

LUÍS CARLOS REIS

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA  
TESE DEFENDIDA PELO SR. LUÍS CARLOS REIS E APRO-  
VADA PELA COMISSÃO JULGADORA.

29/06/84

Boechius

SECREÇÃO DE INSULINA E A PERMEABILIDADE

DAS ILHOTAS DE LANGERHANS AO  $K^+$ :

EFEITOS DA 4-AMINOPIRIDINA

Tese apresentada ao Instituto  
de Biologia da Universidade  
Estadual de Campinas, para a  
habilitação ao grau de Mestre  
em Ciências Biológicas, área  
de Fisiologia e Biofísica.

Campinas - São Paulo

1984

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus mestres da vida,

José e Abigail;

À minha companheira de to  
das as horas,

Candida Rosa,

dedico

## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. ANTONIO CARLOS BOSCHERO, pela amizade, compreensão, orientação segura e a oportunidade de minha iniciação à Fisiologia das ilhotas de Langerhans.

- Ao Prof. Dr. LUCAS VOGEL pelo incentivo e ensinamentos dedicados à minha formação dentro e fora da Fisiologia Animal.

- Ao Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela compreensão, dedicação e ao meu engajamento às Ciências Fisiológicas.

- Ao Prof. Dr. ANTONIO ARI GONÇALVES, pelas valiosas sugestões na execução e na dissertação do presente trabalho.

- Aos Professores e Funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Estadual de Campinas, pela amizade e apoio na realização deste trabalho.

- Aos Profs. Drs. ANIBAL EUGENIO VERCESI, ANTONIO ARI GONÇALVES e MARCOS DIAS FONTANA, pelas sugestões apresentadas durante o exame de pré-banca.

- Aos Colegas Mestrandos, pela amizade e colaboração direta ou indireta no presente estudo.

- Aos colegas Profs. ONEIDA DIAS e AVELINO LEONARDO DA SILVA pela amizade, incentivo e apoio operacional ou espiritual na realização deste trabalho.

- Aos colegas Profs. MARIA LUIZA DOS SANTOS e EDSON DELATTRE pela amizade e valiosa colaboração na dosagem de insulina.

- Às Sras. MARIA AUXILIADORA VIEIRA BRITO e MARCIA

DA SILVA RICARDO DE AGUIAR pelos serviços de datilografia.

- Aos Srs. ESMERALDA CHETTA BORCHI e GILBERTO DA SILVA REIS pelos serviços de composição gráfica.

- À minha esposa CANDIDA pelo incentivo e a revisão dos textos.

- Às Universidades Federal Rural do Rio de Janeiro e Estadual de Campinas, que possibilitaram a minha matrícula no Curso de Pós-Graduação.

- À CAPES/PICD/UFRRJ, pela concessão da bolsa de estudo.

- À FAPESP, pelo auxílio financeiro prestado na execução da linha de pesquisa, supervisionada pelo Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero.

- Àqueles, que nos incentivaram ou apoiaram, mas que involuntariamente omitimos seus nomes.

OBRIGADO

## ÍNDICE

|                                                                                                    | Página |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| I - INTRODUÇÃO .....                                                                               | 01     |
| 1. SECREÇÃO DE INSULINA .....                                                                      | 01     |
| 1.1. MOBILIZAÇÃO IÔNICA NAS CÉLULAS BETA - PARTICIPAÇÃO DOS ÍONS $K^+$ E $Ca^{2+}$ .....           | 03     |
| 1.2. ATIVAÇÃO DO SISTEMA EFETOR - IMPORTÂNCIA DOS ÍONS $Ca^{2+}$ PARTICIPAÇÃO DA CALMODULINA ..... | 06     |
| 2. AÇÃO DA 4-AMINOPIRIDINA E OUTRAS AMINOPIRIDINAS EM SISTEMAS BIOLÓGICOS .....                    | 09     |
| 3. PROPOSIÇÃO DO TRABALHO .....                                                                    | 23     |
| II - MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                      | 24     |
| 1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO .....                                                                 | 24     |
| 2. ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS DE RATO ...                                                  | 24     |
| 3. EFLUXO DO $^{86}Rb$ POR ILHOTAS ISOLADAS .....                                                  | 26     |
| 4. INCORPORAÇÃO DE $^{45}Ca$ POR ILHOTAS ISOLADAS ....                                             | 28     |
| 5. OXIDAÇÃO DA GLICOSE POR ILHOTAS ISOLADAS .....                                                  | 29     |
| 6. DINÂMICA DA SECREÇÃO DE INSULINA E EFLUXO DO $^{45}Ca$ POR ILHOTAS ISOLADAS .....               | 31     |
| 7. DOSAGEM DA INSULINA SECRETADA POR ILHOTAS ISOLADAS .....                                        | 32     |

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 8. SOLUÇÕES .....                                                                                                                             | 34 |
| 9. RADIOISÓTOPOS E REAGENTES .....                                                                                                            | 36 |
| 10. TRATAMENTO ESTATÍSTICO .....                                                                                                              | 37 |
| III - RESULTADOS .....                                                                                                                        | 38 |
| 1. EFEITO DA 4-AP (10,0 mM) SOBRE A SECREÇÃO DE<br>INSULINA E O EFLUXO DE $^{45}\text{Ca}$ POR ILHOTAS ISOLA-<br>DAS E PERFUNDIDAS .....      | 38 |
| 2. EFEITO DA 4-AP SOBRE O EFLUXO DO $^{86}\text{Rb}$ , POR ILHO<br>TAS ISOLADAS E PERFUNDIDAS, NA AUSÊNCIA OU NA<br>PRESENÇA DE GLICOSE ..... | 41 |
| 3. EFEITO DA 4-AP (10,0 mM) SOBRE A INCORPORAÇÃO<br>DE $^{45}\text{Ca}$ , POR ILHOTAS ISOLADAS E INCUBADAS .....                              | 51 |
| 4. EFEITO DA 4-AP (10,0 mM) SOBRE O METABOLISMO<br>DA GLICOSE, POR ILHOTAS ISOLADAS E INCUBADAS .                                             | 56 |
| IV - DISCUSSÃO .....                                                                                                                          | 58 |
| V - RESUMO E CONCLUSÕES .....                                                                                                                 | 75 |
| VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                         | 79 |

## I - INTRODUÇÃO

### 1. Secreção de insulina

Em condições fisiológicas, a manutenção da normoglicemia é fundamentalmente dependente da liberação de insulina pelas células beta das ilhotas de Langerhans. O controle da taxa secretória de insulina é exercida por uma grande diversidade de fatores nutricionais, humorais e neurais (MALAISSE, 1972; GERICH, CHARLES e GRODSKY, 1976; UNGER, DOBBS e ORCI, 1978; CREUTZFELDT, 1979). A participação do eixo êntero-insular na regulação da secreção de insulina tem recebido atenção especial nos últimos quinze anos (UNGER e EISENTRAUT, 1969; CREUTZFELDT, FEURLE e KETTERER, 1970; PEDERSON, SCHUBERT e BROWN, 1975; CREUTZFELDT et alii, 1976; ROSS, BROWN e DUPRÉ, 1977; CREUTZFELDT et alii, 1978; DANIEL, 1978; LARSSON et alii, 1978; CREUTZFELDT, 1979).

Afora os controles extrínsecos da liberação de insulina, têm sido propostos, mecanismos intrínsecos inerentes ao próprio ambiente insular (ORCI e UNGER, 1975; ORCI et alii, 1975; ORCI, 1976; BENNETT e GOODENOUGH, 1978; BAETENS et alii, 1979; KOHEN et alii, 1979; UNGER, 1981; KATAOKA et alii, 1982).

Usualmente, nos animais superiores, a glicose é o secretagogo natural que deflagra o processo de secreção de insulina pelas células beta. No entanto, outros açúcares, aminoácidos e ácidos graxos metabolizáveis desempenham papel importante, de acordo com certas condições fisiológicas ou diferentes regimes alimentares, aos quais o organismo animal for submetido.

O mecanismo de secreção de insulina, envolve uma sé-

rie de eventos interrelacionados que se inicia com o reconhecimento da glicose por um "sistema beta-glicocitossensor". A propriedade da célula beta reconhecer as flutuações da glicemia, inequivocamente, depende do metabolismo da glicose. Nesse sentido, a literatura tem registrado vários trabalhos abordando este aspecto (GAGLIARDINO e MARTIN, 1966; MALAISSE, MALAISSE-LAGAE e MAYHEW, 1967; MATCHINSKY et alii, 1971; MALAISSE et alii, 1976a, b, c, d; SENER, LEVY e MALAISSE, 1976; MALAISSE et alii, 1978b, c, d; MALAISSE et alii, 1979a, b; ISHIBASHI et alii, 1980). Nesse grupo de autores, MATCHINSKY et alii (1971), apresentaram a hipótese adicional de que o efeito insulínico da glicose decorreria de uma ação primária em um sítio receptor. Esta idéia foi, a seguir, progressivamente rebatida, em favor de uma mediação metabólica da glicose. No conjunto, os resultados obtidos por aqueles autores convergem para um ponto comum, a glicose precisa ser oxidada para que se inicie o mecanismo de secreção de insulina. Em consequência do metabolismo da glicose, uma série de produtos intermediários são formados, associados a um aumento da produção de adenosina trifosfato (ATP), adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e da geração de nucleotídeos piridínicos reduzidos ( $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ). Em decorrência do aumento do potencial de oxi-redução das células beta, admite-se o estabelecimento de uma cadeia de eventos integrados, que começa com alterações da permeabilidade iônica da membrana, e culmina com a ativação do sistema efetor de extrusão das vesículas secretórias. Em revisões pormenorizadas, HEDESKOV (1980) e WOLLHEIM e SHARP (1981) assinalam a importância do metabolismo da glicose, na geração de sinais que ativam a secreção de insulina e, adicionalmente, mencionam os principais adeptos desta hipótese.

### 1.1. Mobilização iônica nas células beta - Participação dos íons $K^+$ e $Ca^{2+}$

Consequentemente ao metabolismo da glicose, uma série de alterações da permeabilidade iônica, ocorre na membrana das células beta. Vários autores têm discutido a integração entre os sinais bioelétricos, induzidos pela glicose, e o mecanismo que dispara o processo secretório de insulina. Assim, DEAN e MATTHEWS (1968, 1970a, b) observaram uma estreita relação entre concentrações de glicose introduzidas em meio perfusor e aparecimento de uma atividade elétrica típica em células beta impaladas. MEISSNER (1976) e MEISSNER e ATWATER (1976) demonstraram que a repolarização da membrana das células beta não atingia a fase de repouso enquanto se mantivesse a glicose no meio perfusor. Esses mesmos autores constataram uma característica bifásica da atividade elétrica das células beta, coincidentes com o padrão bimodal de secreção de insulina. Esses trabalhos foram fundamentais para a observação de que a atividade elétrica das células beta, induzida pela glicose, guarda relações temporais muito próximas com a secreção pulsátil de insulina.

Por outro lado, DEAN e MATTHEWS (1970b), MEISSNER e SCHMELZ (1974) e ATWATER e BEIGELMAN (1976) demonstraram uma inibição da atividade elétrica quando se omitiam os íons  $Ca^{2+}$  do meio perfusor.

Ademais, MATTHEWS e SAKAMOTO (1975), SEHLIN e TALJEDAL (1975), BOSCHERO et alii (1977), ATWATER, RIBALET e ROJAS (1978), HENQUIN (1978a) e MALAISSE et alii (1978a) direta ou indiretamente comprovaram que a redução do efluxo do  $K^+$  é a alteração da permeabilidade iônica mais precocemente induzida,

quando ilhotas pancreáticas são perfundidas na presença de glicose. Esta retenção transitória de íons  $K^+$  contribui efetivamente para a despolarização inicial das células beta e disparo de uma atividade elétrica rítmica, intimamente associada com a secreção de insulina. Em analogia, HENQUIN (1977) demonstrou uma potencialização da secreção de insulina provocada pelo tetratilamônio (TEA), um bloqueador dos canais de  $K^+$  - voltagem dependentes. Obtendo resultados concordantes, CARPINELLI e MALAISSE (1980), demonstraram que o TEA induz uma ação sinérgica com a glicose sobre a redução do efluxo do  $K^+$ .

Em recente estudo, BOSCHERO et alii (1982), demonstraram que a menadione (um aceptor de elétrons), antagoniza o efeito depressor da glicose sobre a condutância do  $K^+$ , inibindo a atividade elétrica das células beta. Essas conclusões foram parcialmente elaboradas a partir de resultados previamente obtidos, por MALAISSE et alii (1978c, d). Esses autores observaram que a menadione reduz a disponibilidade metabólica de ATP e nucleotídeos piridínicos reduzidos e inibe a taxa secretória de insulina.

Similarmente, BOSCHERO et alii (1983), demonstraram uma inibição da atividade elétrica das células beta, induzida pela valinomicina (um ionóforo de  $K^+$ ). Esses autores concluíram que a ação inibitória da valinomicina sobre a secreção de insulina deve-se, basicamente a uma interferência com a despolarização da membrana, induzida pela glicose. O antibiótico aumenta a permeabilidade da membrana ao  $K^+$ , hiperpolarizando-a.

Estudos sobre a inibição da permeabilidade do  $K^+$  em células beta tem sido adicionalmente realizados por ATWATER et alii (1979) e ATWATER, RIBALETE e ROJAS (1979) dentre outros.

Os fluxos de íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , contratransporte  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , bombas  $\text{Ca}^{2+}$  ATPásica e  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPásica, foram amplamente investigados por DONATSCH et alii (1977), HERCHUELZ, LEBRUN e MALAISSE (1980), HERCHUELZ et alii (1980a, b), HERCHUELZ e MALAISSE (1980a, b), SIEGEL et alii (1980), HENQUIN E MEISSNER (1982) e LEBRUN, MALAISSE e HERCHUELZ (1982). Dentre os resultados obtidos, ficou patente que a redução da permeabilidade ao  $\text{K}^+$ , induzida pela glicose, contribui para a ativação subsequente da permeabilidade do  $\text{Ca}^{2+}$  - voltagem dependente. Por sua vez, os influxos de  $\text{Ca}^{2+}$  - voltagem dependentes geram uma atividade elétrica típica, caracterizada por "bursts de potenciais de ação", associados com taxa secretória de insulina aumentada.

Interessantemente, RIBALET e BEIGELMAN (1979), ATWATER et alii (1980) e ATWATER, GONÇALVES e ROJAS (1982), consolidaram, efetivamente, que o padrão da atividade elétrica da membrana das células beta é determinada por uma oscilação da permeabilidade ao  $\text{K}^+$ .

Estudos sobre a redução do efluxo do  $\text{K}^+$ , secreção de insulina e geração de atividade elétrica induzidas por barbituratos, foram recentemente desenvolvidos por BOSCHERO, GONÇALVES e LANGONE (1982), DIAS et alii (1982) e GONÇALVES et alii (1982). Em contrapartida, estudos sobre a ativação da permeabilidade do  $\text{K}^+$ , ativada pelo acúmulo citosólico de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , foram desenvolvidos por MATTHEWS e SAKAMOTO (1975), ATWATER e BELGELMAN (1976), ATWATER et alii (1979) e BOSCHERO e MALAISSE (1979).

Adicionalmente, HENQUIN (1979), sugeriu que assim como em outras células excitáveis, o acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, decorrente de seu influxo aumentado ou do bloqueio do contratransporte  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , contribui parcialmente na ativação do me-

canismo que regula a permeabilidade do  $K^+$  em células beta. Mais que isto, o acúmulo subcelular de íons  $Ca^{2+}$  parece limitar a ação inibidora da glicose sobre o efluxo do  $K^+$ . Nesse sentido, ATWATER et alii (1979), apresentaram resultados concordantes.

A integração entre eventos metabólicos, catiônico-elétricos e secretórios foram pelo menos em parte discutidos ou revisados por MALAISSE et alii (1978a, b, c, d), BOSCHERO (1979), ATWATER (1980), HEDESKOV (1980), DELATTRE (1981) e WOLLHEIM e SHARP (1981).

## 1.2. Ativação do sistema afetor - Importância dos íons $Ca^{2+}$ e participação da calmodulina

O desencadeamento do processo secretório, requer a ativação do citoesqueleto das células beta, constituído por microtúbulos, microfilamentos e membrana plasmática. Uma série de autores tem demonstrado a importância dos íons  $Ca^{2+}$  para a ativação desse sistema efetor. Assim, GRODSKY e BENNETT (1966), MILNER e HALES (1967), CURRY, BENNETT e GRODSKY (1968), LAMBERT et alii (1969), MALAISSE, BRISSON e MALAISSE-LAGAE (1970), MALAISSE (1972, 1975), MALAISSE e PIPELEERS (1973), HELLMAN (1975), FUJIMOTO e ENSINCK (1976), HELLMAN (1977) e MALAISSE et alii (1978b) em diferentes preparações, apresentaram trabalhos que comprovaram a participação dos íons  $Ca^{2+}$  no mecanismo de liberação de insulina induzido pela glicose. Os resultados obtidos confluíram para uma idéia comum que defende a participação do  $Ca^{2+}$  dentro de uma faixa de concentração crítica. Esta mesma corrente estabeleceu a existência de uma estreita relação funcional, entre quantidade de insulina secretada e

concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio extracelular. Por outro lado, WOLLHEIM et alii (1978) e KIKUSHI et alii (1979) concluíram que a dinâmica de secreção de insulina induzida pela glicose, efetivamente, obedece a um padrão bifásico. Segundo esses autores, a primeira fase do mecanismo secretório é ativada por íons  $\text{Ca}^{2+}$  prontamente disponíveis no citosol e a segunda fase, dependeria ainda de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico estocado em organelas subcelulares e, subsequentemente, do cátion proveniente do meio extracelular.

A distribuição de íons  $\text{Ca}^{2+}$  por compartimentos intracelulares, (vesículas secretórias, mitocôndria, retículo endoplasmático e membrana celular) e a participação de cada compartimento na libertação do cálcio ativador, foram amplamente estudados por HERMAN, SATO e HALES (1973), HOWELL e TYHURST (1976a, b), BLOOM et alii (1977), HOWELL (1977), HENQUIN (1978b) e SELIN (1981). Opiniões concordantes em torno da proposição de que os íons  $\text{Ca}^{2+}$  são os fatores que deflagram o mecanismo secretório de insulina, ativando o sistema efetor, foram discutidas em revisões de OSTLUND (1977), MALAISSE e ORCI (1979), HEDESKOV (1980), TALJEDAL (1981), WOLLHEIM e SHARP (1981) e SUTTER (1982). Após a comprovação de que o  $\text{Ca}^{2+}$  ionizado é o fator citosólico que dispara o mecanismo secretório, criou-se o axioma segundo o qual, todo agente estimularia ou inibiria a liberação de insulina, de acordo com a sua habilidade em afetar, direta ou indiretamente, a concentração intracelular do cátion.

Analisando o processo secretório de insulina, SOMERS et alii (1979), estudaram por intermédio de cinemicrografia, o transporte de vesículas secretórias realizado pelo citoesqueleto de células do pâncreas endócrino. Esses estudos concluíram, que o sistema microtubular é responsável pela translocação de

vesículas secretórias, orientadas centrifugamente, em movimento saltatório, ao longo do citoplasma. De outro modo, a rede microfilamentar se encarregaria do controle do acesso final das vesículas secretórias aos sítios exocitóticos.

Análises da participação do citoesqueleto das células beta, no mecanismo de secreção de insulina, foram efetuadas em revisões de LACY e MALAISSE (1973), OSTLUND (1977), MALAISSE e ORCI (1979) e recentemente por SWANSTON-FLATT, CARLSSON e GYLFE (1980) e HOWELL e TYHURST (1982).

