGGREN, P-O & HAMMARSTRÖM, K. The glucose effect on ^{45}Ca efflux from pancreatic islets perfused with calcium-deficient medium. *Diabetologia*, 15:236, 1978. (Abstract).
98. HALBAN, P.A.; WOLLHEIM, C.B.; BLONDEL, B.; NIESOR, E. & RENOLD, A.E. Perturbation of hormone storage and release induced by cyproheptadine in rat pancreatic islets *in Vitro*. *Endocrinology*, 104:1096-1106, 1979.
99. HALBERG, F. Physiologic 24-hour periodicity: general and procedural considerations with reference to the adrenal cycle. *Z. Vitam. Horm. Fermentforsch.*, 10:225-96, 1959.
100. _____. Protection by timing treatment according to bodily rhythms. An analogy to protection by scrubbing before surgery. *Chronobiologia*, 1 (Suppl. 1):23-68, 1974.
101. _____ & REINBERG, A. Rythmes circadiens et rythmes de basses frequences en physiologie humaine. *J. Physiol.*, 59:117-200, 1967.

102. HANKS, J.H. & WALLACE, R. E. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 71:196-200, 1949.
103. HANSEN, B.C.; JEN, K-L.C.; PEK, S.B. & WOLFE, R.A. Rapid oscillations in plasma insulin, glucagon, and glucose in obese and normal weight humans. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 54:785-92, 1982a.
104. _____; _____; KOERKER, D. J.; GOODNER, C. J. & WOLFE, R.A. Influence of nutritional state on periodicity in plasma insulin levels in monkeys. *Am. J. Physiol.*, 242:R255-R260, 1982b.
105. HARA, E. & SAITO, M. Diurnal changes in plasma glucose and insulin responses to oral glucose load in rats. *Am. J. Physiol.*, 238:E463-E466, 1980.
106. HARGIS, P.M.; OLSON, C.D.; CLARKE, S.D. & DEMPSEY, M.E. Hormonal triggering of the diurnal variation of sterol carrier protein. *J. Biol.Chem.*, 261:1988-91, 1986.
107. HAUS, E. & TOUITOU, Y. Principles of clinical chronobiology. In: TOUITOU, Y. & HAUS, E., ed. *Biological rhythms in clinical and laboratory medicine*. Berlin, Springer, 1992. p. 6-34.
108. HAUTECOUVERTURE, M.; SLAMA, G.; ASSAN, R. & TCHOBROUTSKY, G. Sex related diurnal variations in venous blood glucose and plasma insulin levels. Effects of estrogens in men. *Diabetologia*, 10:725-30, 1974.
109. HEDESKOV, C. J. & CAPITO, K. The effect of starvation on insulin secretion and glucose metabolism in mouse pancreatic islets. *Biochem. J.*, 140:423-33, 1974.
110. _____ & _____. The pentose cycle and insulin release in isolated mouse pancreatic islets during starvation. *Biochem. J.*, 152:571-6, 1975.

111. HELLMAN, B. & HELLERSTRÖM, C. Diurnal changes in the function of the pancreatic islets of rats indicated by nuclear size in the islet cells. *Acta Endocrinol.*, 31:267-81, 1959.
112. _____; ANDERSSON, T.; BERGGREN, P.-O. & RORSMAN, P. Calcium and pancreatic B-cell function. XI. Modification of ^{45}Ca fluxes by Na^+ removal. *Biochem. Med.*, 24:142-52, 1980.
113. _____; GYLFE, E.; GRAPENGIESSER, E.; LUND, P.-E. & MARCSTRÖM, A. Cytoplasmic calcium and insulin secretion. *In*: FLATT, P.R., ed. *Nutrient regulation of insulin secretion*. London, Portland, 1992. p. 213-46.
114. HENQUIN, J.-C. D-glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islet cells. *Nature*, 271:271-3, 1978.
115. _____. Tolbutamide stimulation and inhibition of insulin release: studies of the underlying ionic mechanisms in isolated rat islets. *Diabetologia*, 18:151-160, 1980.
116. _____ & MEISSNER, H.P. Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells. *Experientia*, 40:1043-52, 1984.
117. _____; DEBUYSER, A.; DREWS, G. & PLANT, T.D. Regulation of K^+ permeability and membrane potential in insulin-secreting cells. *In*: FLATT P.R., ed. *Nutrient regulation of insulin secretion*. London, Portland, 1992. p. 173-91.
118. HERCHUELZ, A. & MALAISSE, W.J. Na-Ca and Ca-Ca exchange in pancreatic islets. *Diabetes*, 28:371, 1979. (Abstract).
119. _____ & _____. Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: two calcium movements' dissociated response to glucose. *Am. J. Physiol.*, 238:E87-E95, 1980.