Alguns autores têm analisado a participação da calmodulina na fisiologia das células beta. Assim, SUDGEN, CHRISTIE e ASHCROFT (1979) e SCHUBART, ERLICHMAN e FLEISCHER (1980), investigaram a presença e o possível papel da calmodulina, como reguladoras de processos  $\text{Ca}^{2+}$  - dependentes e VALVERDE et alii (1979) e SHARP et alii (1980), detectaram uma estimulação da adenil ciclase e um aumento da produção de AMP cíclico, em ilhotas pancreáticas perfundidas na presença de glicose. GAGLIARDINO et alii (1980) e VALVERDE et alii (1981), fizeram análises similares acerca da ativação da adenil ciclase e proteína quinase em células beta.

Por fim, KRAUSZ et alii (1980), pesquisaram o provável papel da calmodulina, no mecanismo de secreção de insulina, utilizando a trifluoperazina, em inibidor seletivo das funções moduladas pelo complexo  $\text{Ca}^{2+}$  - calmodulina. Os autores demonstraram que a trifluoperazina inibe a secreção de insulina provocada pela glicose ou gliceraldeído. Este resultado sugeriu que a etapa calmodulina-sensível não ocorre antes da produção de trioses no metabolismo da glicose. Contudo, não se observou qualquer efeito inibitório da trifluoperazina, durante a liberação de insulina induzida pelo 3-isobutil, 1-metilxanti

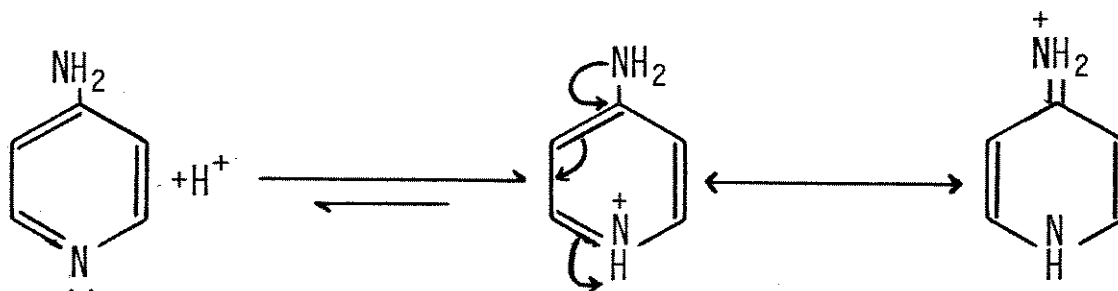
na. Isto fortemente indica que a calmodulina, não está envolvida, de "per se" no processo de exocitose, o que por sua vez sugere que todas as etapas entre a elevação de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico e exocitose, não parece depender da calmodulina. Ou seja, a calmodulina provavelmente participa, no mecanismo de secreção de insulina evocado pela glicose, num sítio entre o metabolismo das trioses e a elevação do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, mas não estaria envolvida no processo final de exocitose. Esta conclusão está parcialmente em desacordo com os resultados obtidos por SHEAVES, BOWMAN e HOPE (1980), SHEAVES e HOPE (1980), em neurosecretossomos de hipófise posterior e GAGLIARDINO et alii (1980), em ilhotas pancreáticas, que evidenciaram o envolvimento do complexo  $\text{Ca}^{2+}$  - calmodulina no processo de exocitose.

## 2. Ação da 4-aminopiridina e outras aminopiridinas em sistemas biológicos

As aminopiridinas são compostos heterocíclicos e anfífilos. Particularmente a 4-aminopiridina (4-AP), instrumento do presente estudo, é constituída de um núcleo piridínico hidrofóbico, uma cabeça polar, representada pelo grupo amino na posição 4, e um nitrogênio do amônio quaternário, que contribui para a polaridade da molécula.

A 4-AP exerce pronunciados efeitos no sistema nervoso central, permeando com relativa facilidade as barreiras corporais (FASTIER e McDOWALL, 1958 apud BOWMAN, KHAN e SAVAGE, 1977). Não obstante, os estudos de ALBERT (1963, apud HERMANN e GORMAN, 1981), estimaram que a molécula se converte predominantemente para a sua forma catiônica no pH neutro ( $\text{pK}_a = 9,36$

a 16°C). A carga da molécula protonada é deslocada segundo duas formas extremas representadas:



Sabendo que no pH fisiológico, a forma protonada da 4-AP é a predominante, BOWMAN, KHAN e SAVAGE (1977) admitiram a possibilidade de que a molécula pode permear as membranas biológicas por um mecanismo de transporte mediado (tipo difusão facilitada) ou através de difusão aquosa.

Por outro lado, não pode ser excluída a idéia, de que a forma não dissociada, sendo extraordinariamente lipossolúvel, empreenda um rápido fluxo unidirecional que permita uma significativa concentração molar da droga no meio intracelular. Isto seria diretamente dependente das constantes de velocidade de reação, droga não dissociada  $\xrightleftharpoons[k_2]{k_1}$  droga dissociada.

Os primeiros relatos acerca de uma ação biológica das aminopiridinas foram realizados por DINGEMANSE e WIBAUT (1928, apud BOWMAN, HARVEY e MARSHALL, 1977) que provocaram crises convulsivantes em anfíbios. Por longos anos, vários pesquisadores investigaram as propriedades convulsivantes das aminopiridinas até que HAXTHAUSEN (1955, apud BOWMAN, KHAN e SAVAGE, 1977) e FASTIER e McDOWALL (1958 apud BOWMAN, KHAN e SAVAGE, 1977) demonstraram vários efeitos cardiovasculares e efeito facilitatório sobre a transmissão neuromuscular em ratos e anfíbios,

por alguns de seus isômeros.

Antagonismo e reversão dos efeitos depressores da d-tubocurarina (d-Tc) e outros curarizantes sobre a contração e a transmissão neuromuscular, foram demonstrados por LEMEIGNAN e LECHAT (1967) e SOBEK et alii (1968), PASKOV, STAENOV e MIROV (1973) e BURLEY e JACOBS (1977) "in vivo" ou em preparação neuromuscular de anfíbio. Assim, STOYANOV et alii (1976) preconizaram a administração clínica de 4-AP como agente terapêutico suplementar na reversão de bloqueio neuromuscular provocado por substâncias curarizantes.

Vários estudos foram realizados em uma variedade de preparações experimentais onde se procurou identificar o substrato estrutural e fisiológico de atuação das aminopiridinas. Desta forma, CHANELET e LEMEIGNAN (1969), LEMEIGNAN, CHANELET e SAADE (1969), LEMEIGNAN (1971, 1972, 1973) e SAADE, CHANELET e LONCHAMPT (1971), demonstraram em preparações isoladas de tecido nervoso e por microinjeções de 4-AP em medula espinhal de gato, que a ação convulsivante da droga é consequente a um aumento da excitabilidade nervosa. Por sua vez, o aumento da neuroexcitabilidade, seria decorrente de uma despolarização parcial da membrana neuronal, diretamente induzido pela 4-AP. Nesta mesma ocasião, PELHATE, HUE e CHANELET (1972), HUE, PELHATE e CHANELET (1973) e PELHATE et alii (1974) constataram que o efeito convulsivante da droga era primariamente dependente de uma ação inibitória sobre a fase de repolarização do potencial de ação, em axônio gigante de inseto.

O ponto culminante dessas investigações foi atingido através de resultados obtidos por PELHATE e PICHON (1974) e MEVES e PICHON (1975 e 1977) que, respectivamente, em axônio gigante de inseto e de lula, detectaram uma inibição seletiva da

condutância do  $K^+$  - voltagem dependente, em situações onde as preparações eram perfundidas interna ou externamente com concentrações micromolares de 4-AP.

GILLESPIE e HUTTER (1975) verificaram que o bloqueio da condutância do  $K^+$  - voltagem dependente, em músculo esquelético de anfíbio, variava de maneira crescente, à medida em que se aumentava o pH do meio para valor próximo ao do  $pK_a$  da 4-AP. Adicionalmente, observaram que o retardo da repolarização, induzido pela droga, era menos pronunciado quando se aplicava um pulso despolarizante mais intenso à preparação.

MOLGÓ, LEMEIGNAN e LECHAT (1975), demonstraram em preparação neuromuscular, um efeito estimulatório da 4-AP sobre a amplitude do potencial de placa terminal e do conteúdo quantal de secreção do neurotransmissor, associados a um prolongamento da fase de repolarização do potencial de ação muscular. Por outro lado, LEMEIGNAN et alii (1975), detectaram um aumento da velocidade máxima de despolarização e redução dos efeitos quinidínicos em fragmentos de coração de cobaia expostos à 4-AP.

ULBRICHT e WAGNER (1976) demonstraram remoção parcial do bloqueio da condutância do  $K^+$ , após aplicação de pulso despolarizante em membrana nodal de fibras mielínicas, enquanto que, LLINÁS, WALTON e BOHR (1976) evidenciaram descargas repetitivas em fibras pré e pós-sinápticas.

LLINÁS e HESS (1976, apud NICHOLSON, TEN BRUGGENCATE e SENEKOWITSCH, 1976) e NICHOLSON, TEN BRUGGENCATE e SENEKOWITSCH (1976) detectaram corrente de  $Ca^{2+}$  em células de Purkinje cerebelares e, secundariamente, um aumento da condutância do  $K^+$ , eventos iônicos que os autores assinalaram como semelhantes aos da depressão alastrante.

HUE et alii (1975, 1976) em gânglio nervoso de inseto, JOHNS et alii (1976) em vaso deferente de coelho e SCHAUF et alii (1976) em preparações neuromusculares de crustáceos, verificaram que efetivamente, a 4-AP estimulava a transmissão sináptica, por intermédio do aumento da liberação de neurotransmissor.

A utilização da 4-AP como elemento farmacológico de avaliação da condutância do  $K^+$  foi sugerida por YEH et alii (1976), a partir de estudos em axônio gigante de lula. Nesta preparação, os autores reproduziram resultados que reforçaram o conceito de que o bloqueio da condutância do  $K^+$  provocado pela 4-AP, era substancialmente atenuado, quando se elevava o potencial para valores mais positivos. Mesma observação foi feita quando se aumentava a duração ou a frequência dos pulsos des polarizantes aplicados ao sistema apreciado.

Por sua vez, HARVEY e MARSHALL (1977a) verificaram que também as diaminopiridinas (2,3 - 2,6 e 3,4 diAP) eram capazes de facilitar a transmissão neuromuscular e aumentar a liberação espontânea ou evocada, de acetilcolina em preparação neuromuscular de aves. Resultados semelhantes, com 4-AP, foram obtidos por MOLGÓ, LEMEIGNAN e LECHAT (1977, 1979) em preparação neuromuscular de anfíbio.

LEANDER, ARNER e JOHANSSON (1977) detectaram um efeito estimulatório da 4-AP sobre a atividade mecânica da veia porta de rato. Os autores assinalaram que o efeito contrátil fora decorrente da liberação de noradrenalina dos terminais adrenérgicos, que, por sua vez seria desencadeado por um bloqueio da condutância do  $K^+$  na membrana pré-sináptica. Em concordância com esses resultados, KIRPEKAR, KIRPEKAR e PRAT (1977), de igual maneira, constatarem um aumento da liberação de noradrenalina

em baço de gato perfundido. Os autores, desta feita, explicaram tal efeito como sendo decorrente do prolongamento do potencial de ação do terminal adrenérgico, através do bloqueio da condutância do  $K^+$ . Esses eventos possibilitariam um maior influxo de íons  $Ca^{2+}$  no terminal nervoso, responsável pela ativação do mecanismo neurosecretório.

De outro modo, BOWMAN, KHAN e SAVAGE (1977) observaram que a 4-AP conseguia reverter os efeitos miorelaxantes do dantroleno sódico (droga que parece restringir a liberação do  $Ca^{2+}$  ativador do retículo sarcoplasmático para o espaço miofibrilar), em preparação nervo frênico-hemidiafragmática de rato. Os autores chegaram a sugerir que a 4-AP, de alguma maneira, torna os íons  $Ca^{2+}$  mais disponíveis para o processo de acoplamento excitação-contração. Possivelmente a forma protonada da molécula, deslocaria os íons  $Ca^{2+}$  de seus sítios de ligação intracelulares.

Até aqui, todos os efeitos excitatórios da 4-AP, basicamente, foram explicados, como resultantes de uma ação direta da droga sobre os canais de  $K^+$  - voltagem dependentes, produzindo um bloqueio da condutância do  $K^+$ . Este evento se associaria a um retardo da fase de repolarização e prolongamento do potencial de ação. Consequentemente, a manutenção do estado de despolarização da membrana, por um intervalo de tempo mais dilatado, proporcionaria uma intensificação do influxo de íons  $Ca^{2+}$ , responsáveis pela ativação de várias funções fisiológicas da célula.

Neste meio tempo, BOWMAN, HARVEY e MARSHALL (1977) e HARVEY e MARSHALL (1977b), em preparação neuromuscular de aves, reuniram evidências que reforçaram a hipótese de que o efeito

das aminopiridinas, em junções mioneurais, se originaria, efetivamente, de uma ação inibitória da droga sobre a condutância do  $K^+$  - voltagem dependente. Ademais, os autores propuseram que além do influxo de  $Ca^{2+}$  proporcionado pela despolarização, as aminopiridinas teriam a propriedade de deslocar íons  $Ca^{2+}$  de sítios de ligação da membrana pré e pós-sináptica. Conclusões semelhantes foram elaboradas por GLOVER (1978) em fragmentos de artéria de coelho, KIRPEKAR, KIRPEKAR e PRAT (1978), em baço perfundido de gato, KLEE (1978a, b), em neurônios de moluscos, MORITOKI et alii (1978), em íleo isolado de cobaio, SEE, FOLGERING e SCHLAFKE (1978), em regiões quimiorreceptoras de medula oblonga, SHAPOVALOV e SHIRIAEV (1978), em junções eletrotônicas de medula espinhal de anfíbio, SINGH, MARSHALL e HARVEY (1978), em preparação nervo frênico-hemidiafragmática de camundongo e por HÖSLI, ANDRÉS e HÖSLI (1979), em cultura de células nervosas, dentre outros.

Por outro lado, LUNDH, NILSSON e ROSÉN (1977), LUNDH e THESLEFF (1977), AGOSTON et alii (1978) e LUNDH, NILSSON e ROSÉN (1979), demonstraram que a 4-AP atenuava a depressão da transmissão neuromuscular do síndrome de Eaton-Lambert e da miastenia gravis e provocava uma liberação maciça de neurotransmissor em preparação neuromuscular de anfíbio. A intensa liberação quantal de acetilcolina foi intimamente associada à despolarização da membrana sub-sináptica, e ao desencadeamento de uma corrente regenerativa de influxo, carregada por íons  $Ca^{2+}$ , mesmo na presença de tetrodotoxina. Para todas as situações estudadas, os autores propuseram, alternativamente, que a 4-AP poderia agir, de forma direta, sobre os canais de  $Ca^{2+}$  - voltagem - sensíveis. Esta hipótese foi reforçada a partir dos trabalhos descritos por JANKOWSKA et alii (1977), em medula es-

pinhal de gato, LUNDH (1978) e ILLES e THESLEFF (1978) em preparação neuromuscular de anfíbio, YANAGISAWA, SATOH e TAIRA (1978), em nodo sinoatrial isolado e perfundido de cão, GALIN-DO e RUDOMIN (1978), em medula espinhal de gato e por MOLGÓ, LEMEIGNAN e LECHAT (1979), LEANDER e THESLEFF (1980), MARTÍ-NEZ-AGUIRRE et alii (1981), ENOMOTO e MAENO (1981), MOLGÓ e THESLEFF (1982) e THOMPSON (1982), dentre outros, em uma variededade de preparações. Adicionalmente, LUNDH (1978) demonstrou que o efeito da 4-AP sobre o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , é independente de energia metabólica.

Procurando investigar a provável origem dos efeitos excitatórios da 4-AP, LUNDH, LEANDER e THESLEFF (1977), sugeriram que o antagonismo exercido pelas aminopiridinas sobre a paralisia muscular, produzida pela toxina botulínica, seria devido à associação de dois fatores: - a 4-AP facilitaria um maior influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  durante os potenciais de ação pré-sinápticos e, adicionalmente, permitiria uma maior concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre, disponível no telodendro. Este último efeito, poderia estar relacionado com a suposta propriedade da 4-AP, que envolveria uma restrição da ligação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  com sítios subcelulares.

Avaliando outros parâmetros, MEVES e PICHON (1977), demonstraram que a 4-AP era capaz de bloquear tanto a corrente de efluxo como a de influxo de  $\text{K}^{+}$ , quando aplicada interna ou externamente em axônio gigante de lula. Os autores assinalaram que o bloqueio da corrente de efluxo de  $\text{K}^{+}$ , era atenuado em todas as situações em que se aplicavam pulsos despolarizantes a uma frequência ou amplitude aumentadas. Em ambas condições, haveria um deslocamento de moléculas de 4-AP, de seus sítios de bloqueio.

Atividade elétrica automática foi demonstrada em axônio gigante de lula por GOLENHOFEN e MANDREK (1978), quando se introduzia a 4-AP em meio contendo tetrodotoxina. Os autores sugeriram um efeito adicional da droga, ainda desconhecido, uma vez que previamente era sabido, que outros bloqueadores da condutância do  $K^+$ , não conseguiam, de "per se", induzir automatidade na mesma preparação com tetrodotoxina. Já JACOBS e BURLEY (1978), verificaram, que além de aumentar a amplitude dos potenciais de placa terminal, a 4-AP promoveria um aumento da densidade dos sítios de liberação quantal de transmissor, em junções neuromusculares de anfíbio. Proposição semelhante foi realizada por LUNDH (1979), quando analisaram parâmetros estatísticos da liberação de neurotransmissor em junções neuromusculares.

Reforçando a hipótese de que as aminopiridinas influenciam a atividade do  $Ca^{2+}$ , SINGH, MARSHALL e HARVEY (1978), MOLGÓ et alii (1979), WEIDE e LÖFFELHOLZ (1980) e UCHIYAMA, MOLGÓ e LEMEIGNAN (1981), demonstraram que as referidas drogas eram capazes de reverter o bloqueio da transmissão sináptica, induzido por antibióticos aminoglicosídeos ou pentobarbital, em preparações neuromusculares e vago-coração isolado. Nesse sentido, convém assinalar que pelo menos no caso dos antibióticos aminoglicosídicos, o bloqueio da transmissão neuromuscular é resultante de uma competição que essas substâncias exercem com os íons  $Ca^{2+}$  pelo mesmo sítio receptor na membrana pré-sináptica (VITAL BRAZIL e PRADO-FRANCESCHI, 1969).

Resultados surpreendentes foram relatados por NICHOLSON et alii (1978) que basicamente confirmaram as conclusões de NICHOLSON et alii (1976) e NICHOLSON, TEN BRUGGENCATE e SE NEKOWITSCH (1977) de que a aplicação tópica de 4-AP em cerebe-

lo de gato, paradoxalmente, induzia um aumento da concentração extracelular de  $K^+$ . Este evento foi acompanhado de uma redução da concentração extracelular de  $Ca^{2+}$ , simulando um quadro iônico similar ao desencadeado pela depressão alastrante em tecido nervoso. Conclusões análogas foram efetuadas por SZENTE e PONGRÁCZ (1979) e KOCSIS, MALENKA e WAXMAN (1980, 1981).

ILLES e THESLEFF (1978) elaboraram novas hipóteses acerca dos mecanismos ativados pela 4-AP, durante a liberação do transmissor colinérgico em junções neuromusculares. Esses autores preconizaram que a 4-AP aumenta a eficácia do transporte de íons  $Ca^{2+}$  através da membrana pré-sináptica. Tal efeito poderia ser resultante de um aumento do número de canais de  $Ca^{2+}$  ativados ou, alternativamente, de uma maior capacidade de transporte de cada canal.

Desenvolvendo estudos farmacológicos, para avaliar o sítio subcelular de ação da toxina botulínica, SIMPSON (1978), sugeriu que a 4-AP reverte os efeitos depressores da toxina, aumentando a afinidade de determinada molécula da membrana pré-sináptica, aos íons  $Ca^{2+}$ . Esta molécula seria um componente do sítio distal de liberação do transmissor (sítio exocitótico).

Em fibras cardíacas de Purkinje, isoladas, KENYON e GIBBONS (1979) demonstraram uma ação inotrópica positiva produzida pela 4-AP. Os autores concluíram que o referido efeito seria decorrente de um aumento do influxo e/ou de uma redução do efluxo do  $Ca^{2+}$ . Resultados e conclusões similares foram relatados por WOLLMER, WOHLFART e KHAN (1979), em músculo papilar cardíaco, isolado e por YANAGISAWA e TAIRA (1979), em trabéculas de músculo ventricular cardíaco. Todavia, resultados mais conclusivos em tecido cardíaco, foram obtidos por WOLLMER, WOHLFART e KHAN (1981). Esses autores propuseram que a ação inotró

pica positiva, provocada pela 4-AP, em músculo papilar, decorreria da associação de vários efeitos interdependentes. Assim, o prolongamento do potencial de ação evocaria um maior influxo e maior mobilização de íons  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático e, conseqüentemente, maior disponibilidade do cátion para a ativação do acoplamento estímulo-contração.

A ação da 4-AP sobre o influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , foi também verificada por SAND, HAUG e GAUTIVIK (1980), em células lac totrofas de hipófise de rato.

Por outro lado, HORN, LAMBERT e MARSHALL (1979) compararam as ações de um análogo quaternário da 4-AP (metil-iode to de 4-aminopiridina, 4-APMI) com as da própria 4-AP, em preparação neuromuscular de anfíbio. Demonstrou-se que a ação da 4-AP sobre todos os parâmetros funcionais analisados (reversão do bloqueio neuromuscular provocado pela d-tubocurarina, amplitude de contração muscular e índice quantal de potenciais de placa terminal, era superior a do seu análogo estrutural. O efeito superior da 4-AP sobre o conteúdo quantal de transmissor liberado, foi provavelmente devido, a uma ação mais eficaz da droga, exercido sobre a liberação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  de organelas sarcoplasmáticas. A distinção dos efeitos da 4-AP sobre os do seu análogo quaternário, foram explicados, como decorrentes da maior lipossolubilidade da primeira, que teria acesso mais fácil aos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares.

Em fibras musculares esqueléticas isoladas, de rato e anfíbio, KHAN e EDMAN (1979), comprovaram que a 4-AP potencializava a amplitude contrátil. Conquanto tenham defendido a hipótese, de que o efeito excitatório da 4-AP, fora resultante de um prolongamento do potencial de ação muscular, integrado a uma maior liberação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmá-

tico, os autores admitiram, adicionalmente, que a amina piridínica exibiria uma ação inibitória sobre o mecanismo de recaptação do cátion pela organela. Por sua vez, MARSHALL, LAMBERT e DURANT (1979) demonstraram que o efeito estimulatório da 4-AP, sobre a atividade contrátil do músculo esquelético era inibido pela introdução de  $Mg^{2+}$  ao meio. Esses resultados foram similares aos obtidos por ZETLER e SOWOIDNICH (1980) que detectaram um antagonismo da 4-AP sobre os efeitos depressores da estimulação por baixa frequência, tetrodotoxina, procaina ou magnésio, em vaso deferente de cobaio.

Fazendo uma caracterização farmacológica dos canais iônicos de axônios amielínicos, PICHON (1981), estudou as propriedades físico-químicas da molécula de várias aminopiridinas, para identificar os mecanismos de interação com sítios de ligação do canal de  $K^+$  - voltagem dependente. Nesta investigação, o autor demonstra como molécula de 4-AP pode ser deslocada de seu sítio de ligação do canal de  $K^+$ , acompanhando o campo elétrico transmembrana, durante a imposição de um pulso despolarizante. O deslocamento da molécula de 4-AP ionizada, ocorreria de modo similar ao influxo de cátions que se desencadeia durante a despolarização da membrana celular.

Trabalhando com preparação neuromuscular de anfíbio, BURLEY e JACOBS (1981), sugeriram a existência de um outro sítio ou mecanismo, através do qual a 4-AP potencializa a liberação de transmissor colinérgico. Os autores trouxeram evidências de que o efeito estimulatório da 4-AP, não pode ser explicado apenas com base na sua ação sobre os canais de  $Ca^{2+}$  - voltagem sensíveis. Fundamentados em resultados prévios (JACOBS e BURLEY, 1978), concluíram que a 4-AP aumenta a densidade de sítios de liberação no terminal pré-sináptico, ou por outra, in-

tensifica a liberação de vesículas secretórias, na zona ativa de exocitose. Esse mecanismo, parece depender de um nível ótimo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  livre, no lado axoplasmático, uma vez que a introdução de agentes quelantes de cátions divalentes ao meio, abole totalmente o efeito da 4-AP. Resultados comparáveis, foram assinalados por TOKUNAGA, SANDRI e AKERT (1979).

HERMANN e GORMAN (1978, 1981), estudaram os efeitos da 4-AP sobre correntes de  $\text{K}^+$ , em neurônios marca-passo de moluscos. Assim, conseguiram detectar uma extraordinária ativação da corrente de  $\text{K}^+$ , sensível ao acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ( $i\text{K}_{\text{Ca}}$ ), quando se introduziam, eletroforeticamente, íons  $\text{Ca}^{2+}$  e concentrações elevadas de 4-AP ( $> 5,0\text{mM}$ ), em meio isento do cátion e contendo tetrodotoxina. Resultados similares foram reproduzidos quando se aplicava a 4-AP externamente. Diante dos resultados inesperados, os autores admitiram a hipótese de uma ação direta da 4-AP sobre o mecanismo de ativação da condutância do  $\text{K}^+$  por íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Nesta proposição, concebeu-se que a molécula de 4-AP pode afetar a posição do sítio de ligação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  ou alterar a sua afinidade pelo cátion. Nesse grupo de neurônios estudados, uma significativa fração (cerca de 85% a + 20mV) da corrente de efluxo total, é carregada pela corrente de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  - sensível, e uma fração menor (cerca de 15% a + 20mV), pela corrente tardia de  $\text{K}^+$ , ativada pela despolarização da membrana. Mediante a constatação fenomenológica, das proporções de cada componente da corrente de efluxo do  $\text{K}^+$ , os autores chegaram à conclusão de que o drástico aumento da  $i\text{K}_{\text{Ca}}$ , produzido por altas concentrações de 4-AP, mascarou qualquer redução da corrente tardia de  $\text{K}^+$ , concomitantemente, induzido pela droga. Adicionalmente, explicaram os resultados paradoxais, obtidos por NICHOLSON, TEN BRUGGENCATE e SENEKOWITSCH (1976), em

cerebelo de gato, baseados na mesma hipótese aventada para os neurônios marca-passo de molusco.

De outro modo, AHREN, LEANDER e LUNDQUIST (1981), analisaram a glicemia e a insulinemia de camundongos intactos ou adrenalectomizados e simpatectomizados quimicamente com 6-hidroxidopamina, e submetidos à administração de duas doses diferentes de 4-AP (0,26 e 26  $\mu$ /kg de peso). A aplicação da dose maior de 4-AP em camundongos intactos, produziu uma notável elevação da glicose sanguínea, sem alteração da taxa de insulina. Por outro lado, a dose 100 vezes menor de 4-AP inibiu parcialmente a secreção de insulina, induzida por uma carga endovenosa de glicose. Nos animais adrenalectomizados e simpatectomizados, a dose maior de 4-AP não afetou os níveis de glicose e insulina plasmáticos. Contudo, a mesma dose de 4-AP potencializou a secreção de insulina provocada pela glicose nos animais. Essa potencialização não foi alterada pela aplicação de um bloqueador colinérgico muscarínico. Os autores concluíram que o efeito da 4-AP sobre a secreção de insulina e a glicemia, nos animais intactos, foi exercido indiretamente, através da ativação do sistema simpático-adrenal. Em contrapartida, os resultados obtidos no grupo de animais com função simpático-adrenal deprimida, sugeriram que a 4-AP tem a capacidade de estimular diretamente a secreção de insulina. Adicionalmente, os autores propuseram que o efeito insulínico da 4-AP, nos animais operados, decorreria de uma despolarização prolongada da membrana das células beta, seguida de um fluxo aumentado de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Por sua vez, o maior aporte de íons  $\text{Ca}^{2+}$  às células beta, se originaria do bloqueio do efluxo do  $\text{K}^+$  (com resultante ativação do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ ) e/ou de um efeito da droga, diretamente sobre os canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , voltagem sensíveis, con-

forme proposição de LUNDH, LEANDER e THESLEFF (1977), LEANDER, ARNER e JOHANSSON (1977) e THESLEFF (1980), dentre outros.

### 3. Proposição do trabalho

No início desta introdução, ficou explicitado que dentre as etapas do mecanismo de secreção de insulina, a redução do efluxo do  $K^+$  é um elemento de primordial importância. Efetivamente, o bloqueio do efluxo do  $K^+$ , provocado pela glicose, é pelo menos em parte, um dos determinantes do grau de despolarização das células beta, responsável por sucessivos influxos de íons  $Ca^{2+}$ , associados a uma liberação pulsátil de insulina.

Como a 4-AP, rotineiramente, vem sendo referida como uma droga que interfere com a cinética da condutância do  $K^+$ -voltagem dependente, decidimos estudar os seus efeitos sobre alguns parâmetros funcionais do mecanismo de secreção de insulina, em ilhotas pancreáticas isoladas. Nesse particular, a análise do efluxo do  $^{86}Rb$  (utilizado como substituto do  $K^+$ ), será o foco inicial do presente estudo, seguida da avaliação da incorporação de  $^{45}Ca$ , da oxidação da glicose, do efluxo do  $^{45}Ca$  e da dinâmica de secreção de insulina.

Resultados preliminares do presente trabalho foram publicados por REIS et alii (1982a, b).

## II - MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Animais de experimentação

Foram utilizados ratos albinos Wistar, de ambos os sexos, de 3 a 6 meses de idade, com peso corporal variando entre 150 e 300 gramas. Os animais foram alimentados com uma ração balanceada e água "ad libitum". Eventualmente, a dieta foi suplementada com complexo vitamínico.

### 2. Isolamento de ilhotas pancreáticas de rato

Utilizou-se a técnica da collagenase, descrita por MOSKALEWSKI (1965), para cobaias, modificada por LACY e KOSTIANOVSKY (1967) para ratos e adaptada por BOSCHERO, DELATTRE e SANTOS (1980).

Após sacrifício por concussão cerebral, os animais foram laparatomizados para localização e posterior canulação do canal colédoco. Foram executadas as seguintes etapas até o isolamento das ilhotas, propriamente dito:

- a) Oclusão do canal colédoco em seu segmento distal, próximo à papila duodenal;
- b) Coledocostomia em segmento adjacente ao hilo hepático, antes da bifurcação do duto biliar com o duto pancreático principal;
- c) Introdução da cânula de polietileno no colédoco e posterior injeção de 10 a 20 ml de solução de Hanks, enriquecida com 2,8 mM de glicose. Tal injeção foi realizada em sentido re-

trôgrado, de modo que a solução refluisse para o duto pancreático principal, e promovesse o intumescimento do parênquima exócrino do pâncreas;

- d) Extirpação do pâncreas e fragmentação do órgão até pequenos pedaços de aproximadamente  $1\text{ mm}^3$ , com o auxílio de uma tesoura;
- e) Lavagem dos fragmentos de pâncreas com solução de Hanks e descarte do sobrenadante e elementos grosseiros;
- f) Transferência dos fragmentos de 4 pâncreas para tubo de ensaio contendo 6 a 8 mg de collagenase liofilizada para cada órgão microdissecado;
- g) Incubação dos fragmentos de pâncreas de  $37^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 10 minutos, sob agitação lenta, promovida por intermédio de gaseificação com carbogênio (95% de  $\text{O}_2$  para 5% de  $\text{CO}_2$ );
- h) Agitação manual lenta, por 4 a 6 minutos em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ ;
- i) Terminada a digestão collagenolítica, foram realizadas 3 a 4 lavagens do material, após prévia centrifugação sob baixa rotação. Após cada lavagem, a preparação foi ressuspensa com solução de Hanks, antes e após a centrifugação;
- j) O material obtido foi transferido para uma placa de Petri, procedendo-se a seguir, à colheita das ilhotas de Langerhans, utilizando-se uma pequena alça de vidro, com auxílio de uma lupa estereoscópica. Alternativamente, quando se pretendia acelerar a execução de dado protocolo, procedia-se à colheita das ilhotas por aspiração, com auxílio de uma pipeta.

### 3. Efluxo do $^{86}\text{Rb}$ por ilhotas isoladas e perfundidas

O  $^{86}\text{Rb}$  vem sendo amplamente utilizado em substituição ao  $\text{K}^+$ , em especial o  $^{42}\text{K}$ , por ser este, um radioisótopo de meia vida muito curta para a exequibilidade de nossos protocolos experimentais. Adicionalmente, BOSCHERO et alii (1977) observaram que o efluxo fracionário do  $^{86}\text{Rb}$  era muito semelhante ao do  $^{42}\text{K}$ , em ilhotas pancreáticas isoladas.

Na análise do efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , as ilhotas foram marcadas com o radioisótopo (0,1 a 0,2 mM, na base de 80  $\mu\text{Ci/ml}$ ), adicionado de solução glicosada de Krebs (2,8 mM de glicose). Posteriormente, as ilhotas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 90 minutos, sob lenta agitação, após prévia gaseificação com carbogênio por 5 a 10 minutos. Terminada a incubação, as ilhotas foram lavadas 2 vezes com solução de Krebs e transferidas (70 a 120 ilhotas), imediatamente, para as câmaras perfusoras (câmara e filtro Millipore, Molshein, França).

O tempo de perfusão totalizou 70 minutos, sendo que os primeiros 10 minutos, compreendia o período de adaptação das ilhotas, ao sistema perfusor. As soluções-teste foram drenadas de dois reservatórios, mantidos a  $37^\circ\text{C}$ , por uma bomba peristáltica de dois canais (HOLTER PUMP - Extracorporeal Med. Spec. Inc. Model 911 - USA), e continuamente gaseificadas sob fluxo lento com carbogênio. A solução perfusora foi drenada do primeiro reservatório, do 10º ao 30º minuto, e do segundo reservatório, do 30º ao 50º minuto. Do 50º ao 70º minuto, retornava-se às condições iniciais da primeira etapa de perfusão efetiva. Cada reservatório, com solução de Krebs, continha glicose e 4-AP em diferentes concentrações molares, de acordo com a condição experimental. Antes de se iniciar a perfusão, certi-

ficava-se se o pH das soluções estava ao redor de 7,4.

O fluxo da solução perfusora foi da ordem de 0,5 ml/min., e a colheita do efluente, realizada a cada 2 minutos, com volume de 1,0 ml para cada amostra.

A radioatividade de cada amostra foi medida em contador de radiação beta, utilizando-se o efeito Cerenkov.

Foram preparados, pelo menos 2 frascos BG (Controles), onde se adicionou apenas 1,0 ml de água, para se avaliar a radiação de fundo.

Os resultados iniciais foram aplicados na fórmula seguinte, para cálculo da fração de efluxo:

$$\text{Fração de Efluxo} = \frac{\begin{array}{c} \text{Ef} \quad \text{---} \quad \text{BG} \\ t_{10} \quad \dots \quad t_{70} \end{array}}{\begin{array}{ccccccc} (F + \text{Ef})_{t_{70}} & + & (F + \text{Ef})_{t_{70} + t_{68}} & + & (F + \text{Ef})_{t_{70} + t_{68} + t_{66}} & \dots & (F + \text{Ef})_{t_{70} + t_{68} + t_{66} + t_{12}} \end{array}},$$

onde,

- $\text{Ef}_{t_{10} \dots t_{70}}$  é a radiação (em CPM), contida em efluente colhido a cada 2 minutos, do 10º ao 70º minuto de perfusão;
- BG é a radiação de fundo (em CPM), contida em 1,0 ml de água;
- F é a radiação (em CPM), contida no filtro Millipore, retirado da câmara após a perfusão;
- $(F + \text{Ef})_t$  é a radiação (em CPM), obtida a partir da radioatividade contida no filtro, somada, cumulativamente, à contida em cada amostra colhida, do 70º ao 10º minuto de perfusão.

A liberação do  $^{86}\text{Rb}$  por ilhotas previamente marcadas, é responsável pela emissão radioativa, medida em contador de

radiação beta. Como a quantidade de  $^{86}\text{Rb}$  incorporada pelas ilhotas, é finitivamente limitada, compreende-se que a dinâmica da emissão radioativa seja representada por um decaimento exponencial. Por outro lado,  $(F + E_f)_{t70 \dots t10'}$ , representa a radiação, transitoriamente incorporada, às ilhotas, a cada intervalo de 2 minutos de perfusão, do 70º ao 10º minuto. Operacionalmente, esta radiação é calculada, através da soma cumulativa, da radiação contida no filtro, mais a radiação do efluente, colhida em cada frasco. Assim, os resultados parciais obtidos, são sucessivamente somados à radiação do efluente colhido, no tempo imediatamente precedente. Os resultados finais foram apresentados na forma de fração de efluxo, obtida a partir das médias em CPM, de um determinado número de experimentos.

#### 4. Incorporação de $^{45}\text{Ca}$ por ilhotas isoladas e incubadas

Foi empregado o método descrito por MALAISSE-LAGAE e MALAISSE (1971). Para isso, grupos de aproximadamente 100 ilhotas foram incubados durante 90 minutos, a  $37^{\circ}\text{C}$  e sob constante agitação em 0,25 ml de solução de Krebs-bicarbonato, contendo diferentes concentrações de glicose, 4-AP e  $^{45}\text{CaCl}$  (90  $\mu\text{Ci/ml}$ ). Após o período de incubação, as ilhotas foram lavadas 4 a 5 vezes (a  $0^{\circ}\text{C}$ ), com solução idêntica à utilizada no período de incubação, exceto pela ausência do radioisótopo. A seguir, cada grupo de ilhotas foi transferido para placas de Petri, mantidas a  $0^{\circ}\text{C}$ , procedendo-se à colheita de grupos de 8 ilhotas para frascos de cintilação contendo 1,0 ml de água. A cada frasco, foi adicionado, 5,0 ml de líquido de cintilação.

A radioatividade contida em 1,0  $\mu\text{l}$  do meio de incuba-

ção, foi medida, para se avaliar a radiação máxima (MAX) no início do período incubatório.

Os resultados obtidos foram aplicados na fórmula:

$$F = \frac{1000}{\text{CPM}(\text{MAX}) 8} \quad \text{onde,}$$

- F é o fator obtido, que por sua vez multiplicado pela quantidade de CPM contida em cada amostra, determinou a quantidade de  $^{45}\text{Ca}$  (em picomol) incorporada por ilhota, durante 90 minutos de incubação;
- 1000 é a quantidade em picomol de  $^{45}\text{Ca}$  existente em 1,0  $\mu\text{l}$  do meio de incubação, sabendo-se que a concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  utilizada foi 1,0 mM.
- CPM (MAX) é igual à quantidade de radiação, emitida por minuto, obtida em 1,0  $\mu\text{l}$  do meio de incubação;
- 8 (oito) é a quantidade de ilhotas contida em cada frasco.

Os resultados finais foram expressos em picomol  $\text{Ca}^{2+}$ /ilhota/90 minutos.