120. HERCHUELZ, A. & MALAISSE, W.J. Calcium movements and insulin release in pancreatic islet cells. *Diabete & Metab.*, 7:283-8, 1981.
121. _____; COUTURIER, E. & MALAISSE, W.J. Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: glucose-induced calcium-calcium exchange. *Am. J. Physiol.*, 238:E96-E103, 1980.
122. _____; THONNART, N.; CARPINELLI, A.; SENER, A. & MALAISSE, W.J. Regulation of calcium fluxes in rat pancreatic islets: the role of K⁺ conductance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 215:213-20, 1980.
123. HOCKERMAN, G.H.; PETERSON, B.Z.; JOHNSON, B.D. & CATTERALL, W.A. Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37:361-96, 1997.
124. HOEL, P.G. *Estatística elementar*. Rio de Janeiro, Fundo de Cultura, 1961. p. 242-80.
125. HOLLEY, D.C. & EVANS, J.W. Effect of confinement on ovine glucose and immunoreactive insulin circadian rhythms. *Am. J. Physiol.*, 226:1457-61, 1974.
126. HOPKINS, W.F.; FATHERAZI, S.; PETER, R.B.; CORKEY, B.E.; COOK, D.L. Two sites for adenine-nucleotide regulation of ATP-sensitive potassium channels in mouse pancreatic beta-cells and HIT cells. *J. Membr. Biol.*, 129:287-95, 1992.
127. HOWELL, S.L.; GREEN, I.C. & MONTAGUE, W. A possible role of adenylate cyclase in the long-term dietary regulation of insulin secretion from rat islets of Langerhans. *Biochem. J.*, 136:343-9, 1973.
128. HUGUES, J.N.; REINBERG, A.; JORDAN, D.; SEBAOUN, J.; MODIGLIANI, E. & BURGER, A.G. Effects of starvation on circadian variations of plasma TSH in rats. *Acta Endocrinol.*, 101:403-7, 1982.

129. HUNG, C.T.; BEYER, J. & SCHULZ, G. Fasting and feeding variations of insulin requirements and insulin binding to erythrocytes at different times of the day in insulin-dependent diabetics assessed under the condition of glucose-controlled insulin infusion. *Horm. Metab. Res.*, 18:466-9, 1986.
130. IKONOMOV, O.C.; STOYNEV, A.G.; VRABCHEV, N.C.; SHISHEVA, A.C. & TARKOLEV, N.T. Circadian rhythms of food and 1% NaCl intake, urine and electrolyte excretion, plasma renin activity and insulin concentration in adrenalectomized rats. *Acta Physiol. Hung.*, 65:181-98, 1985.
131. INAGAKI, N.; GONOI, T.; CLEMENT, J.P.I.; MANGA, N.; INAZAWA, J.; GONZALES, G.; AGUILAR-BRYAN, L.; SEINO, S. & BRYAN, J. Reconstitution of I_{KATP} : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*, 270:1166-70, 1995.
132. IWASHITA, S.; KIM, Y.-B.; MIYAMOTO, H.; KOMURO, M.; TOKUYAMA, K. & SUZUKI, M. Diurnal rhythm of plasma insulin and glucose in rats made obese by a high fat diet. *Horm. Metab. Res.*, 28:199-201, 1996.
133. JANJIC, D. & WOLLHEIM, C.B. Interactions of Ca^{2+} , Mg^{2+} , and Na^{+} in regulation of insulin release from rat islets. *Am. J. Physiol.*, 244:E222-E229, 1983.
134. JARRETT, R. J. Diurnal variation on glucose tolerance: associated changes in plasma insulin, growth hormone and non-esterified fatty acids and insulin sensitivity. *Chronobiologia*, 1 (Suppl. 1):229-38, 1974.
135. _____ & KEEN, H. Diurnal variation of oral glucose tolerance: a possible pointer to the evolution of diabetes mellitus. *Br. Med. J.*, 2:341-4, 1969.
136. _____ & _____. Further observations on the diurnal variation in oral glucose tolerance. *Br. Med. J.*, 4:334-7, 1970.
137. _____; VIBERTI, G.C. & AL SAYEGH, H. Does "afternoon diabetes" predict diabetes? *Br. Med. J.*, 1:548-9, 1978.

138. JARRETT, R.J.; BAKER, I.A.; KEEN, H. & OAKLEY, N.W. Diurnal variation in oral glucose tolerance: blood sugar and plasma insulin levels morning, afternoon, and evening. *Br. Med. J.*, 1:199-201, 1972.
139. JASPAN, J.B.; LEVER, E.; POLONSKY, K.S. & VAN CAUTER, E. In vivo pulsatility of pancreatic islet peptides. *Am. J. Physiol.*, 251:E215-E226, 1986.
140. JOLIN, T. & MONTES, A. Daily rhythm of plasma glucose and insulin levels in rats. *Horm. Res.*, 4:153-6, 1973.
141. JOOST, H.G. & BECKMANN, J. On the relation of glucose and insulin secretion in the fasting state. *Metabolism*, 29:23-7, 1980.
142. KERN, W.; BORN, J.; FEHM, H.L. & KERNER, W. Sustained oscillatory insulin secretion after pancreas transplantation. *Horm. Metab. Res.*, 22:644-6, 1990.
143. KOERKER, D. J.; GOODNER, C. J.; HANSEN, B.W.; BROWN, A.C. & RUBENSTEIN, A.H. Synchronous sustained oscillation of C-peptide and insulin in the plasma of fasting monkeys. *Endocrinology*, 102:1649-52, 1978.
144. KOFINAS, A.D.; MEIS, P.J. & ROSE, J.C. Gestational diabetes reverses the circadian variation of plasma insulin response to intravenous glucose. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 159:607-11, 1988.
145. KOMATSU, M.; SCHERMERHORN, T.; NODA, M.; STRAUB, S.G.; AIZAWA, T. & SHARP, G.W.G. Augmentation of insulin release by glucose in the absence of extracellular Ca^{2+} . New insights into stimulus-secretion coupling. *Diabetes*, 46:1928-38, 1997.
146. KUKULJAN, M.; GONÇALVES, A.A. & ATWATER, I. Charybdotoxin-sensitive $K_{(Ca)}$ channel is not involved in glucose-induced electrical activity in pancreatic β -cells. *J. Membr. Biol.*, 119:187-95, 1991.