##### 5. Oxidação da glicose por ilhotas isoladas e incubadas

Para a análise da oxidação da glicose, foi empregado o método descrito por MALAISSE, SENER e MAHY (1974). Assim, procedeu-se à colheita de grupos de 15 ilhotas, posteriormente transferidos para tubos de ensaio contendo 0,7 ml de solução de Krebs, contendo 16,7 mM de glicose, diferentes concentrações de 4-AP e cerca de 10,0  $\mu\text{Ci/ml}$  de ( $\text{U-}^{14}\text{C}$ ) D-glicose. Preparou-se um experimento controle, para cada condição experimental, à semelhança do procedimento anterior, exceto a presença de ilhotas.

Os tubos de ensaio foram colocados em frascos suportes, fechados hermeticamente e incubados por 120 minutos a 37°C sob constante agitação. O pH do meio foi previamente equilibrado para 7,4 às expensas de gaseificação com carbogênio por 10 minutos. Após a incubação, foram adicionados 0,1 ml de solução de HCl 0,1N, a cada tubo de ensaio para interromper a oxidação e 0,51 ml de hiamina para a captação de  $^{14}\text{CO}_2$  liberado pelo metabolismo da glicose. Para favorecer a captação de  $^{14}\text{CO}_2$ , os frascos suportes sofreram agitação à temperatura ambiente durante 60 minutos.

O MAX foi obtido a partir da preparação de 3 frascos, aos quais se introduziu 1,0 µl do meio de incubação, respectivamente, de cada condição experimental.

Finalmente, a contagem da radioatividade de cada tubo, foi realizada em contador de radiação beta, logo após a introdução de 10,0 ml de líquido de cintilação. Os resultados obtidos foram aplicados na fórmula;

$$F = \frac{16,7 \times 10^{-3}}{15 \times \text{CPM (MAX)}}, \text{ onde,}$$

- $16,7 \times 10^{-3}$  é a concentração molar de glicose do meio de incubação;
- 15 é o número de ilhotas contida em cada tubo de ensaio;
- CPM (MAX) é a quantidade de radiação emitida por minuto, medida em 1,0 µl do meio de incubação;
- F é o fator que foi multiplicado pelo número de CPM de cada tubo, para permitir a obtenção da quantidade de glicose oxidada em picomol/ilhota/120 minutos.

6. Dinâmica da secreção de insulina e efluxo de  $^{45}\text{Ca}$  por ilhotas isoladas e perfundidas

Dois grupos de 100 ilhotas foram perfundidos, segundo técnica de MALAISSE, BRISSON e BAIRD (1973). As ilhotas foram incubadas por 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  sob agitação constante, em solução de Krebs contendo 16,7 mM de glicose e 180 a 200  $\mu\text{Ci}$  de  $^{45}\text{CaCl}_2/\text{ml}$ . O pH da solução foi equilibrada para 7,4 durante os primeiros 10 minutos de incubação com carbogênio.

Terminada a incubação, as ilhotas foram lavadas 4 vezes com solução semelhante à utilizada no período incubatório, e transferidas de imediato para as câmaras de perfusão. As câmaras de perfusão foram acopladas a dois reservatórios contendo as soluções-teste, que por sua vez foram drenadas por uma bomba peristáltica (Wilson HP<sub>4</sub>-Analys S.A., Bruxelas, Bélgica). O fluxo das soluções (1,0 ml/min), foi monitorado por uma pequena torneira, à semelhança do procedimento executado na análise do efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ .

As ilhotas foram perfundidas, inicialmente por um período de adaptação de 30 minutos, sendo que os primeiros 10 minutos, o pH dos meios foi equilibrado em torno de 7,4 com carbogênio. A solução-teste foi drenada do primeiro reservatório, do 30º ao 44º minuto de perfusão e, deste ponto ao 69º minuto, foi bombeada do segundo reservatório. Do 69º ao 90º minuto de perfusão, retornou-se à situação inicial. A colheita das amostras foi realizada minuto a minuto (1,0 ml/min), sendo uma parte estocada a  $-20^{\circ}\text{C}$  para a dosagem da insulina secretada.

Para a análise do efluxo do  $^{45}\text{Ca}$ , tomou-se 0,5 ml do efluente colhido minuto a minuto, transferindo-o para frascos contendo 5,0 ml de líquido de cintilação. A emissão radioativa

foi avaliada em aparelho de contagem da radiação beta. Os resultados foram apresentados na forma de fração de efluxo, obtida a partir das médias em CPM das amostras de cada experimento.

#### 7. Dosagem de insulina secretada por ilhotas isoladas e perfundidas

A dosagem da insulina secretada minuto a minuto, foi realizada, segundo método descrito por HERBERT et alii (1965).

Foram transferidos, em duplicata, 0,1 a 0,2 ml das amostras estocadas, para uma bateria de tubos de ensaio. A seguir, adicionou-se 0,3 ml de solução de anticorpo anti-insulina Wright (diluição de 150 mil vezes), em tampão borato (pH = 8,4), albuminado (0,5 g/100 ml). Posteriormente, adicionou-se 0,3 ml de solução de insulina marcada com  $^{125}\text{I}$ , em tampão borato, na concentração de 300 pg de insulina/ml (aproximadamente 90 pg de insulina/tubo).

Foram preparados as seguintes condições-contrôle:

- a) 3 tubos contendo 0,3 ml da solução contendo apenas a insulina marcada com  $^{125}\text{I}$ , em tampão borato, para a avaliação da radioatividade máxima;
- b) 3 tubos contendo 0,4 ml de tampão borato, 0,2 ml da solução perfusora, colhido diretamente do reservatório e 0,3 ml da solução contendo a insulina marcada em tampão borato, para determinação de possíveis interferências no imunoensaio, pelas soluções utilizadas;
- c) 3 tubos contendo 0,3 ml de solução de anticorpo anti-insulina, 0,2 ml de solução perfusora também colhido diretamente

do reservatório, 0,1 ml de tampão borato e 0,3 ml de solução de insulina marcada em tampão borato, para a determinação do nível de ligação de fundo.

Ainda se preparou uma bateria de tubos, em duplicata, para a determinação de curva-padrão, contendo insulina em concentrações crescentes (1 - 2,5 - 5,0 - 10,0 - 20,0 - 30,0 - 40,0 e 50,0  $\mu$ U/tubo). A cada tubo foram adicionados, 0,3 ml de solução de anticorpo anti-insulina, 0,2 ml da solução perfusora (colhida diretamente do reservatório) e 0,3 ml de solução de insulina marcada, em tampão borato. Terminada esta etapa, todos os tubos sofreram agitação manual, por 3 a 4 minutos, e estocados a 4°C por 3 a 4 dias. À exceção dos tubos reservados para a determinação da radioatividade máxima, aos demais foram pipetados 2,2 ml de solução contendo 12,5 mg/ml de carvão (NORIT A) e 2,5 mg/ml de DEXTRAN T70; acrescida de soro bovino, na proporção de 10:1.

Após um período de repouso de 20 minutos, os tubos foram centrifugados por 25 minutos e 2800 RPM, em centrífuga refrigerada. A seguir, o sobrenadante foi descartado e os tubos mantidos emborcados, durante 2 horas, em estufa a 60°C ou durante 24 horas em temperatura ambiente. Com exceção desta última etapa, todas as demais foram executadas à baixa temperatura (4°C).

Após o período de dessecação, a radiação de cada tubo foi medida em contador de emissão beta, durante 4 minutos. Os 3 tubos preparados para a determinação da radioatividade máxima, não tiveram seus sobrenadantes descartados.

Baseado nos valores em CPM, obtidos nos tubos contendo insulina conhecida (insulina fria), foi elaborada uma curva pa

padrão para a determinação da quantidade de hormônio ligado, em cada amostra.

Os resultados obtidos foram aplicados à fórmula:

$$C.A.L. = \frac{C - B}{A - B} \times \frac{mU \text{ insulina}}{\mu l \text{ GPAIS}}, \text{ onde;}$$

- C.A.L. é a capacidade aparente de ligação do anticorpo;
- C é a média em CPM das amostras-controle;
- B é a radiação mínima em CPM;
- mU insulina é a quantidade de insulina fria contida em cada tubo;
- $\mu l$  GPAIS é o volume de anticorpo contido em cada tubo.

Os resultados foram expressos em  $\mu U$  de insulina/ml/minuto/ilhota.

## 8. Soluções

Para o isolamento de ilhotas, utilizou-se uma solução hidrossalina, elaborada por HANKS e WALLACE (1949), encerrando a seguinte composição:

|                                                                |          |
|----------------------------------------------------------------|----------|
| NaCl .....                                                     | 8,000 g  |
| KCl .....                                                      | 0,400 g  |
| CaCl <sub>2</sub> anidro .....                                 | 0,140 g  |
| (ou CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O .....                 | 0,185 g) |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....                     | 0,200 g  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anidro .....                  | 0,048 g  |
| (ou Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O .....  | 0,060 g) |
| (ou Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O ..... | 0,121 g) |

|                                            |         |
|--------------------------------------------|---------|
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....             | 0,060 g |
| $\text{NaHCO}_3$ .....                     | 0,350 g |
| $\text{H}_2\text{O}$ destilada (qsp) ..... | 1000 ml |

A cada protocolo, foram adicionados 2,8 mM de glicose.

Para os meios de incubação, foi utilizada a solução tam  
pão-bicarbonato de Krebs-Ringer, com a seguinte composição:

|                                                 |          |
|-------------------------------------------------|----------|
| $\text{NaCl}$ .....                             | 26,886 g |
| $\text{NaHCO}_3$ .....                          | 8,065 g  |
| $\text{KCl}$ .....                              | 1,491 g  |
| $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ..... | 0,813 g  |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ..... | 0,588 g  |
| $\text{H}_2\text{O}$ destilada (qsp) .....      | 1000 ml  |

A cada protocolo, foram adicionados 2% (m/V) de albumin  
na bovina fração V.

Para o radioimunoensaio, empregou-se o polietileno-glico  
l como agente de separação das frações de insulina livre ou  
ligada ao anticorpo. Para equilibrar o pH do meio (7,4), utiliz  
ou-se o tampão veronal (0,15M).

Estoque:

|                                            |          |
|--------------------------------------------|----------|
| Barbital sódico .....                      | 29,428 g |
| Acetado de sódio .....                     | 19,428 g |
| $\text{H}_2\text{O}$ destilada (qsp) ..... | 1000 ml  |

Solução para uso:

|                                            |           |
|--------------------------------------------|-----------|
| Estoque .....                              | 50,000 ml |
| $\text{HCl}$ 0,1 N .....                   | 50,000 ml |
| $\text{NaCl}$ .....                        | 7,650 ml  |
| $\text{H}_2\text{O}$ destilada (qsp) ..... | 1000 ml   |

Para a diluição do polietilenoglicol, elaborou-se o tam  
pão fosfato 0,05 M e pH 7,5.

Estoque 0,2 M (pH = 7,5):

|                                                            |          |
|------------------------------------------------------------|----------|
| KCl .....                                                  | 1,490 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....                      | 13,600 g |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O ..... | 35,800 g |
| NaNO <sub>3</sub> .....                                    | 0,520 g  |
| H <sub>2</sub> O destilada (qsp) .....                     | 1000 ml  |

Solução para uso:

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Estoque .....                    | 250 ml |
| H <sub>2</sub> O destilada ..... | 750 ml |
| Equilibrar para pH 7,5           |        |

Para a contagem da radiação emitida pelo <sup>45</sup>Ca e <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>,  
elaborou-se o líquido de cintilação.

Líquido de cintilação:

|                                |               |
|--------------------------------|---------------|
| Tolueno .....                  | 66,66 ml      |
| Tinoventine .....              | 33,33 ml      |
| (agente tensoativo purificado) |               |
| Omnifluor .....                | 200 mg/100 ml |

## 9. Radioisótopos e reagentes

A albumina bovina fração V, collagenase (260U/mg), atropina e propranolol, procederam da Sigma Chemical Co (St.Louis, Mo., USA) e a 4-aminopiridina, da Merck-Schuchardt (München, Germany).

A insulina suína cristalizada, foi procedente da Eli Lilly Lab. (Indianápolis, Ind., (USA), a insulina murina da No

vo Research Inst. (Bagsvaerd, Denmark) e o anticorpo anti-insulina (WRIGHT). Por sua vez, o  $\text{Na } ^{125}\text{I}$ ,  $^{45}\text{CaCl}$ ,  $^{86}\text{RbCl}$  e Omni-fluor, foram provenientes da New England Nuclear Corp. (Boston, Mass., USA). Agente tensoativo purificado (Tinoventine), da Cyba Geigy (São Paulo, SP, BRA), carvão NORIT A da Amend Drug Chemical (Irvington, NJ, USA). Dextran T70, da Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suécia). PEG 6000 da Atlas Indústrias Químicas (São Paulo, BRA) e do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN (São Paulo, BRA). Ácido clorídrico, ácido tricloacético, álcool etílico absoluto, cloramina T, D-glicose e demais bases e ácidos foram todos puros para análise

#### 10. Tratamento estatístico

Utilizou-se o teste F para a determinação da homogeneidade entre as variâncias das amostras, submetendo-se os dados a seguir, ao teste t de Student.

### III - RESULTADOS

#### 1. Efeito da 4-AP (10,0 mM) sobre a secreção de insulina e o efluxo do $^{45}\text{Ca}$ por ilhotas isoladas e perfundidas

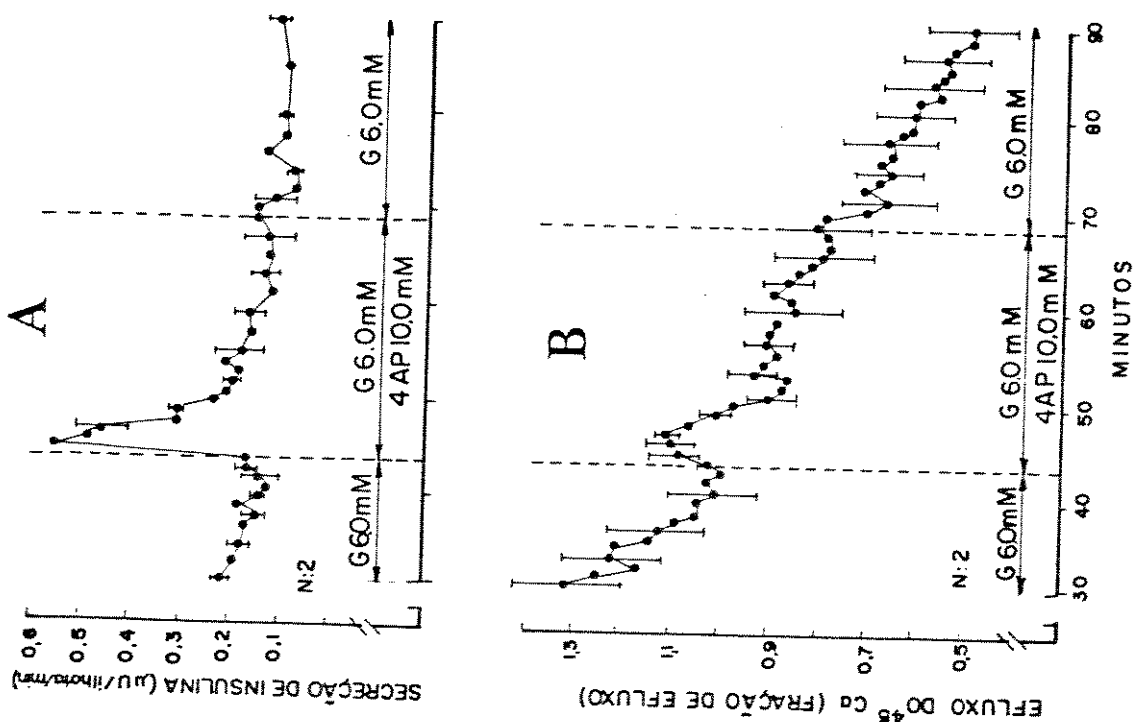
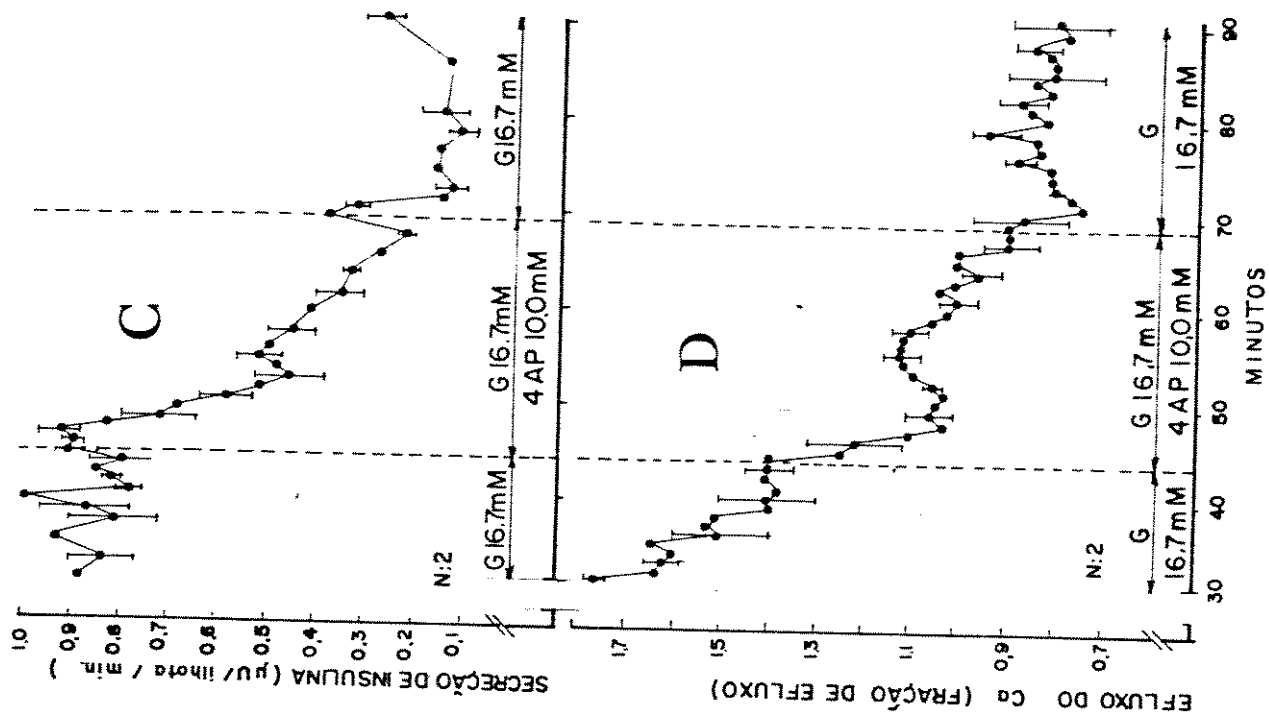
A figura I, mostra a secreção de insulina, medida minuto a minuto (gráficos IA e IC) a dinâmica do efluxo do  $^{45}\text{Ca}$  (gráficos IB e ID), respectivamente, na presença de 6,0 e 16,7 mM de glicose.

A introdução de 10,0 mM de 4-AP no 44º minuto de perfusão, na presença de 6,0 mM de glicose, induziu um aumento rápido e transitório da secreção de insulina. O pico máximo de secreção, cerca de  $0,562 \pm \mu\text{U/ilhota/minuto}$ , foi atingido em um minuto. Os níveis basais de secreção foram retomados já no 50º minuto, permanecendo inalterados até o final da perfusão. A taxa secretória média atingiu os índices de  $0,169 \pm 0,008$  ( $n=11$ ),  $0,245 \pm 0,031$  ( $n=18$ ) e  $0,115 \pm 0,009$  ( $n=9$ )  $\mu\text{U/ilhota/minuto}$ , respectivamente, antes, durante e após a introdução da 4-AP ao meio perfusor. Os níveis de significância alcançaram os valores de  $p < 0,001$  e  $p < 0,1$ , respectivamente, quando as médias da segunda e terceira etapa foram comparadas com a primeira.