147. LACY, P.E. & KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, 16:35-9, 1967.
148. LAMBERT, A.E. & HOET, J. J. Diurnal pattern of plasma insulin concentration in the human. *Diabetologia*, 2:69-71, 1965.
149. LANG, D.A.; MATTHEWS, D.R.; BURNETT, M. & TURNER, R.C. Brief, irregular oscillations of basal plasma insulin and glucose concentrations in diabetic man. *Diabetes*, 30:435-9, 1981.
150. _____; _____; PETO, J. & TURNER, R.C. Cyclic oscillations of basal plasma glucose and insulin concentrations in human beings. *N. Engl. J. Med.*, 301:1023-7, 1979.
151. _____; _____; BURNETT, M.; WARD, G.M. & TURNER, R.C. Pulsatile, synchronous basal insulin and glucagon secretion in man. *Diabetes*, 31:22-6, 1982.
152. LARUE-ACHAGIOTIS, C. & LE MAGNEN, J. Fast-induced changes in plasma glucose, insulin and free fatty acid concentration compared in rats during the night and day. *Physiol. & Behav.*, 30:93-6, 1983.
153. LEBRUN, P.; MALAISSE, W.J. & HERCHUELZ, A. Evidence for two distinct modalities of Ca^{2+} influx into pancreatic B cell. *Am. J. Physiol.*, 242:E59-E66, 1982.
154. LEE, A.; BRAY, G.A. & KLETZKY, O. Nocturnal growth hormone secretion does not affect diurnal variations in arginine and glucose-stimulated insulin secretion. *Metabolism*, 40:181-6, 1991.
155. _____; ADER, M.; BRAY, G.A. & BERGMAN, R.N. Diurnal variation in glucose tolerance. Cyclic suppression of insulin action and insulin secretion in normal-weight, but not obese, subjects. *Diabetes*, 41:750-9, 1992.

156. LEFÈBVRE, P. J.; PAOLISSO, G.; SCHEEN, A. J. & HENQUIN, J.C. Pulsatility of insulin and glucagon release: physiological significance and pharmacological implications. *Diabetologia*, 30:443-52, 1987.
157. LENZEN, S. Glucokinase: signal recognition enzyme for glucose-induced insulin secretion. In: FLATT, R.P., ed. *Nutrient regulation of insulin secretion*. London, Portland, 1992. p. 101-24.
158. _____; TIEDGE, M. & PANTEN, U. Glibenclamide induces glucokinase in rat pancreatic islets and liver. *Biochem. Pharmacol.*, 35:2841-3, 1986.
159. LESAULT, A.; ELCHINGER, B. & DESBALS, B. Circadian rhythms of food intake, plasma glucose and insulin levels in fed and fasted rabbits. *Horm. Metab. Res.*, 23:515-6, 1991.
160. LEVY-MARCHAL, C.; ALBISSER, A.M. & ZINMAN, B. Overnight metabolic control with pulsed intermittent versus continuous subcutaneous insulin infusion. *Diabetes Care*, 6:356-60, 1983
161. LEVY, I.; RECASENS, A.; CASAMITJANA, R. & FIGUEROLA, D. Nocturnal insulin and C-peptide rhythms in normal subjects. *Diabetes Care*, 10:148-51, 1987.
162. LEVY, J.; HERCHUELZ, A.; SENER, A. & MALAISSE, W. J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XX. Fasting: a model for altered glucose recognition by the B-cell. *Metabolism*, 25:583-91, 1976.
163. LEWIS, S.B.; WALLIN, J.D.; KUZUYA, H.; MURRAY, W.K.; COUSTAN, D.R.; DAANE, T.A. & RUBENSTEIN, A.H. Circadian variation of serum glucose, C-peptide immunoreactivity and free insulin in normal and insulin-treated diabetic pregnant subjects. *Diabetologia*, 12:343-50, 1976.

164. LIMA, F.B.; HELL, N.S.; TIMO-IARIA, C.; SCIVOLETTO, R.; DOLNIKOFF, M.S. & PUPO, A.A. Metabolic consequences of food restriction in rats. *Physiol. & Behav.*, 27:115-23, 1981.
165. LIPKIN, E.W.; TELLER, D.C. & DE HAËN, C. Dynamic aspects of insulin action: synchronization of oscillatory glycolysis in isolated perfused rat fat cells by insulin and hydrogen peroxide. *Biochemistry*, 22:792-9, 1983.
166. LOUIS-SYLVESTRE, J. Feeding and metabolic patterns in rats with truncular vagotomy or with transplanted β -cells. *Am. J. Physiol.*, 235:E119-E125, 1978.
167. LUNDQUIST, I. & LÖVDAHL, R. Effect of fasting on islet lysosomal enzyme activities and the in vivo insulin response to different secretagogues. *Horm. Metab. Res.*, 15:11-4, 1983.
168. MACDONALD, M.J.; AL-MASRI, H.; JUMELLE-LACLAU, M. & CRUZ, M.O. Oscillations in activities of enzymes in pancreatic islet subcellular fractions induced by physiological concentrations of effectors. *Diabetes*, 46:1996-2001, 1997.
169. MAGNELLI, V.; POLLO, A.; SHER, E. & CARBONE, E. Block of non-L-, non-N-type Ca^{2+} channels in rat insulinoma RINm5F cells by ω -agatoxin IVA and ω -conotoxin MVIIC. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, 429:762-71, 1995.
170. MALAISSE, W.J. The use of perfused pancreatic islets to study insulin secretion and associated metabolic and ionic events. In: POISNER, A.M. & TRIFARÓ, J.M., ed. *In vitro methods for studying secretion*. Amsterdam, Elsevier, 1987. p.63-78.
171. _____. Regulation of insulin secretion by nutrients: the fuel concept. In: FLATT, P.R., ed. *Nutrient regulation of insulin secretion*. London, Portland, 1992. p. 83-100.

172. MALAISSE, W.J. & SENER, A. Glucose-induced changes in cytosolic ATP content in pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Acta*, 927:190-5, 1987.
173. _____; BRISSON, G.R. & BAIRD, L.E. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. X. Effect of glucose on ⁴⁵Ca efflux from perfused islets. *Am. J. Physiol.*, 224:389-94, 1973.
174. _____; MALAISSE-LAGAE, F. & WRIGHT, P.H. Effect of fasting upon insulin secretion in the rat. *Am. J. Physiol.*, 213:843-8, 1967.
175. _____; SENER, A. & LEVY, J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Fasting-induced adaptation of key glycolytic enzymes in isolated islets. *J. Biol. Chem.*, 251:1731-7, 1976.
176. _____; 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. Eur. J. Physiol.*, 373:237-42, 1978.
177. _____; SENER, A.; HERCHUELZ, A. & HUTTON, J.C. Insulin release: the fuel hypothesis. *Metabolism*, 28:373-86, 1979.
178. _____; _____; KOSER, M.; RAVAZZOLA, M. & MALAISSE-LAGAE, F. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Insulin release due to glycogenolysis in glucose-deprived islets. *Biochem. J.*, 164:447-54, 1977.
179. MALATOVÁ, Z. & AHLERS, I. Diurnal rhythm corticosterone in fasted rats. *Endocrinol. Exp.*, 11:241-8, 1977.
180. MALHERBE, C.; DE GASPARO, M.; DE HERTOOGH, R. & HOET, J. J. Circadian variations of blood sugar and plasma insulin levels in man. *Diabetologia*, 5:397-404, 1969.

181. MARLISS, E.B.; AOKI, T.T.; UNGER, R.M.; SOELDNER, J. & GAHILL, G.F. Glucagon levels and metabolic effects in fasting man. *J. Clin. Invest.*, 49:2256-70, 1970.
182. MARSH, B.D.; MARSH, D.J. & BERGMAN, R.N. Oscillations enhance the efficiency and stability of glucose disposal. *Am. J. Physiol.*, 250:E576-E582, 1986.
183. MARTIN, R. J.; WANGSNESS, P. J. & GAHAGAN, J.H. Diurnal changes in serum metabolites and hormones in lean and obese Zucker rats. *Horm. Metab. Res.*, 10:187-92, 1978.
184. MATSCHINSKY, F.M.; ELLERMAN, J.E.; KRZANOWSKI, J.; KOTLER-BRAJTBURG, J.; LANDGRAF, R. & FERTEL, R. The dual function of glucose in islets of Langerhans. *J. Biol. Chem.*, 246:1007-11, 1971.
185. MATTHEWS, D.R. Physiological implications of pulsatile hormone secretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 618:28-37, 1991.
186. _____; LANG, D.A.; BURNETT, M.A. & TURNER, R.C. Control of pulsatile insulin secretion in man. *Diabetologia*, 24:231-7, 1983a.
187. _____; NAYLOR, B.A.; JONES, R.G.; WARD, G.M. & TURNER, R.C. Pulsatile insulin has greater hypoglycemic effect than continuous delivery. *Diabetes*, 32:617-21, 1983b.
188. MEIJER, J.H. & RIETVELD, W. J. Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol. Rev.*, 69:671-707, 1989.
189. MÉJEAN, L.; KOLOPP, M. & DROUIN, P. Chronobiology, nutrition and diabetes mellitus. In: TOUITOU, Y. & HAUS, E., ed. *Biological rhythms in clinical and laboratory medicine*. Berlin, Springer, 1992. p. 375-85.