Na presença de 16,7 mM de glicose, a 4-AP provocou uma inibição da secreção de insulina, três minutos após ter sido introduzida no meio perfusor. Os primeiros três minutos foram caracterizados por um aparente estímulo insulínico. O efeito inibitório foi máximo a partir do 50º minuto de perfusão ( $0,22$  a  $0,36 \mu\text{U/ilhota/minuto}$ ). Os mais baixos níveis de secreção de insulina, foram mantidos, mesmo após o desvio do fluxo perfusor para condição idêntica à vigente na primeira etapa de

Figura I - Efeito da 4-AP (10,0 m) sobre a dinâmica da secreção de insulina (gráficos IA e IC) e do efluxo do  $^{45}\text{Ca}$  (gráficos IB e ID), por ilhotas isoladas e perfundidas, durante 90 minutos, respectivamente na presença de 6,0 (gráficos superiores) e 16,7 mM de glicose (gráficos inferiores). As linhas verticais interrompidas, indicam os momentos de introdução (44º minuto) e retirada (69º minuto) da 4-AP do meio perfusor. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de n observações.

N = 2 grupos de 100 ilhotas isoladas.



perfusão (na presença de 16,7 mM de glicose). A taxa secretória média atingiu os níveis de  $0,864 \pm 0,02$  (n=11),  $0,532 \pm 0,05$  (n=18) e  $0,185 \pm 0,02$  (m=9)  $\mu\text{U/ilhota/minuto}$ , respectivamente, antes, durante e após a introdução de 4-AP ao meio perfusor. O nível de significância alcançou o valor de  $p < 0,001$ , quando as médias da segunda e terceira etapas foram comparadas com a primeira etapa de perfusão.

Na dinâmica do efluxo do  $^{45}\text{Ca}$ , mostrada na figura I, observamos que a introdução de 10,0 mM de 4-AP, entre o 44º e 69º minuto de perfusão, na presença de 6,0 mM de glicose (gráfico IB), induziu um ligeiro aumento da fração de efluxo do radioisótopo, durante os primeiros cinco minutos de exposição à droga. Por outro lado, a introdução da 4-AP, na presença de 16,7 mM de glicose (gráfico ID), provocou uma queda da fração de efluxo do  $^{45}\text{Ca}$ , durante os primeiros oito minutos de exposição à droga.

## 2. Efeito da 4-AP sobre o efluxo do $^{86}\text{Rb}$ , por ilhotas isoladas e perfundidas, na ausência ou na presença de glicose

Em grupos de ilhotas previamente marcadas como o  $^{86}\text{Rb}$ , a introdução de 0,1 mM de 4-AP (figura II), entre o 30º e o 50º minuto de perfusão, tanto na ausência (gráfico superior), como na presença (gráfico inferior), de 3,0 mM de glicose não produziu modificação aparente sobre o efluxo do radioisótopo. De qualquer forma, houve a evidência de uma fraca redução do efluxo, quando as ilhotas foram perfundidas na presença de glicose.

Resultados similares foram obtidos quando se aumentou a concentração de 4-AP para 1,0 mM (figura III). Tanto na ausência (gráfico superior), como na presença (gráfico inferior),

Figura II - Efeito da adição de 4-AP (0,1 mM) sobre a dinâmica do efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , na ausência (gráfico superior) e na presença de 3,0 mM de glicose (gráfico inferior), por ilhotas pancreáticas isoladas e perfundidas, durante 70 minutos. As linhas verticais interrompidas, indicam os momentos de introdução (30º minuto) e retirada (50º minuto) da 4-AP do meio perfusor. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de N observações.

N = número de observações efetuadas com a utilização de 70 a 120 ilhotas em cada experiência.

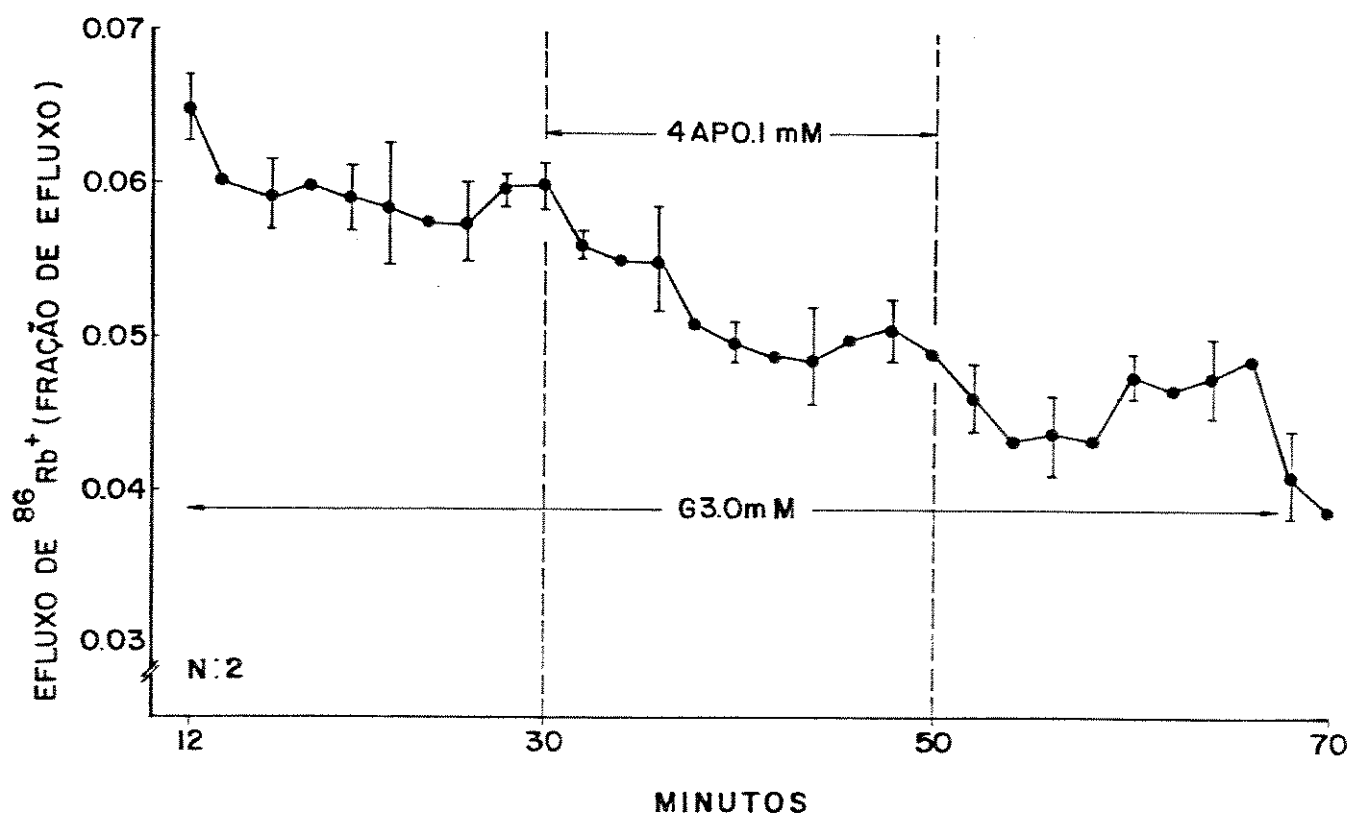
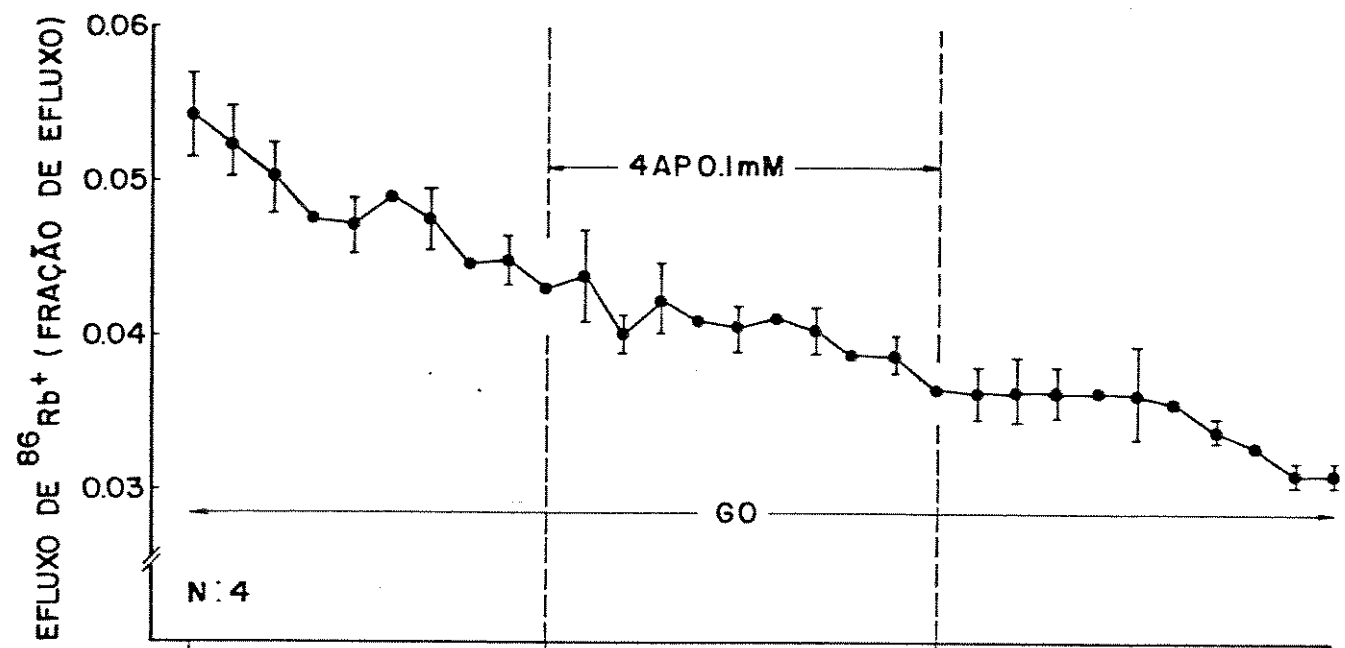
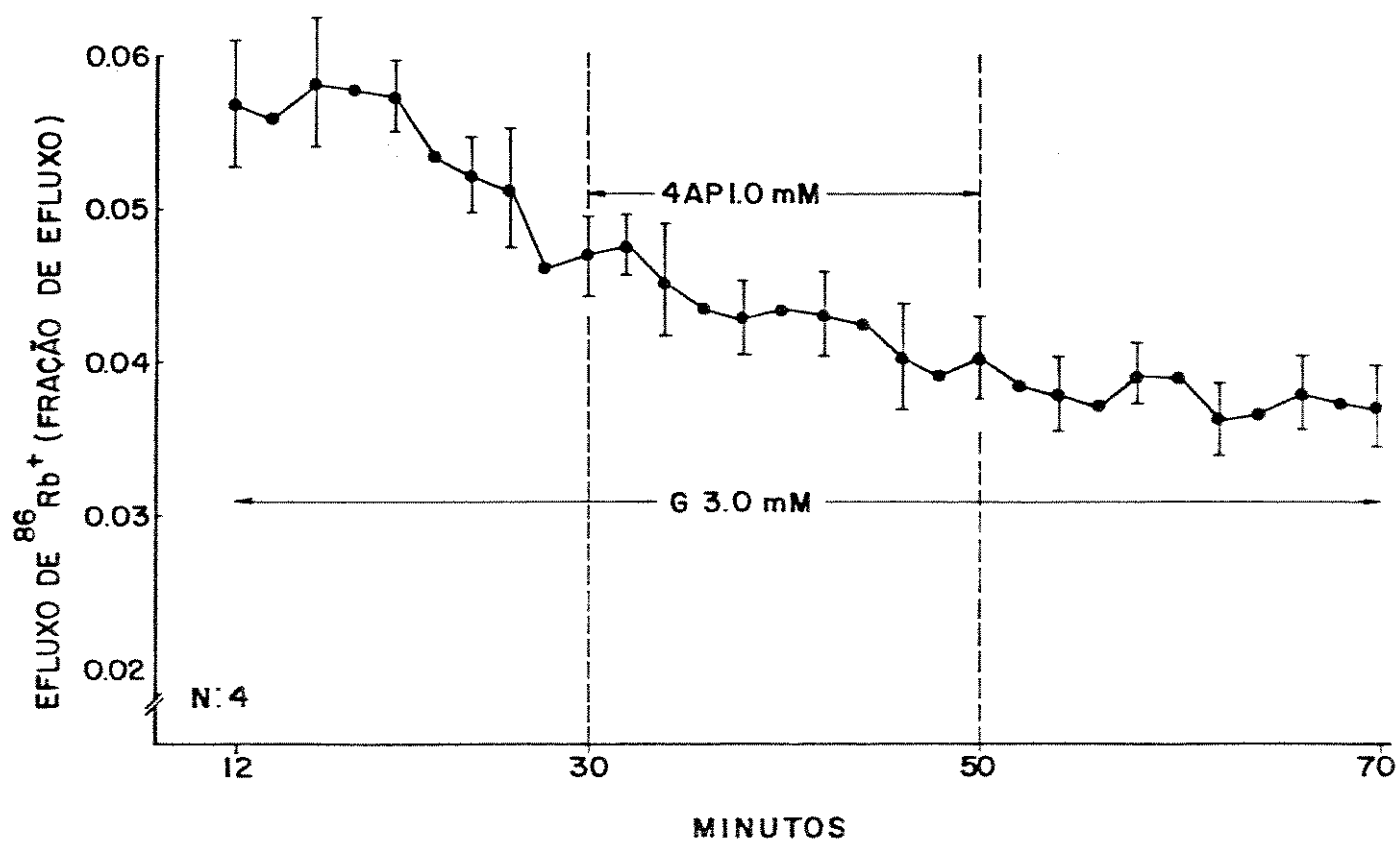
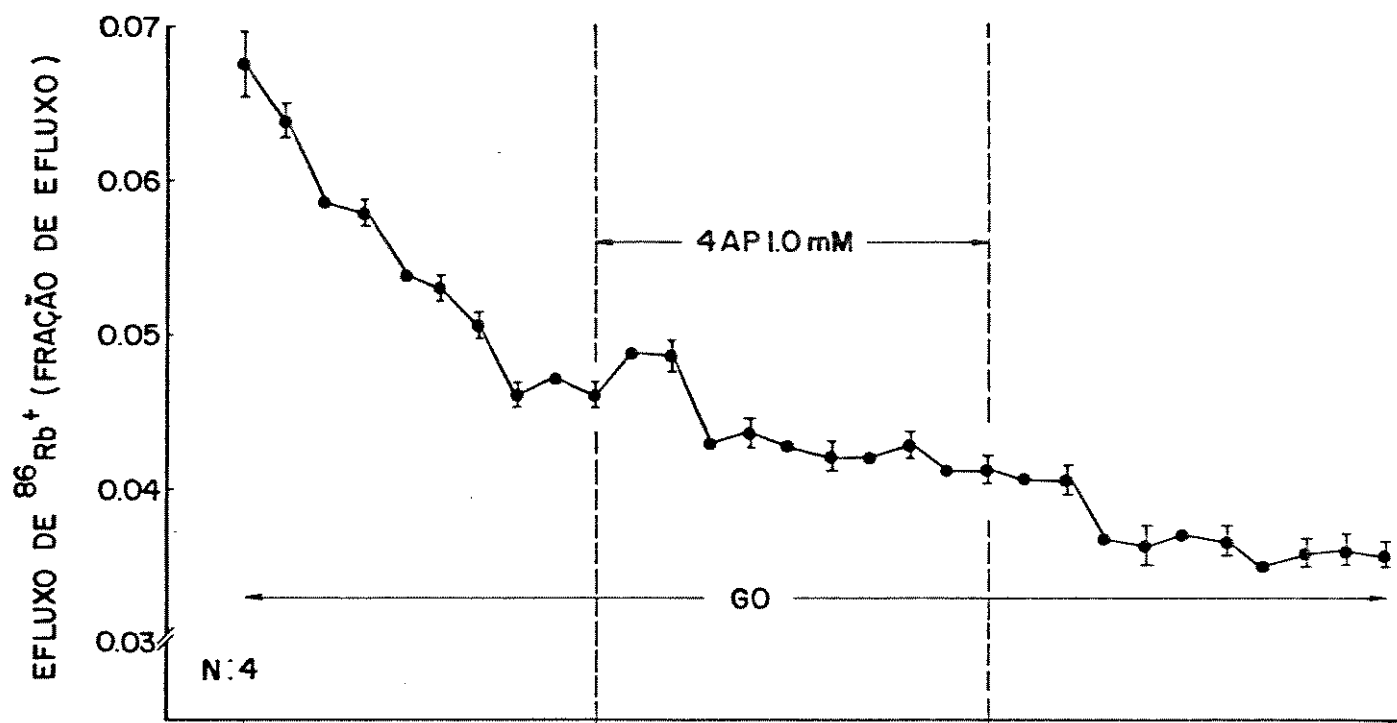


Figura III - Efeito da adição de 4-AP (1,0 mM) sobre a dinâmica do efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , na ausência (gráfico superior) e na presença de 3,0 mM de glicose (gráfico inferior), por ilhotas pancreáticas isoladas e perfundidas, durante 70 minutos. As linhas verticais interrompidas indicam os momentos de introdução (30º minuto) e retirada (50º minuto) da 4-AP do meio de perfusão. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de N observações.

N = número de observações efetuadas com a utilização de 70 a 120 ilhotas em cada experiência.



de 3,0 mM de glicose, não se constatou modificação aparente. Aqui, houve a evidência de uma débil elevação do efluxo, do  $^{86}\text{Rb}$ , quando as ilhotas foram perfundidas tanto na ausência como na presença de glicose.

Todavia, quando se decuplicou a concentração da 4-AP para 10,0 mM (figura IV), observou-se um aumento lento e progressivo do efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , na ausência de glicose (gráfico inferior). Mesmo após a retirada da 4-AP, no 50º minuto, o efluxo persistiu elevado, indicando um provável efeito residual da droga. Na presença de 3,0 mM de glicose (gráfico superior), a 4-AP, em menos de dois minutos, induziu um aumento rápido e de elevada magnitude do efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ . Esta elevação foi se atenuando, a partir do 36º minuto, contudo, mesmo após a retirada da droga no 50º minuto, novamente constatou-se uma aparente persistência do efluxo alto, até o final da perfusão.

Aumentando-se a concentração da glicose no meio perfusor, para 6,0 e 16,7 mM, e mantendo-se a de 4-AP, ao nível de 10,0 mM (figura V), foi ainda detectado, uma rápida elevação do efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , principalmente quando as ilhotas foram perfundidas com uma concentração limiar de glicose (gráfico superior). Em concentração supralimiar (gráfico inferior), observou-se uma aparente atenuação do efeito da 4-AP, sobre o efluxo do radioisótopo. Este evento foi também evidenciado quando se analisou o efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , na presença de 3,0 mM (figura IV - gráfico superior) e 6,0 mM (figura V - gráfico superior) de glicose, em ilhotas perfundidas com 10,0 mM de 4-AP.

Com a retirada da 4-AP do meio perfusor, observou-se que, tanto com 6,0 mM quanto com 16,7 mM da hexose, uma elevação residual do efluxo do  $^{86}\text{Rb}$  (figura V).

Figura IV - Efeito da adição de 4-AP (10,0 mM) sobre a dinâmica do efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , na ausência (gráfico infe-rior) e na presença de 3,0 mM de glicose (gráfico superior), por ilhotas isoladas e perfundidas, du-rante 70 minutos. As linhas verticais interrompi-das indicam os momentos de introdução (30º minu-to) e retirada (50º minuto) da 4-AP do meio per-fusor. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro pa-drão de N observações.

N = número de observações efetuadas com a utiliza-ção de 70 a 120 ilhotas em cada experiência.