190. MÉJEAN, L.; BICAKOVA-ROCHER, A.; KOLOPP, M.; VILLAUME, C.; LEVI, F.; DEBRY, G.; REINBERG, A. & DROUIN, P. Circadian and ultradian rhythms in blood glucose and plasma insulin of healthy adults. *Chronobiol. Int.*, 5:227-36, 1988.
191. MELANI, F.; VERRILLO, A.; MARASCO, M.; RIVELLES, A.; OSORIO, J. & BERTOLINI, M.G. Diurnal variation in blood sugar and serum insulin in response to glucose and/or glucagon in healthy subjects. *Horm. Metab. Res.*, 8:85-8, 1976.
192. MICHEL, S.; GEUSZ, M.E.; ZARITSKY, J. J. & BLOCK, G.D. Circadian rhythm in membrane conductance expressed in isolated neurons. *Science*, 259:239-41, 1993.
193. MINORS, D.S. & WATERHOUSE, J.M. Circadian rhythms and their mechanisms. *Experientia*, 42:1-13, 1986.
194. MISLER, D.S.; FALKE, L.C.; GILLIS, K. & McDANIEL, M.L. A metabolite regulated potassium channel in rat pancreatic β cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 83:7119-23, 1986.
195. MLEKUSCH, W.; PALLETA, B.; TRUPPE, W.; PASCHKE, E. & GRIMUS, R. Plasma concentrations of glucose, corticosterone, glucagon and insulin and liver content of metabolic substrates and enzymes during starvation and additional hypoxia in the rat. *Horm. Metab. Res.*, 13:612-4, 1981.
196. MOORE-EDE, M.C. Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis. *Am. J. Physiol.*, 250:R737-52, 1986.
197. MOSKALEWSKI, S. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 5:342-53, 1965.
198. NEWSHOLME, E.A. Substrate cycles: their metabolic, energetic and thermic consequences in man. *Biochem. Soc. Symp.*, 43:183-205, 1978.

206. POLAK, J.M.; PEARSE, A.G.E.; VAN MOURIK, M. & MAYERSBACH, H.v.
Circadian rhythms of the endocrine pancreas. A quantitative biochemical
and immunocytochemical study. *Acta Hepato-Gastroenterol.*, 22:118-22,
1975.
207. POLONSKY, K.S.; GIVEN, B.D. & VAN CAUTER, E. Twenty-four-hour profiles
and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J.
Clin. Invest.*, 81:442-8, 1988.
208. _____; _____; HIRSCH, L.J.; TILLIL, H.; SHAPIRO, E.T.; BEEBE, C.;
FRANK, B.H.; GALLOWAY, J.A. & VAN CAUTER, E. Abnormal patterns
of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J.
Med.*, 318:1231-9, 1988.
209. PØRKSEN, N.; MUNN, S.; STEERS, J.; VELDHUIS, J.D. & BUTLER, P.C.
Effects of glucose ingestion versus infusion on pulsatile insulin secretion.
The incretin effect is achieved by amplification of insulin secretory burst
mass. *Diabetes*, 45:1317-23, 1996.
210. PRENTKI, M. & MATSCHINSKY, F.M. Ca^{2+} , cAMP, and phospholipid-derived
messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol. Rev.*,
67:1185-1248, 1987.
211. _____ & WOLLHEIM, C.B. Cytosolic free Ca^{2+} in insulin secreting cells
and its regulation by isolated organelles. *Experientia*, 40:1052-60, 1984.
212. _____; TORNHEIM, K. & CORKEY, B.E. Signal transduction
mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. *Diabetologia*, 40:S32-
S41, 1997.
213. RABINOVITCH, A.; GRILL, V.; RENOLD, A.E. & CERASI, E. Insulin release
and cyclic AMP accumulation in response to glucose in pancreatic islets of
fed and starved rats. *J. Clin. Invest.*, 58:1209-16, 1976.

214. RAJAN, A.S.; AGUILAR-BRYAN, L.; NELSON, D.A.; YANEY, G.C.; HSU, W.H.; KUNZE, D.L. & BOYD III, A.E. Ion channels and insulin secretion. *Diabetes Care*, 13:340-63, 1990.
215. RAPP, P.E.; MEES, A.I. & SPARROW, C.T. Frequency encoded biochemical regulation is more accurate than amplitude dependent control. *J. Theor. Biol.*, 90:531-44, 1981.
216. REINBERG, A. Chronobiology and nutrition. *Chronobiologia*, 1:22-7, 1974.
217. _____. Chronobiology and nutrition. In: _____ & SMOLENSKY, M.H., ed. *Biological rhythms and medicine*. New York, Springer, 1983. p. 265-300.
218. _____ & SMOLENSKY, M.H. Introduction to chronobiology. In: _____, ed. *Biological rhythms and medicine*. New York, Springer-Verlag, 1983. p. 1-21.
219. RIGAS, A.N.; BITTLES, A.H.; HADDEN, D.R. & MONTGOMERY, D.A.D. Circadian variation of glucose, insulin, and free fatty acids during long-term use of oral hypoglycaemic agents in diabetes mellitus. *Br. Med. J.*, 4:25-8, 1968.
220. ROBERTS, H.J. Afternoon glucose tolerance testing: a key to the pathogenesis, early diagnosis and prognosis of diabetic hyperinsulinism. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 12:423-72, 1964.
221. RORSMAN, P. The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia*, 40:487-95, 1997.
222. _____ & TRUBE, G. Biophysics and physiology of ATP-regulated K⁺ channels. In: COOK, N.S., ed. *Potassium channels: structure function and therapeutic potential*. Chichester, Ellis Horwood, 1990. p. 300-26.

223. RORSMAN, P.; BOKVIST, K.; ÄMMÄLÄ, C. & ELIASSON, L. Ca^{2+} -channels, cytoplasmic Ca^{2+} -concentration and exocytosis in pancreatic B-cells. In: FLATT, P.R. & LENZEN, S., ed. *Frontiers of insulin secretion and pancreatic B-cell research*. London, Smith-Gordon & Nishimura, 1994. p. 187-194.
224. _____; BOKVIST, K.; ÄMMÄLÄ, C.; ARKHAMMAR, P.; BERGGREN, P.-O.; LARSSON, O. & WAHLANDER, K. Activation by adrenaline of a low-conductance G protein-dependent K^+ channel in mouse pancreatic B cells. *Nature*, 349:77-9, 1991.
225. SAFARIK, R.H.; JOY, R.M. & CURRY, D.L. Episodic release of insulin by rat pancreas: effects of CNS and state of satiety. *Am. J. Physiol.*, 254:E384-E388, 1988.
226. SAKAGUCHI, T.; TAKAHASHI, M. & BRAY, G.A. Diurnal changes in sympathetic activity: relation to food intake and to insulin injected into the ventromedial or suprachiasmatic nucleus. *J. Clin. Invest.*, 82:282-6, 1988.
227. SANTOS, R.M.; ROSARIO, L.M.; NADAL, A.; GARCIA-SANCHO, J.; SORIA, B. & VALDEOLMILLOS, B. Widespread synchronous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, 418:417-22, 1991.
228. SATO, Y.; AIZAWA, T.; KOMATSU, M.; OKADA, N. & YAMADA, T. Dual functional role of membrane depolarization/ Ca^{2+} influx in rat pancreatic B-cell. *Diabetes*, 41:438-43, 1992.
229. SCHAUDER, P.; McINTOSH, C.; ARENDS, J. & FRERICHS, H. Effect of fasting on the release of insulin and somatostatin from perfused islets of Langerhans. *Diabetes*, 28:204-7, 1979.
230. SEINO, S. CACN4, the major alpha 1 subunit isoform of voltage-dependent calcium channels in pancreatic beta-cells: a minireview of current progress. *Diabetes Res. Clin. Pract. (Suppl.)*:S99-S103, 1995.

231. SENER, A.; LEVY, J. & MALAISSE, W.J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Does glycolysis control calcium transport in the B-cell? *Biochem. J.*, 156:521-525, 1976.
232. SENSI, S.; PACE-PALITTI, V. & GUAGNANO, M.T. Chronobiology in endocrinology. *Ann. Ist. Super. Sanita*, 29:613-31, 1993.
233. _____; CAPANI, F.; CARADONNA, P. & DELL'ACQUA, G.B. Circadian rhythm of immunoreactive insulin under glycemic stimulus. *J. Interdiscipl. Cycle Res.*, 4:1-13, 1973.
234. _____; _____; _____; POLICICCHIO, D. & CAROTENUTO, M. Comportamento nelle 24 ore della risposta insulinemica ad un costante e ripetuto carico di glucosio in soggetti normali. *Acta Diabetol. Lat.*, 8:957-69, 1971.
235. SERVICE, F.J.; HALL, L.D.; WESTLAND, R.E.; O'BRIEN, P.C.; GO, V.L.W.; HAYMOND, M.W. & RIZZA, R.A. Effects of size, time of day and sequence of meal ingestion on carbohydrate tolerance in normal subjects. *Diabetologia*, 25:316-21, 1983.
236. SHAPIRO, E.T.; TILLIL, H.; POLONSKY, K.S.; FANG, V.S.; RUBENSTEIN, A.H. & VAN CAUTER, E. Oscillations in insulin secretion during constant glucose infusion in normal man: relationship to changes in plasma glucose. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 67:307-14, 1988.
237. SIEGEL, E.G.; WOLLHEIM, C.B.; RENOLD, A.E. & SHARP, G.W.G. Evidence for the involvement of Na/Ca exchange in glucose-induced insulin release from rat pancreatic islets. *J. Clin. Invest.*, 66:996-1003, 1980.
238. SIMON, C.; BRANDENBERGER, G. & FOLLENIUS, M. Ultradian oscillations of plasma glucose, insulin, and C-peptide in man during continuous enteral nutrition. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 64:669-74, 1987.