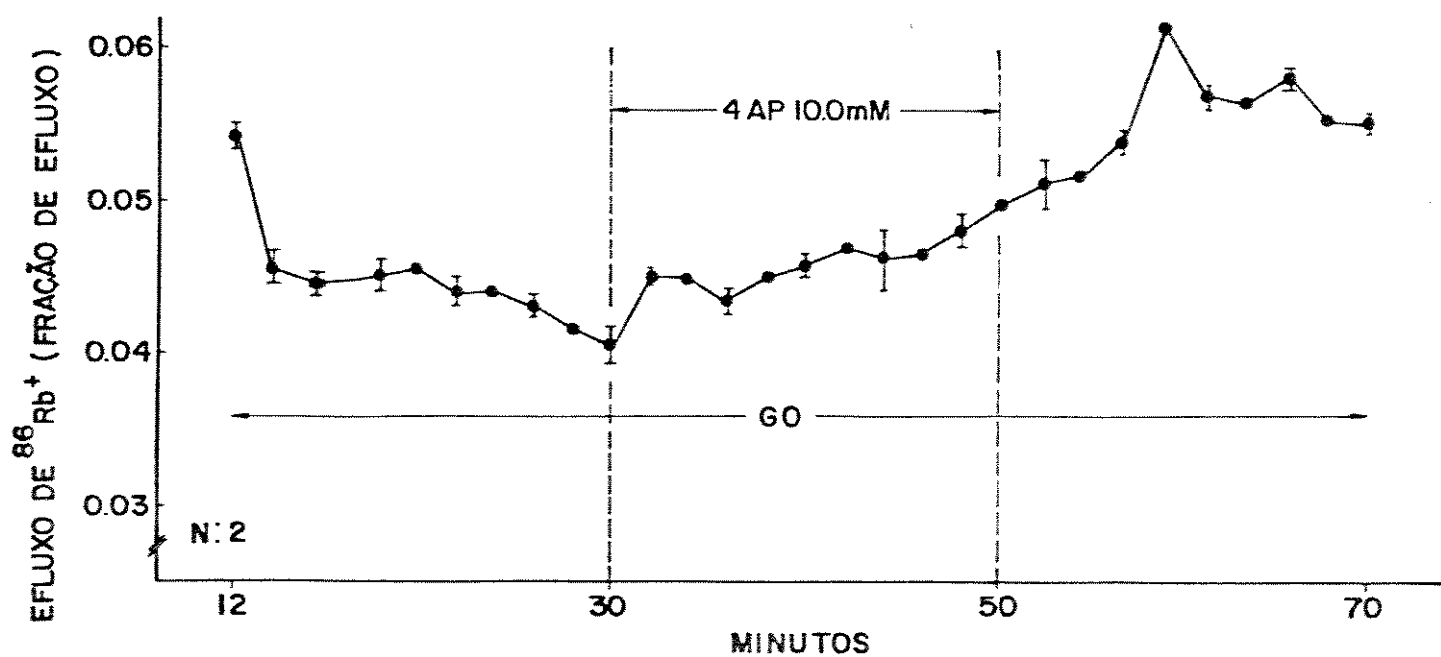
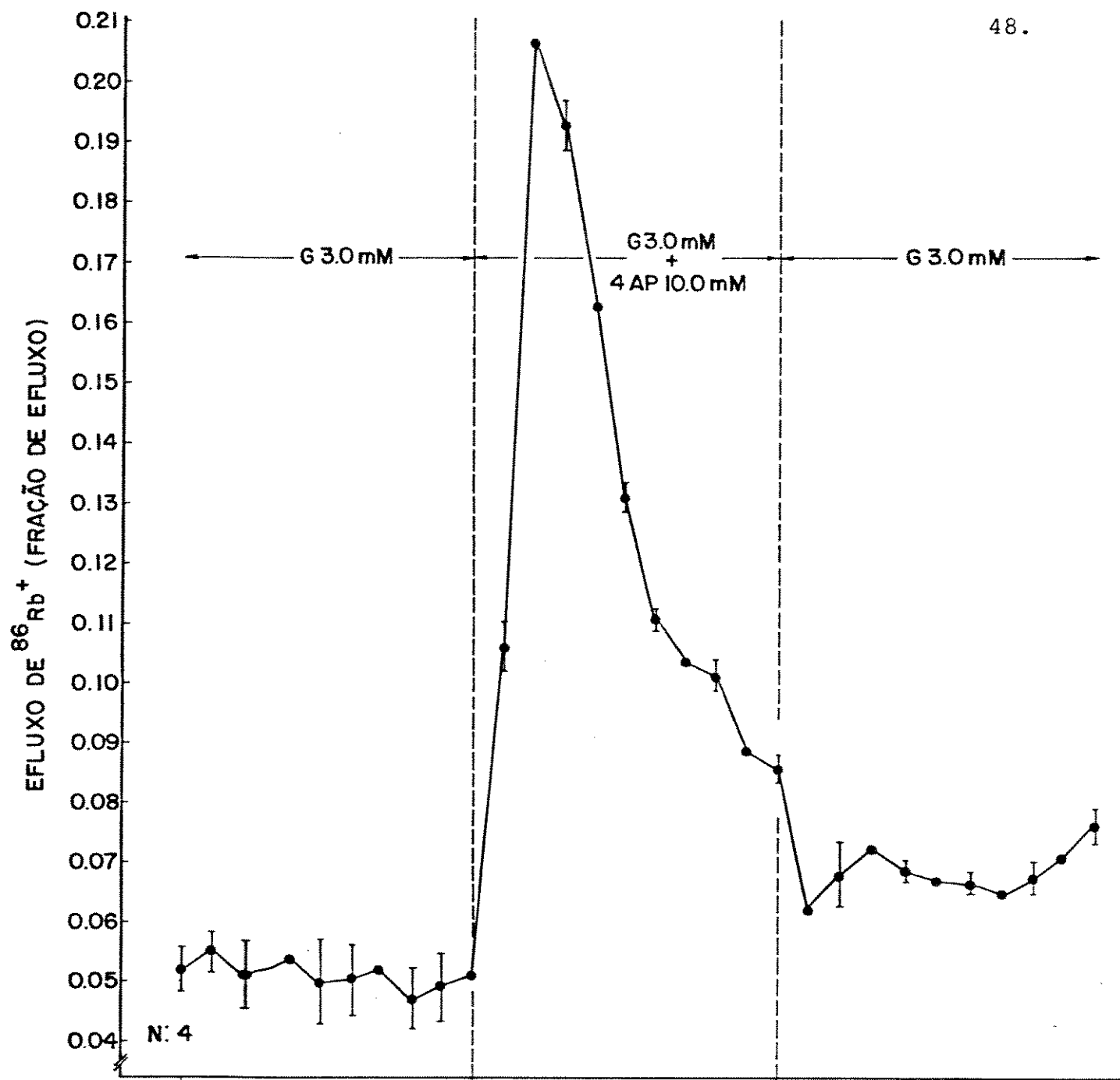
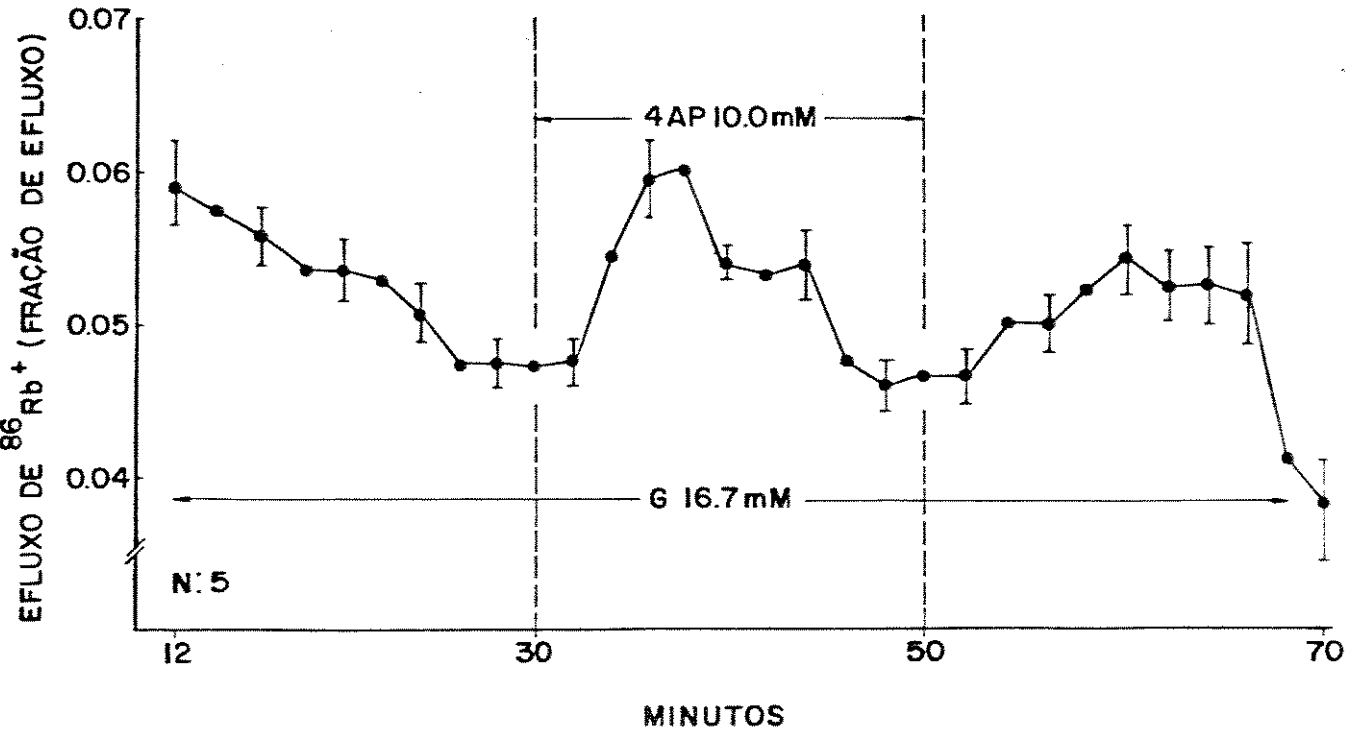
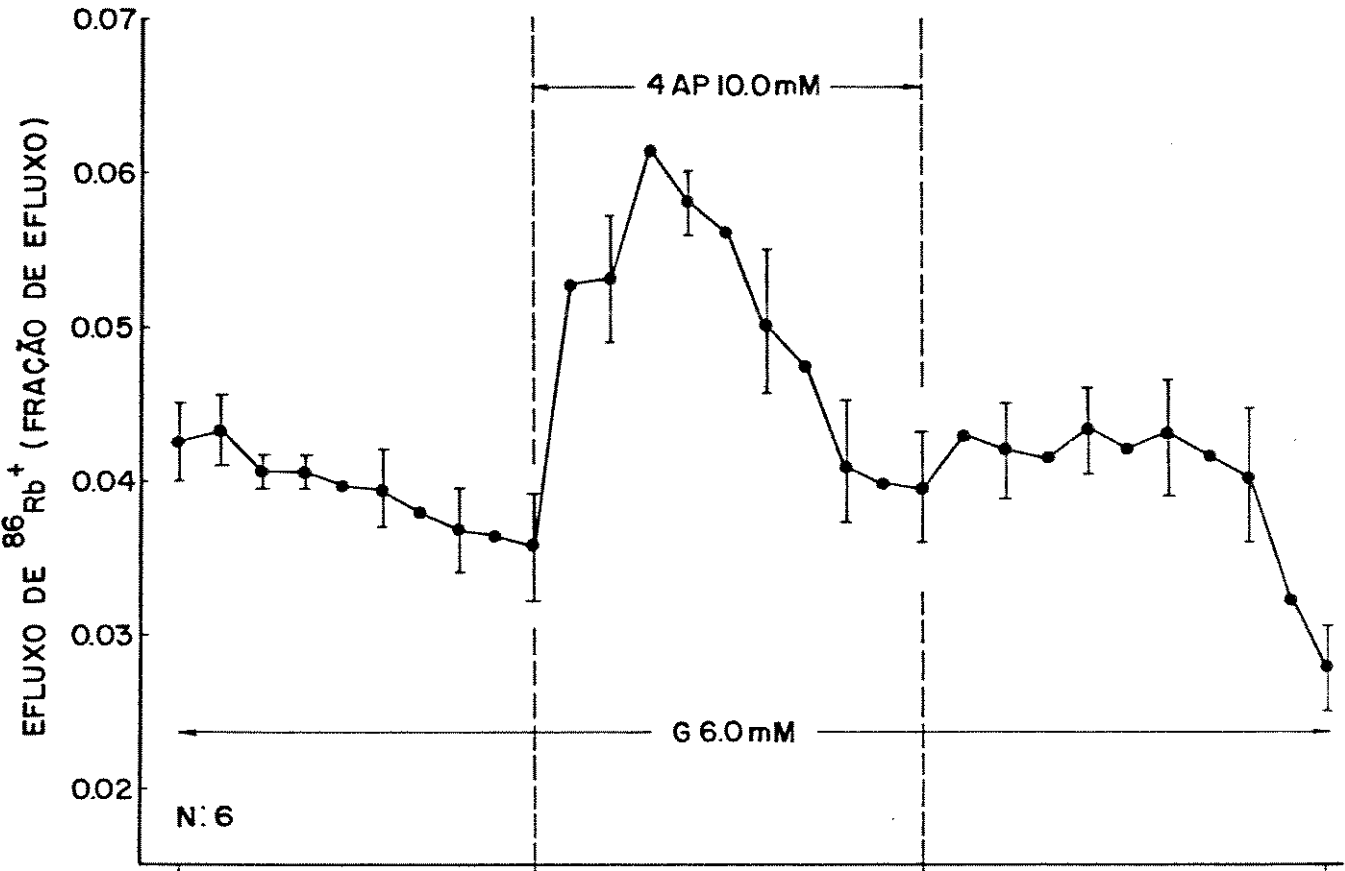


Figura V - Efeito da adição da 4-AP (10,0 mM) sobre a dinâmica do efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , na presença de 6,0 (gráfico superior) e 16,7 mM de glicose (gráfico inferior), por ilhotas isoladas e perfundidas, durante 70 minutos. As linhas verticais interrompidas indicam os momentos de introdução (30º minuto) e a retirada (50º minuto) da 4-AP do meio perfusor. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de N observações. N = número de observações efetuadas com a utilização de 70 a 120 ilhotas em cada experiência.



Na figura VI, representou-se o efeito da adição simultânea de 50,0  $\mu$ M de propranolol (gráfico superior) e de 15,0  $\mu$ M de atropina (gráfico inferior), à adição de 10,0 mM de 4-AP, no 30º minuto de perfusão, na presença de 6,0 mM de glicose. Nestas condições experimentais, o efeito da 4-AP sobre o efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , aparentemente não sofreu alterações significativas. Todavia, o efeito estimulatório da 4-AP sobre o efluxo do radioisótopo, pareceu mais lento, em ambas situações, seja com a adição de bloqueador beta adrenérgico ou colinérgico muscarínico.

A tendência de decréscimo do efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , após a elevação inicial induzida pela 4-AP, não foi evidenciada quando as ilhotas foram perfundidas, simultaneamente com o propranolol. Retirando-se a 4-AP do meio perfusor, em ambas situações (figura VI), notou-se novamente, que a fração de efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , não retornou aos níveis de decaimento.

### 3. Efeito da 4-AP (10,0 mM) sobre a incorporação de $^{45}\text{Ca}$ , por ilhotas isoladas e incubadas

A incorporação de  $^{45}\text{Ca}$  pelas ilhotas de Langerhans, foi medida após 90 minutos de incubação (figura VII). Mantendo-se a concentração de 4-AP em 10,0 mM, detectou-se um aumento da incorporação de  $^{45}\text{Ca}$ , tanto na ausência, quanto na presença de 6,0 e 16,7 mM de glicose. Os valores atingidos,  $6,47 \pm 0,39$  (n=22),  $11,14 \pm 0,97$  (n=21) e  $21,34 \pm 2,19$  (n=7), foram altamente significantes, quando comparados aos resultados obtidos na ausência de 4-AP,  $3,85 \pm 0,31$  (n=28),  $5,28 \pm 0,43$  (n=18) e  $0,92 \pm 1,02$  (n=12), respectivamente, na ausência e na presença de 6,0 e 16,7 mM de glicose, para ambos grupos experimentais.

Figura VI - Efeito da adição simultânea de 4-AP (10,0 mM) e propranolol (50,0  $\mu$ M) - gráfico superior - e 4-AP (10,0 mM) e atropina (15,0  $\mu$ M) - gráfico inferior, sobre a dinâmica do efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , na presença de 6,0 mM de glicose, por ilhotas pancreáticas isoladas e perfundidas, durante 70 minutos. As linhas verticais interrompidas indicam os momentos de introdução (30º minuto) e retirada (50º minuto) da 4-AP do meio perfusor. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de N observações.

N = número de observações efetuadas com a utilização de 70 a 120 ilhotas em cada experiência.

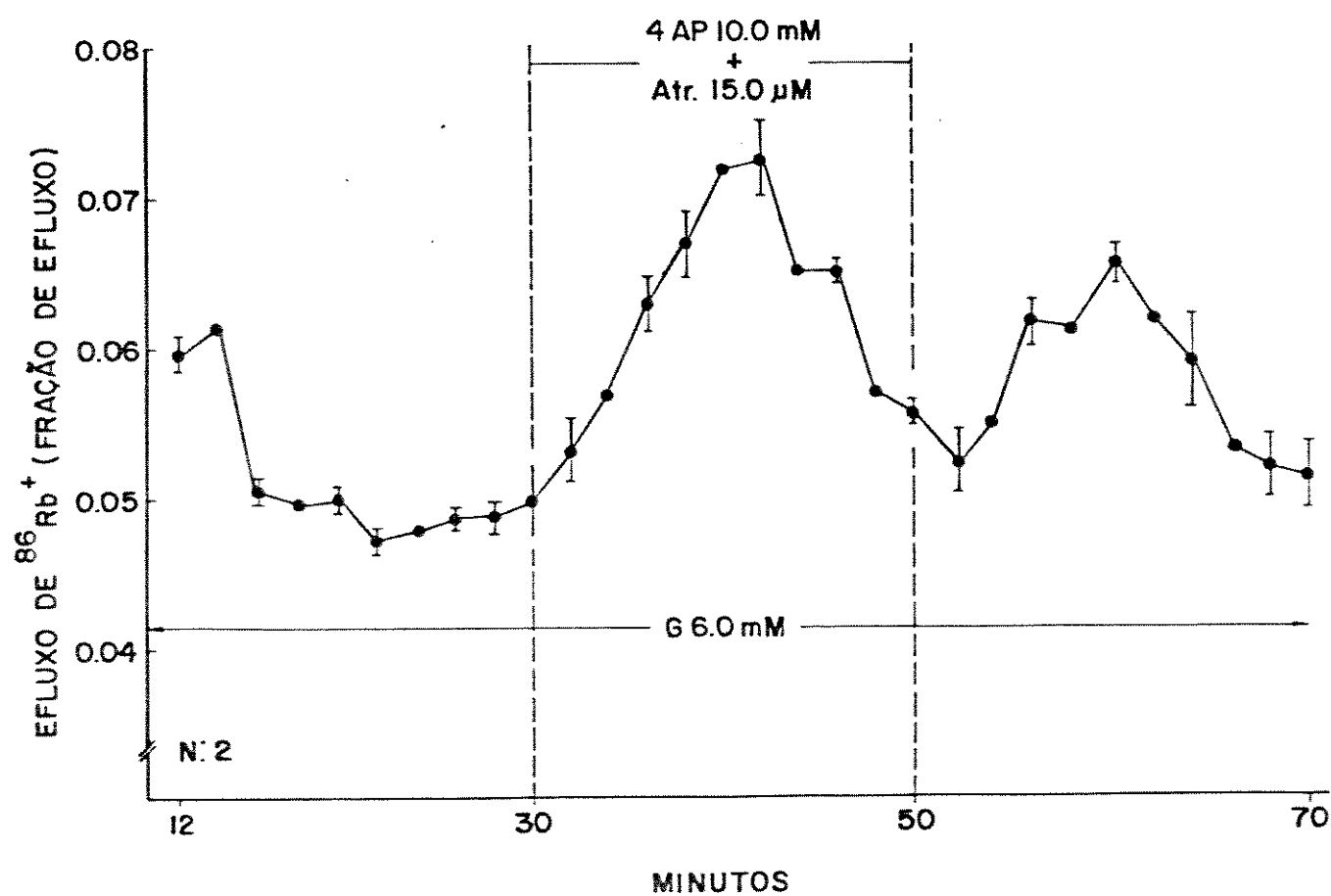
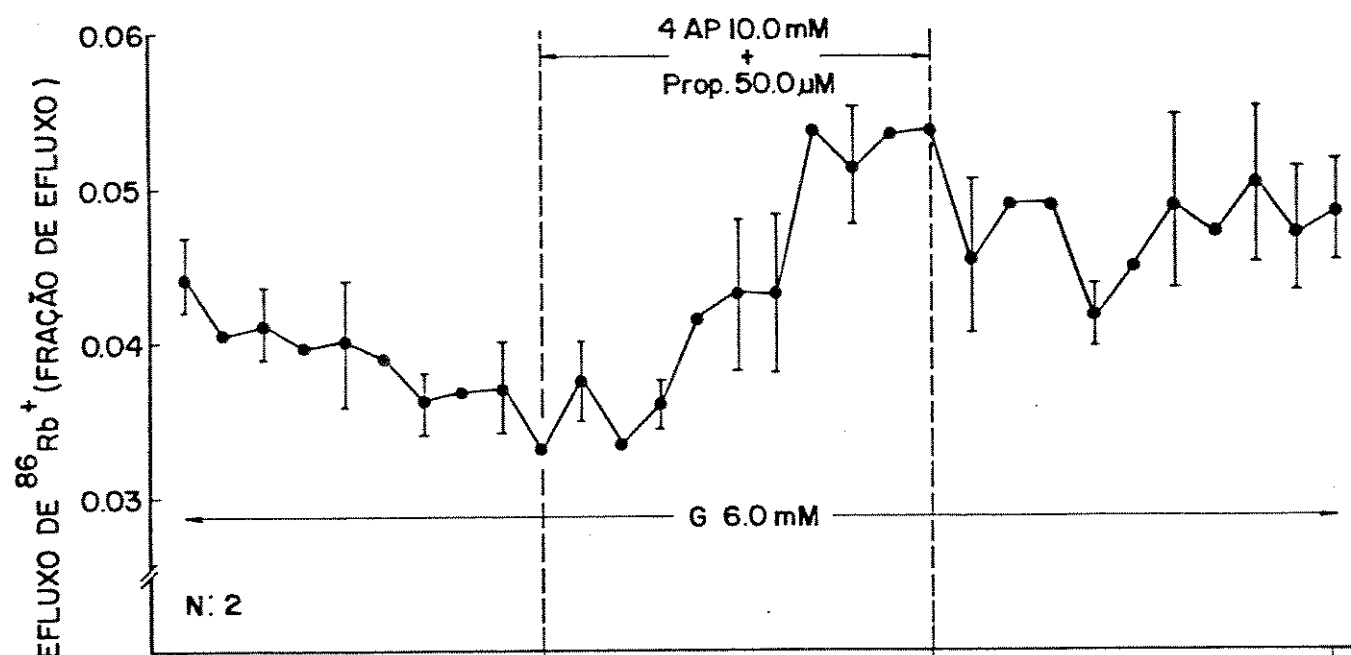
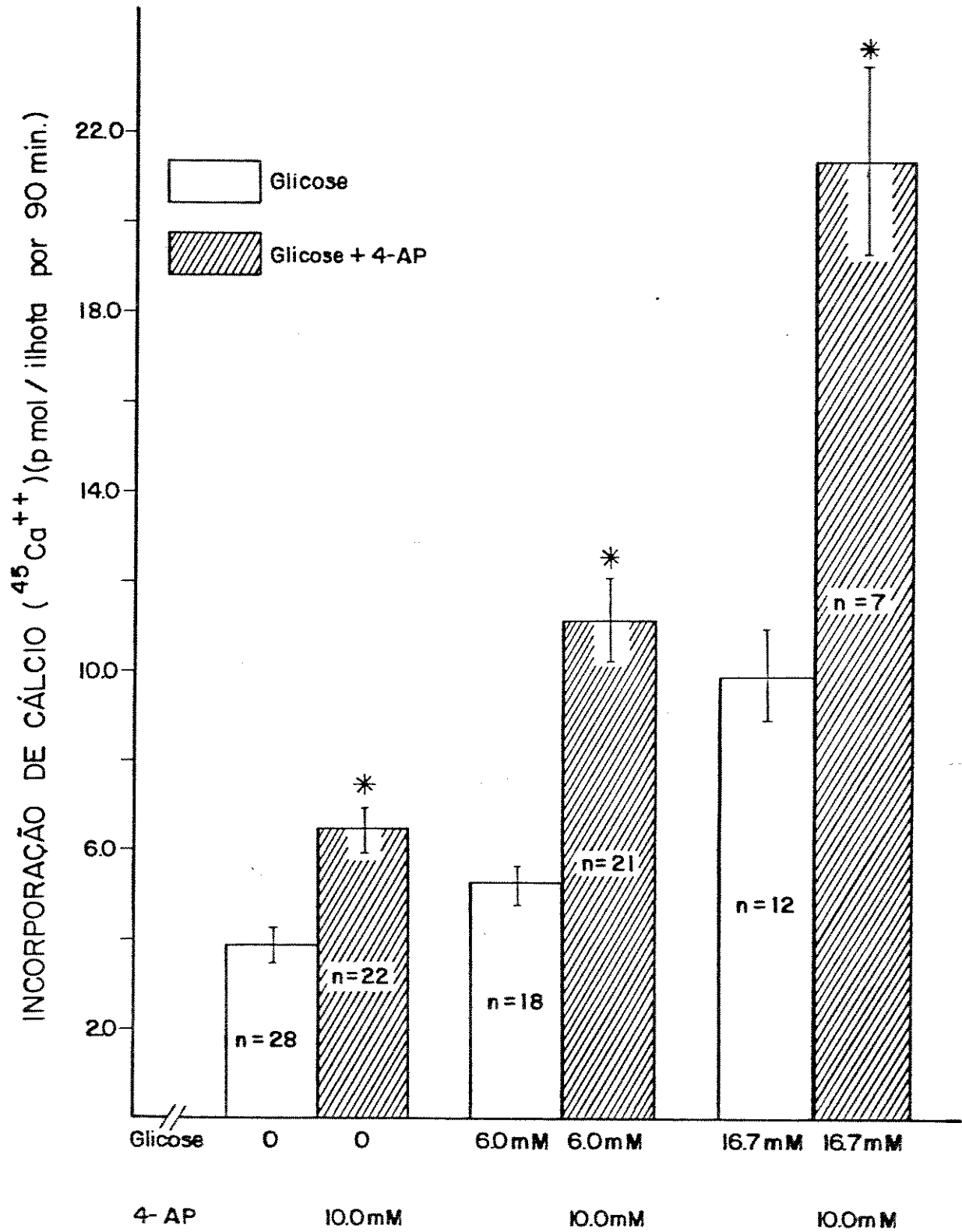


Figura VII - Efeito da 4-AP (10,0 mM) sobre a incorporação de  $^{45}\text{Ca}$ , na ausência e na presença de 6,0 e 16,7 mM de glicose, por ilhotas pancreáticas isoladas e perfundidas durante 90 minutos. As barras verticais vazias e hachuriadas, indicam, respectivamente, os resultados obtidos na ausência e na presença de 4-AP. Os valores de cada barra, representam a média  $\pm$  erro padrão de N observações. Os valores de p são expressos, segundo comparação entre as médias obtidas, na ausência e na presença de 4-AP. Em todas as situações, os resultados foram altamente significantes ( $p < 0,001$ ), atingindo 68%, 110% e 115%, respectivamente na ausência e na presença de 6,0 mM de glicose, quando comparado com o controle (na ausência de 4-AP). N = número de grupos de 8 ilhotas cada.



\*  $p < 0,001$

4. Efeito da 4-AP (10,0 mM) sobre o metabolismo da glicose, por ilhotas isoladas e incubadas

A oxidação da glicose pelas ilhotas isoladas, foi avaliada através da medida do  $^{14}\text{CO}_2$ , liberado no meio de incubação, contendo (U- $^{14}\text{C}$ )-D glicose, na presença de 16,7 mM de glicose. A figura VIII mostra que 1,0 e 10,0 mM de 4-AP reduziu de modo significante o metabolismo da glicose de  $23,28 \pm 1,89$  (n=10), para  $18,78 \pm 1,98$  (n=10) e  $10,75 \pm 0,99$  (n=10) picomol/ilhota/120 minutos, proporcionalmente à concentração da droga introduzida no meio.

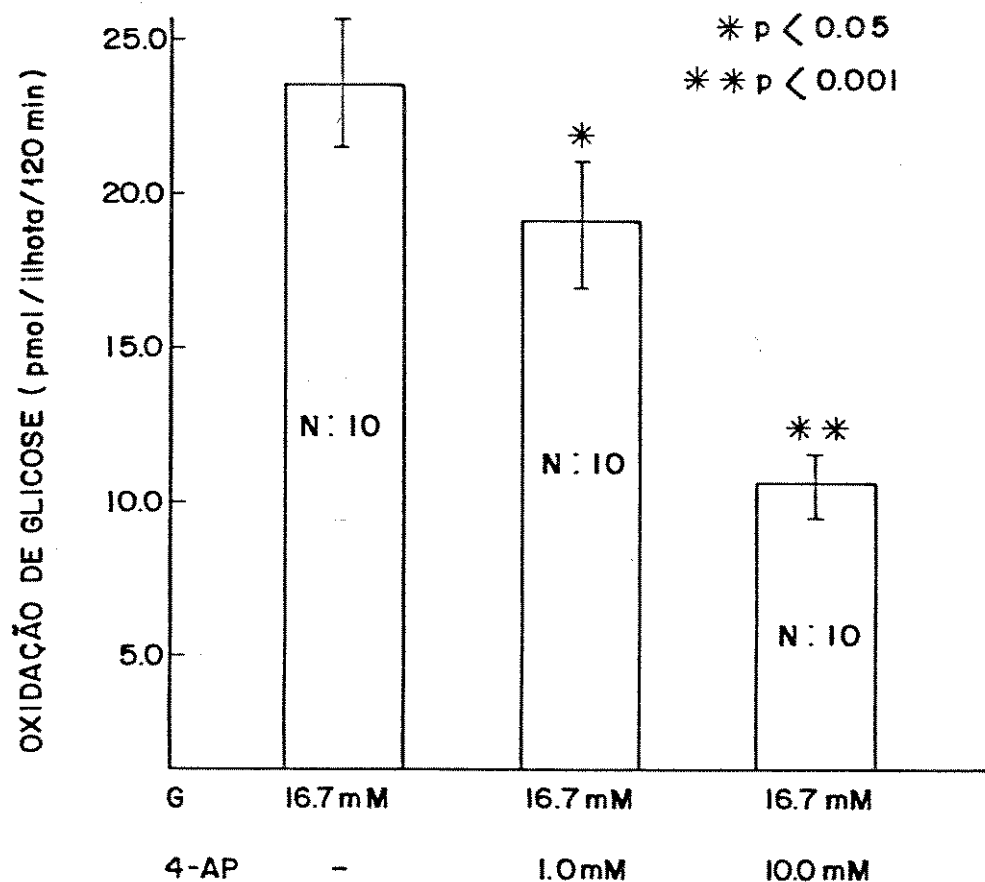


Figura VIII - Efeito da 4-AP (1,0 e 10,0 mM), sobre a oxidação da glicose, por ilhotas isoladas e incubadas, durante 120 minutos, na presença de 16,7 mM do açúcar. Os valores de cada barra, representam a média  $\pm$  erro padrão de N observações. Os valores de p são expressos segundo comparação com a média obtida na ausência de 4-AP. Nas duas condições experimentais, os resultados são significantes, respectivamente, na presença de 1,0 mM ( $p < 0,05$ ) e 10,0 mM ( $p < 0,001$ ) de 4-AP.

N = número de grupos de 15 ilhotas cada.

#### IV - DISCUSSÃO

Basicamente, a maioria dos trabalhos registrados na literatura, acerca dos efeitos da 4-AP sobre a permeabilidade do  $K^+$ , em tecidos excitáveis, se concentra em vários elementos comuns, segundo proposições de PELHATE e PICHON (1974), MEVES e PICHON (1975, 1977), ULBRICHT e WAGNER (1976), YEH et alii (1976), LEANDER, ARNER e JOHANSSON (1977), LUNDH, LEANDER e THESLEFF (1977) e THESLEFF (1980), dentre outros. Os pontos comuns encontrados são alinhados, de acordo com a integração entre os eventos influenciados pela 4-AP:

- a 4-AP efetivamente bloqueia a condutância do  $K^+$  - voltagem dependente, responsável pela corrente de repolarização da membrana;

- o retardo da repolarização da membrana propicia o prolongamento do potencial de ação;

- o prolongamento do potencial de ação tem um efeito facilitatório sobre a incorporação de  $Ca^{2+}$  pela célula e a liberação do cátion de organelas citoplasmáticas;

- adicionalmente, a 4-AP teria uma ação direta sobre os canais de  $Ca^{2+}$  - voltagem sensíveis;

- o bloqueio da condutância do  $K^+$ , induzido pela 4-AP, é gradualmente atenuado, à medida em que se eleva o nível de despolarização da membrana, para valores mais positivos ou, quando se aumenta a frequência de aplicação do estímulo despolarizante.

Não foi o objetivo do presente trabalho, realizar uma abordagem eletrofisiológica, para uma análise mais pormenorizada dos efeitos da 4-AP sobre a permeabilidade do  $K^+$  em ilho

tas pancreáticas. Contudo, os resultados obtidos, permitem-nos tirar algumas conclusões prévias, que servirão de base para uma confrontação com os dados sobre permeabilidade do  $K^+$ , disponíveis na literatura (BOSCHERO et alii, 1977; BOSCHERO e MALAISSE, 1979, ATWATER, RIBALET e ROJAS, 1978; MALAISSE et alii, 1978a; ATWATER et alii, 1979 e ATWATER, 1980 dentre outros).

Mediante a maioria dos resultados relatados por vários autores (PELHATE e PICHON, 1974; MEVES e PICHON, 1975 e 1977; BOWMAN, HARVEY e MARSHALL, 1977; LUNDH, 1978; LEANDER e THESLEFF, 1980 e MOLGÓ e THESLEFF, 1982, dentre outros), nossa expectativa era a de obter um efeito inibitório da 4-AP, sobre o efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , em ilhotas pancreáticas. Adicionalmente esperava-se que a 4-AP exibisse uma ação excitatória sobre a secreção de insulina, em ambas situações, na presença de 6,0 e 16,7 mM de glicose. A redução da permeabilidade do  $K^+$  associada a um aumento da incorporação de  $\text{Ca}^{2+}$ , induziria uma despolarização da membrana das células beta e consequente potencialização da secreção de insulina. Todavia, na concentração utilizada (10,0 mM), a 4-AP, de maneira aparentemente paradoxal, aumentou o efluxo do  $^{86}\text{Rb}$  em ilhotas pancreáticas isoladas, na ausência ou na presença de 3,0, 6,0 e 16,7 mM de glicose. Por outro lado, na presença de 6,0 mM de glicose, a 4-AP induziu um aumento transitório da secreção de insulina, em contraposição à drástica inibição da secreção, observada quando se perfundiu as ilhotas com 16,7 mM do açúcar.

O ponto de partida, para explicar as ações paradoxais da 4-AP sobre alguns parâmetros da fisiologia das células beta, deve envolver uma abordagem de seu efeito inibitório sobre o metabolismo da glicose.

A inibição da oxidação da glicose produzida pela 4-AP, provavelmente provocou uma séria perturbação da sequência de eventos do mecanismo secretório de insulina. Assim, a geração de nucleotídeos piridínicos reduzidos estaria comprometida, concorrendo para uma diminuição da relação  $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+/\text{NADP}$ . Em decorrência desse fato, o potencial de oxi-redução cairia a tal ponto, que a dinâmica do sistema ionoforético das células beta seria perturbada. Ademais, a inibição do metabolismo da glicose também concorreria para uma queda da produção de ATP, reduzindo o aporte energético responsável para ativação do sistema efector de secreção de insulina.

O aumento do efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , em parte, poderia ser explicado pela depressão do metabolismo da glicose, quando as ilhotas foram perfundidas na presença de 10,0 mM de 4-AP.

A flagrante diferença observada no efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , quando ilhotas foram perfundidas, na ausência e na presença de 3,0 mM de glicose, deveu-se possivelmente ao fato de que na presença do açúcar, a célula beta é capaz de incorporar uma quantidade maior do radioisótopo (HEDESKOV, 1980 e WOLLHEIM e SHARP, 1981). Por outro lado, as diferenças verificadas quando as ilhotas foram perfundidas na presença de 3,0, 6,0 e 16,7 mM, parecem indicar uma inibição competitiva da 4-AP sobre o metabolismo da hexose. Essa indicação foi fundamentada no conhecimento de que a quantidade de  $^{86}\text{Rb}$ , incorporada nas três concentrações de glicose mencionadas, é aproximadamente equivalente (HEDESKOV, 1980 e WOLLHEIM e SHARP, 1981).

A alteração da permeabilidade do  $^{86}\text{Rb}$ , provavelmente não envolveu a interação da 4-AP com receptores beta-adrenérgicos ou colinérgicos muscarínicos, uma vez que a introdução de propranolol ou atropina no meio perfusor, basicamente não

afetou o efluxo do radioisótopo.

Mesma proposição foi também formulada por HENQUIN, MEISSNER e PREISLER (1979), que estudaram os efeitos da 9-aminoacridina e do tetraetilamônio (bloqueadores de canais de  $K^+$  - voltagem dependentes), sobre as propriedades elétricas e a secreção de insulina por ilhotas pancreáticas.

Quanto à persistência de uma elevada fração de efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , mesmo após a remoção da 4-AP do meio perfusor, parece tratar-se de um efeito residual da droga, sobre o metabolismo.

Como ficou demonstrado, o efluxo do  $^{86}\text{Rb}$  sempre se apresentou aumentado, na presença de 10,0 mM de 4-AP. À primeira vista, verificou-se que à medida em que se incrementava a concentração de glicose no meio perfusor, a fração de efluxo do  $^{86}\text{Rb}$  se tornava menor, diante de uma mesma concentração de 4-AP. Esta constatação nos levou a acreditar na existência de um antagonismo entre os efeitos metabólicos e catiônicos da glicose, por um lado, e os da 4-AP, do outro. Desta forma, mesmo que a 4-AP tenha inibido a permeabilidade ao  $K^+$  - voltagem dependente, é provável que este efeito tenha sido totalmente mascarado pela ativação da permeabilidade ao  $K^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -sensível ( $\text{PK}_{\text{Ca}}$ ). Esta  $\text{PK}_{\text{Ca}}$ , tem sido postulada para as células beta por MATTHEWS (1975), ATWATER e BEIGELMAN (1976) e ATWATER et alii (1979).

Indícios de que a 4-AP promove a ativação de uma  $\text{PK}_{\text{Ca}}$ , foram registrados por NICHOLSON, TEN BRUGGENCATE e SENKOWITSCH (1976) em cerebelo, que no entanto, não mencionaram qualquer efeito da droga sobre o metabolismo.