239. SIMON, C.; FOLLENIUS, M. & BRANDENBERGER, G. Postprandial oscillations of plasma glucose, insulin and C-peptide in man. *Diabetologia*, 30:769-73, 1987.
240. SIMONNET, G. The scintillation counter. In: SLATER, R. J., ed. *Radioisotopes in biology. A practical approach*. Oxford, IRL & Oxford University, 1990. p. 31-85.
241. SMAJDA, B.; JALC, P. & AHLERS, I. Circadian rhythm and food and water intake in rats irradiated with a non-lethal dose of x-rays at different times of the day. *Physiol. Bohemoslov.*, 31:427-31, 1982.
242. SMITH, P.A.; RORSMAN, P. & ASHCROFT, F.M. Modulation of dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} -channels by glucose metabolism in mouse pancreatic B-cells. *Nature*, 342:550-3, 1989.
243. SMOLENSKY, M.H. & D'ALONZO, G.E. Medical chronobiology: concepts and applications. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 147:S2-S19, 1993.
244. SONNENBERG, G.E.; HOFFMANN, R.G.; JOHNSON, C.P. & KISSEBAH, A.H. Low-and high-frequency insulin secretion pulses in normal subjects and pancreas transplant recipients: role of extrinsic innervation. *J. Clin. Invest.*, 90:545-53, 1992.
245. STAGNER, J.I.; SAMOLS, E. & WEIR, G.C. Sustained oscillations of insulin, glucagon, and somatostatin from the isolated canine pancreas during exposure to a constant glucose concentration. *J. Clin. Invest.*, 65:939-42, 1980.
246. STEFFENS, A.B. Plasma insulin content in relation to blood glucose level and meal pattern in the normal and hypothalamic hyperphagic rat. *Physiol. & Behav.*, 5:147-51, 1970.

247. STURIS, J.; SCHEEN, A.J.; LEPROULT, R.; POLONSKI, K.S. & VAN CAUTER, E. 24-hour glucose profiles during continuous or oscillatory insulin infusion. Demonstration of the functional significance of ultradian insulin oscillations. *J. Clin. Invest.*, 95:1464-71, 1995.
248. _____; O'MEARA, N.M. & SHAPIRO, E.T.; BLACKMAN, J.D.; TILLIL, H.; POLONSKI, K.S. & VAN CAUTER, E. Differential effects of glucose stimulation upon rapid pulses and ultradian oscillations of insulin secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 76:895-901, 1993.
249. SUTTON, R.; PETERS, M.; McSHANE, P.; GRAY, D.W.R. & MORRIS, P.J. Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase. *Transplantation*, 42:689-91, 1986.
250. TABCHARANI, J.A. & MISLER, S. Ca^{2+} - activated K^{+} channel in rat pancreatic islet B cells: permeation, gating and blockade by cations. *Biochim. Biophys. Acta*, 982:62-72, 1989.
251. TADAYYON, M.; BONNEY, R.C. & GREEN, I.C. Starvation decreases insulin secretion, prostaglandin E_2 production and phospholipase A_2 activity in rat pancreatic islets. *J. Endocrinol.*, 124:455-61, 1990.
252. TAMARIT-RODRIGUEZ, J.; VARA, E. & TAMARIT, J. Starvation-induced secretory changes of insulin, somatostatin, and glucagon and their modification by 2-bromostearate. *Horm. Metab. Res.*, 16:115-9, 1984.
253. TEDFORD, B.L. & MEIER, A.H. Daily rhythm of plasma insulin in japanese quail (*Coturnix c. japonica*) fed *ad libitum*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104A:143-5, 1993.
254. TIEDGE, M. & LENZEN, S. Effects of glucose refeeding and glibenclamide treatment on glucokinase and GLUT 2 gene expression in pancreatic B-cells and liver from rats. *Biochem. J.*, 308:139-144, 1995.

255. TIEDGEN, M. & SEITZ, H. J. Dietary control of circadian variations in serum insulin, glucagon and hepatic cyclic AMP. *J. Nutr.*, 110:876-82, 1980.
256. TORNHEIM, K. Are metabolic oscillations responsible for normal oscillatory insulin secretion? *Diabetes*, 46:1375-80, 1997.
257. TRUBE, G.; RORSMAN, P. & OHNO-SHOSAKU, T. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K⁺ channel in mouse pancreatic beta-cells. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, 407:493-9, 1986.
258. TUREK, F.W. Circadian rhythms. *Recent. Prog. Horm. Res.*, 49:43-90, 1994.
259. TURVER, K. E. Cerenkov radiation from cosmic rays. *Sci. Prog.*, 72:173-88, 1988.
260. UCHIYAMA, Y. & WATANABE, M. Correlation of rhythmic variations in subcellular structures of rat hepatocytes, pancreatic acinar cells, and islet B cells. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 227A:153-62, 1987.
261. VAN CAUTER, E. Endocrine rhythms. *In: ARENDT, J.; MINORS, D.S. & WATERHOUSE, J.M., ed. Biological rhythms in clinical practice.* London, Butterworth, 1989. p. 23-50.
262. _____. Diurnal and ultradian rhythms in human endocrine function: a minireview. *Horm. Res.*, 34:45-53, 1990.
263. _____ & TUREK, F.W. Endocrine and other biological rhythms. *In: DeGROOT, L. J., ed. Endocrinology.* Philadelphia, Saunders, 1995. v. 3, p. 2487-2548.
264. _____; SHAPIRO, E.T.; TILLIL, H. & POLONSKY, K.S. Circadian modulation of glucose and insulin responses to meals: relationship to cortisol rhythm. *Am. J. Physiol.*, 262:E467-E475, 1992.

265. VAN CAUTER, E.; DÉSIR, D.; DECOSTER, C.; FÉRY, F. & BALASSE, E.O. Nocturnal decrease in glucose tolerance during constant glucose infusion. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 69:604-611, 1989.
266. _____; BLACKMAN, J.D.; ROLAND, D.; SPIRE, J-P.; REFETOFF, S. & POLONSKY, K.S. Modulation of glucose regulation and insulin secretion by circadian rhythmicity and sleep. *J. Clin. Invest.*, 88:934-42, 1991.
267. VARA, E.; FERNÁNDEZ-MARTIN, O.; GARCIA, C. & TAMARIT-RODRÍGUEZ, J. Palmitate dependence of insulin secretion, "de novo" phospholipid synthesis and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -turnover in glucose stimulated rat islets. *Diabetologia*, 31:687-93, 1988.
268. VERRILLO, A.; DE TERESA, A. & RUCCO, E. Circadian variation in glucose tolerance and associated changes in plasma insulin and somatostatin levels in normal volunteers. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 60:2261-6, 1984.
269. VILLAUME, C.; BECK, B.; DOLLET, J.M.; POINTEL, J.P.; DROUIN, P. & DEBRY, G. 28-hour profiles of blood glucose (BG), plasma immunoreactive insulin (IRI) and IRI/BG ratio in four insulinomas. *Ann. Endocrinol.*, 45:155-60, 1984.
270. WAHL, M.A.; WALDNER, R.G & AMMON, H.P.T. Potassium permeability of fetal rat pancreatic islets: abnormal sensitivity to glucose. *Life Sci.*, 51:1631-7, 1992.
271. WALSH, C.H. & WRIGHT, A.D. Diurnal patterns of oral glucose tolerance in diabetics. *Post. Grad. Med. J.*, 51:169-72, 1975.
272. WATANABE, M. & UCHIYAMA, Y. Twenty-four hour variations in subcellular structures of rat pancreatic B-, A- and D-cells, and of portal plasma glucose and insulin levels. *Cell Tissue Res.*, 253:337-45, 1988.
273. WATERHOUSE, J. & MINORS, D. Masking and entrainment. *Adv. Biosci.*, 73:163-71, 1988.

274. WEIGLE, D.S. Pulsatile secretion of fuel-regulatory hormones. *Diabetes*, 36:764-75, 1987.
275. WELSH, M. & ANDERSSON, A. Effects of starvation on oxidative metabolism and insulin release by isolated mouse pancreatic islets. *Acta Endocrinol.*, 101:227-34, 1982.
276. WETTERBERG, L. Light and biological rhythms. *J. Intern. Med.*, 235:5-19, 1994.
277. WHICHELOW, M. J.; STURGE, R.A.; KEEN, H.; JARRETT, R. J.; STIMMLER, L. & GRAINGER, S. Diurnal variation in response to intravenous glucose. *Br. Med. J.*, 1:488-91, 1974.
278. WOJTCZAK-JAROSZOWA, J. Physiological and clinical aspects of circadian variations in glucose tolerance. *Chronobiologia*, 4:363-84, 1977.
279. WOLLHEIM, C.B. & SHARP, G.W.G. Regulation of insulin release by calcium. *Physiol. Rev.*, 61:914-73, 1981.
280. WOLLNIK, F. Physiology and regulation of biological rhythms in laboratory animals: an overview. *Lab. Anim.*, 23:107-25, 1989.
281. WOLTERS, G.H. J.; KONIJNENDIJK, W. & BOUMAN, P.R. Effects of fasting on insulin secretion, islet glucose metabolism, and the cyclic adenosine 3',5'- monophosphate content of rat pancreatic islets in vitro. *Diabetes*, 26:530-7, 1977.
282. _____; WIEGMAN, J.B. & KONIJNENDIJK, W. Effect of fasting on the ⁴⁵Ca uptake and the total Ca content of isolated pancreatic islets of rats and obese mice. *Diabetologia*, 21:344, 1981. (Abstract).
283. YALOW, R.S. & BERSON, S.A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.*, 39:1157-75, 1960.

284. YAMAMOTO, H.; NAGAI, K. & NAKAGAWA, H. Role of SCN in daily rhythms of plasma glucose, FFA, insulin and glucagon. *Chronobiol. Int.*, 4:483-91, 1987.
285. ZAR, J. H. *Biostatistical analysis*. Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1984.
286. ZAWALICH, W.; DYE, E.S.; PAGLIARA, A.S.; ROGNSTAD, R. & MATSCHINSKY, F.M. Starvation diabetes in the rat: onset, recovery, and specificity of reduced responsiveness of pancreatic β -cells. *Endocrinology*, 104:1344-51, 1979.
287. ZIMMET, P.Z.; WALL, J.R.; ROME, R.; STIMMLER, L. & JARRETT, R. J. Diurnal variation in glucose tolerance: associated changes in plasma insulin, growth hormone, and non-esterified fatty acids. *Br. Med. J.*, 1:485-8, 1974.
288. ZUCKER, I.; RUSAK, B. & KING Jr, R.G. Neural bases for circadian rhythms in rodent behavior. *Adv. Psychobiol.*, 3:35-74, 1976.