Posteriormente, HERMANN e GORMAN (1981), demonstra

ram que concentrações elevadas de 4-AP ativam extraordinariamente, a permeabilidade ao  $K^+$ , dependente de  $Ca^{2+}$  citosólico livre. Esses autores propuseram a idéia de que a ativação da  $PK_{Ca}$  por concentrações elevadas de 4-AP, mascara e sobrepõe totalmente a redução do efluxo  $K^+$ , concomitantemente induzida pela droga, em neurônios marca-passo de moluscos. Este mesmo quadro iônico paradoxal, seria reproduzível em tecidos excitáveis onde a  $PK_{Ca}$  representasse, percentualmente, a fração predominante do efluxo de  $K^+$  total. Neste sentido, vale assinalar que ATWATER (1980), propôs que o efeito principal da glicose em inibir a permeabilidade do  $K^+$ , seria exatamente sobre a  $PK_{Ca}$ , atuando sobretudo sobre o sistema tamponante do  $Ca^{2+}$  citosólico. Restaria investigar, à luz da eletrofisiologia, a representatividade fracional de cada permeabilidade em células beta, para definitivamente comprovarmos ou não, tal hipótese.

Como a 4-AP afetaria o mecanismo de ativação da  $PK_{Ca}$ ? Atribuir, somente ao acúmulo de íons  $Ca^{2+}$  mobilizado de estoques subcelulares, em consequência da inibição do metabolismo da glicose, seria uma posição algo simplista. É provável, que a ativação da  $PK_{Ca}$ , induzida pela 4-AP em ilhotas pancreáticas, seja decorrente da associação de vários eventos simultâneos ou consecutivos. Assim, o nível de incorporação de  $Ca^{2+}$ , produzido pela despolarização da membrana das células beta e/ou por uma ação direta da droga sobre os canais de  $Ca^{2+}$  - voltagem sensíveis, também contribuiria para a elevação citosólica do cátion, conforme proposição de LUNDH, LEANDER e THESLEFF (1977), dentre outros. Segundo BOWMAN, HARVEY e MARSHALL (1977), a elevação do  $Ca^{2+}$  citosólico poderia, adicionalmente, ser originária do deslocamento do cátion de sítios da membrana e de

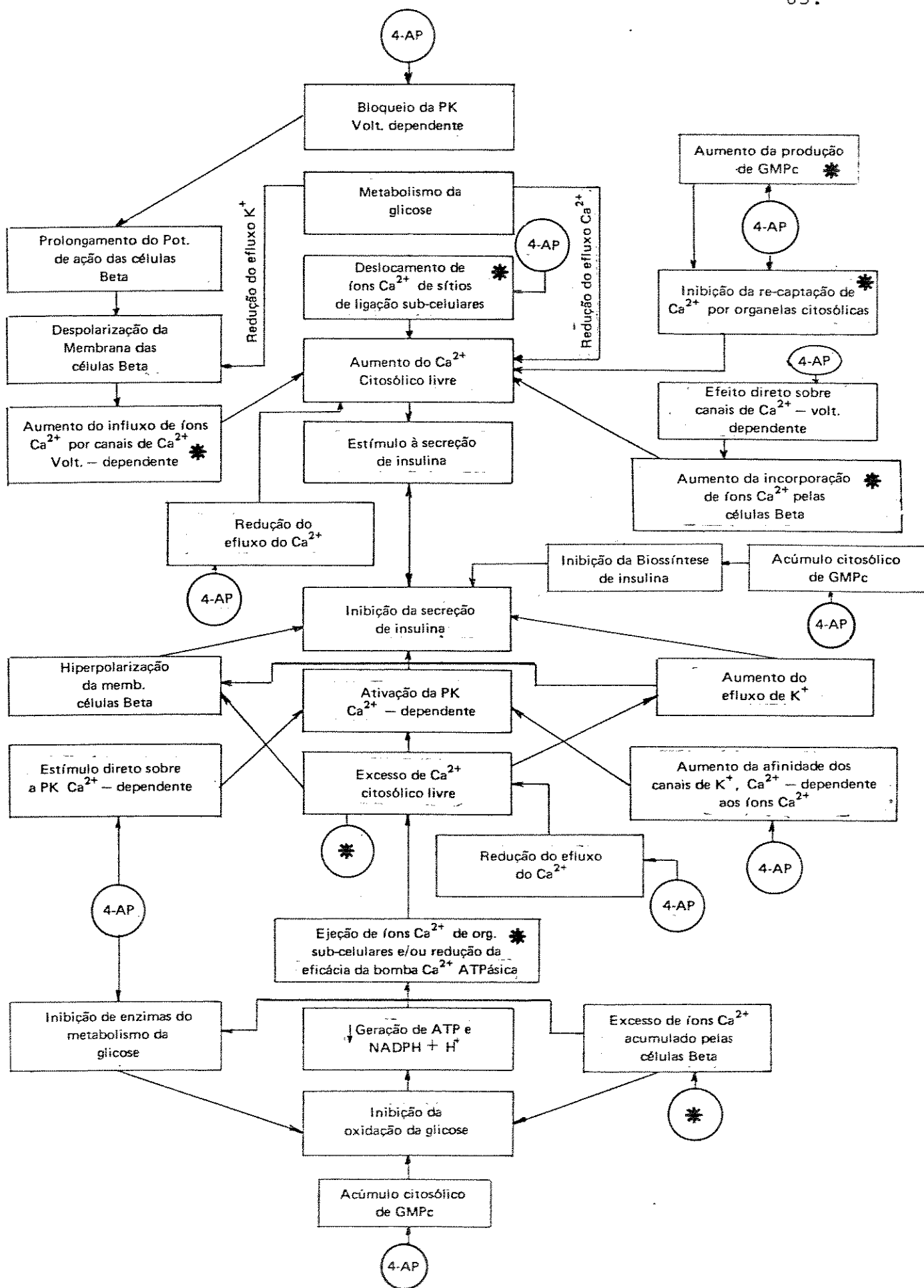
organelas subcelulares, provocado pela forma protonada da 4-AP. Por outro lado, HERMANN e GORMAN (1981), não descartaram a hipótese de a 4-AP, diretamente ativar a  $PK_{Ca}$ , atuando em sítios do canal de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  - sensível. De maneira semelhante, os mesmos autores aventaram a possibilidade da 4-AP aumentar a afinidade de algum componente do canal de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  - sensível, aos íons  $Ca^{2+}$ . O aumento do efluxo do  $^{86}Rb$ , foi uma observação que satisfaz plenamente a conclusão de que a 4-AP inibe a oxidação da glicose. Por outro lado, o acúmulo de  $Ca^{2+}$  citosólico proporcionado pela inibição do metabolismo, foi acrescido pela mobilização subcelular do cátion, conforme proposições mencionadas acima, e sumarizadas na figura IX.

A integração de todos esses eventos, associada à secreção de insulina, está sumarizada na figura IX.

Hipótese que não deve ser descartada é a idéia de que o aumento da incorporação de  $^{45}Ca$ , induzido pela 4-AP tenha sido, pelo menos em parte, provocado pela liberação de acetilcolina nos terminais colinérgicos intra-insulares. De fato, WOLLHEIM et alii (1980) e MATHIAS et alii (1982) apresentaram resultados que reforçam a proposição de que o efeito insulinoatrópico de acetilcolina é mediada por intermédio de uma ativação da permeabilidade da membrana aos íons  $Ca^{2+}$ , por canais voltagem sensíveis. Admitindo-se a hipótese supracitada, poderíamos detectar um efluxo do  $^{86}Rb$  (ativado por  $Ca^{2+}$  citosólico), proporcionalmente menor, quando ilhotas pancreáticas foram perfundidas na presença de 15,0  $\mu M$  de atropina e 10,0 mM de 4-AP (fig. VI - gráfico inferior), comparativamente à magnitude do efluxo observado apenas na presença de 10,0 mM de 4-AP (fig. V - gráfico superior), com 6,0 mM de glicose durante todo período de perfusão, para ambas situações.

Figura IX - Representação esquemática dos possíveis efeitos da 4-AP sobre as células beta e a associação de todos os eventos, integrada à secreção de insulina.

OBS: Os asteriscos em círculos indicam, haver uma influência dos processos assinalados também com as teriscos, sobre os eventos descritos dentro dos re tângulos. Similarmente, a 4-AP contida nos círcu los, indica uma ação da droga sobre os eventos des critos dentro dos retângulos.



Por outro lado, também admitindo-se a hipótese de que a 4-AP estimula a liberação de catecolaminas em terminais adrenérgicos intra-insulares, poderíamos esperar que a adição simultânea de 10,0 mM de 4-AP com 50,0  $\mu$ M de propranolol (fig. VI - gráfico superior) provocasse, igualmente, um efluxo do  $^{86}\text{Rb}$  de magnitude menor, quando comparado ao verificado na presença de 10,0 mM de 4-AP. Esta última especulação baseia-se no fato de que a interação de catecolaminas com receptores alfa adrenérgicos, nas ilhotas pancreáticas, inibem o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  por canais voltagem sensíveis (WOLLHEIM et alii, 1977 e CARPINELLI et alii, 1982).

Em ambas conjecturas, tanto na adição de atropina, como de propranolol, simultaneamente à introdução de 4-AP, ao meio perfusor, o aporte de  $\text{Ca}^{2+}$  ao citoplasma das células beta, em tese, estaria menor. Todavia, esta presunção, provavelmente não se efetivou no presente trabalho, nem se traduziu, sob a forma de uma menor elevação do efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , nos termos comparativos mencionados.

O efeito da 4-AP sobre a dinâmica dos fluxos de  $\text{K}^{+}$ , através da membrana das células beta, encontrará elementos adicionais, mediante um estudo eletrofisiológico.

O aumento da incorporação de  $^{45}\text{Ca}$ , induzido pela 4-AP, em ilhotas isoladas e incubadas, poderia ser explicado com base nos mecanismos propostos por LUNDH, LEANDER E THELESFF (1977), dentre outros. Esses autores evidenciaram que a 4-AP aumenta o influxo  $\text{Ca}^{2+}$ , primariamente, por ativação direta dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , voltagem-sensíveis e/ou, secundariamente à des polarização da membrana provocada pela droga.

Quanto à inibição da oxidação da glicose, produzida

pela 4-AP, restaria investigar se tal efeito é resultante de uma ação direta da droga sobre a via metabólica, e/ou secundária a uma grande quantidade de íons  $\text{Ca}^{2+}$  concentrada pela célula beta. Nesse sentido um grande acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma das células beta, poderia perturbar a atividade enzimática da via oxidativa da glicose, à semelhança de outros tecidos (RASMUSSEN e GOODMAN, 1977).

Uma questão a ser investigada é a destinação metabólica das aminopiridinas nas células beta. Seria ainda prematuro considerar que o esqueleto químico das aminopiridinas possa servir como um falso precursor metabólico da síntese de nucleotídeos piridínicos. Nesse sentido, se as células beta fossem equipadas com um sistema enzimático identificado com esta suposição, poderíamos antever resultados similares àqueles demonstrados "in vitro", por FISHER, VERCELLOTTI e ANDERSON (1973). Esses autores sintetizaram o 3-aminopiridina adenina dinucleotídeo e, adicionalmente, verificaram que a referida droga era capaz de inibir competitivamente, reações catalizadas por enzimas dependentes de NAD (P)-(desidrogenases). Transportando essas observações para as células beta, obteríamos inibição do metabolismo.

Aqui cabe criar uma especulação em torno da secreção de insulina e da inibição da oxidação da glicose, necessitando-se para isso a efetuação de alguns comentários.

Tem sido referido na literatura (KUO, KUO e HODGINS, 1975 e GAGERMAN e HELLMAN, 1977), que a secreção de insulina induzida por acetilcolina e glicose, em ilhotas isoladas, é acompanhada por um aumento dos níveis intra-celulares de guanosina monofosfato cíclico (GMPc). Concordantemente, SEHLIN (1976), demonstrou que o GMPc reduz a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  - depen

dente de ATP, em frações subcelulares de ilhotas pancreáticas. Tal observação é coerente com um aumento da disponibilidade de íons  $\text{Ca}^{2+}$  para o processo secretório. Nesse sentido, LAYCHOCK (1981), trabalhando com o ascorbato e o nitroprussiato de sódio - SNP (substâncias que elevam o teor citosólico de GMPc), verificou que os referidos agentes mimetizam as características da secreção inicial (primeiros 15 minutos de perfusão) de insulina, induzida pela glicose. A magnitude da liberação de insulina guardou proporções lineares com a produção de GMPc pelas ilhotas. Adicionalmente, verificou, para o caso do SNP, uma potencialização da secreção de insulina provocada por 2,8 mM de glicose. É interessante notar que o efeito do SNP, na ausência de glicose, foi desacompanhado de um aumento significativo do teor de AMPc.

Foi no ápice dessas observações que LAYCHOCK (1981), vislumbrou a possibilidade do GMPc atuar como um segundo mensageiro ou um modulador fisiológico da secreção de insulina.

Por outro lado, LIN et alii (1975), demonstrou que elevadas concentrações de GMPc inibem a biossíntese de insulina e o metabolismo da glicose. O próprio LAYCHOCK (1981), demonstrou que o acúmulo de GMPc, proporcionado pelo SNP (1,0 mM), provocou uma depressão da secreção tardia de insulina (a partir do 15º minuto de perfusão), induzida por 17,0 mM de glicose. Abordando este aspecto o autor assinalou que a depressão da segunda fase de secreção de insulina, em ilhotas estimuladas por agentes, que aumentam abruptamente a produção de GMPc, pode representar os efeitos combinados de inibição da biossíntese de insulina e do metabolismo da glicose.

Analogicamente, podemos propor que parte do efeito inibitório sobre a secreção de insulina, provocado pela 4-AP,

seja ocasionado por uma elevada e abrupta produção de GMPC nas ilhotas pancreáticas. A 4-AP tem sido referida como uma droga que aumenta a geração do nucleotídeo em fragmentos isolados de cerebello (AHNERT-HILGER e MABERMANN, 1981).

Ainda neste enfoque, caberia estudar se realmente a 4-AP aumenta o teor intra-insular de GMPC e, em caso positivo, verificar mais apuradamente, a nível eletrofisiológico, a tradução desta proposição, sobre a permeabilidade do  $K^+$ . Em nossos estudos, existem indícios das possibilidades aventadas para uma elevação do GMPC nas ilhotas, relacionada com uma inibição da secreção de insulina induzida pela 4-AP, na presença de 16,7 mM de glicose (fig. IC) e associada a um elevado efluxo de  $^{86}\text{Rb}$  (fig. IV e V). Aqui, podemos admitir que pelo menos em parte, a mobilização intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  propiciada pelo GMPC, contribuiria para um estímulo da secreção. Evidências para esta suposição se originaram da análise da perfusão de ilhotas com 4-AP (10,0 mM) e 16,7 mM de glicose, nos primeiros minutos da dinâmica da secreção de insulina. Mesma suposição poderia ser efetuada para a rápida secreção de insulina verificada na perfusão de ilhotas com 4-AP (10,0 mM) e 6,0 mM de glicose.

A inibição da secreção provocada pela 4-AP, em 16,7 mM de glicose é concordante com os achados de LAYCHOCK (1981), quanto à elevada produção de GMPC, guardando-se uma relação temporal entre os resultados do presente estudo e os obtidos por aquele autor. Todas as hipóteses mencionadas a respeito da mobilização de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , permeabilidade do  $K^+$  e secreção de insulina foram, igualmente sumarizadas na figura IX.

E como poderíamos explicar os efeitos paradoxais da 4-AP, a nível da dinâmica da secreção de insulina? Quanto à

drástica inibição da secreção de insulina, observada quando as ilhotas foram perfundidas na presença de 16.7 mM de glicose, podemos assumir uma posição cômoda. A inibição do metabolismo da glicose, provocado pela 4-AP, comprometeria o aporte energético necessário para a ativação do mecanismo efetor de secreção de insulina. Por outro lado, indícios de um ligeiro aumento da secreção de insulina, foram observados durante os primeiros minutos de exposição à 4-AP, em meio de perfusão com 16,7 mM de glicose. A explicação para tal evento pode residir na hipótese de que, transitoriamente, a 4-AP, na presença de glicose, bloqueia o efluxo do  $K^+$ , que combinado com um aumento do influxo do  $Ca^{2+}$ , proporciona uma deflagração do acoplamento excitação - secreção. Assim, durante este estágio, a secreção de insulina estaria ligeiramente aumentada, em razão da incorporação de  $Ca^{2+}$  provocada pela droga. O efeito estimulatório seria superficial e transiente, em face das ilhotas se apresentarem em pleno processo secretório (em 16,7 mM de glicose), onde a quantidade de insulina liberada já é maximal. Posteriormente, surgiria o efeito inibitório da secreção, ocasionado pela redução do metabolismo da glicose. AHRÉN, LEANDER e LUNDQUIST (1981), demonstraram um efeito inibitório da 4-AP sobre a secreção de insulina, induzida pela glicose, em camundongos intactos. Todavia, este efeito inibitório foi atribuído a uma liberação local e humoral de catecolaminas pelo sistema simpático-adrenal.

Uma posição alternativa, para explicar o ligeiro efeito estimulatório ou a própria ausência de um estímulo da 4-AP, sobre a secreção de insulina, é a hipótese de que em 16,7 mM de glicose, o alto nível de despolarização da membrana, provocaria um deslocamento da molécula, de seus sítios de ligação.

Em razão disso, a molécula de 4-AP seria prontamente internalizada, orientada, pelo campo elétrico transmembrana. Essa hipótese foi fundamentada em suposições elaboradas por GILLESPIE e HUTTER (1975), ULBRICHT e WAGNER (1976), YEH et alii (1976) e PICHON (1981), em diferentes preparações.

Na análise do efluxo do  $^{45}\text{Ca}$ , verificou-se que o ligeiro aumento induzido pela 4-AP, parece se relacionar com a secreção transitória de insulina, obtida no mesmo período de perfusão, na presença de 6,0 mM de glicose. Por outro lado, a redução do efluxo do radioisótopo, provocado pela 4-AP, na presença de 16,7 mM de glicose, pode em parte, se relacionar com a inibição da secreção de insulina. Contudo, a que se deveu, efetivamente a queda do efluxo do  $^{45}\text{Ca}$ ? Não temos elementos para responder concretamente a esta questão, mas poderíamos preliminarmente atribuir tal ocorrência, à depressão do aporte energético necessário, para a extrusão de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Ou seja, a deficiência na produção de ATP, comprometeria a eficácia da hipotética  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase da membrana plasmática das células beta. De outro modo, uma provável redução do gradiente de  $\text{K}^+$ , ocorreria através da membrana, em consequência, a extrusão de íons  $\text{Ca}^{2+}$  pelo contra-transporte  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  se frustraria, diante da inoperância ou insuficiência de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase, conforme concepção de RASMUSSEN e GOODMAN (1977).

Outra questão pertinente se refere ao fato de se ter detectado, simultaneamente à análise do efluxo do  $^{45}\text{Ca}$ , um aumento ligeiro da secreção de insulina, quando as ilhotas foram perfundidas na presença de 16,7 mM de glicose (figuras IC e ID). Nesta condição poder-se-ia esperar uma ligeira elevação do efluxo do  $^{45}\text{Ca}$ , como resposta ao mecanismo secretório. Esses fatos sugerem que a 4-AP deve atuar a nível de membrana,

ativando diretamente os sítios exocitóticos, como propusera BURLEY e JACOBS (1981), para preparação neuromuscular de anfíbio. Neste mesmo plano, poderíamos admitir a proposição de SIMPSON (1978), de que a 4-AP, aumenta a afinidade de componentes do segmento distal, do mecanismo secretório, aos íons  $\text{Ca}^{2+}$ , diminuindo as necessidades do cátion para a liberação de neurotransmissor. Neste caso, fazendo uma analogia às conclusões do autor, poderíamos inferir que as exigências de  $\text{Ca}^{2+}$  para o processo secretório, se tornariam tão diminutas, que uma pequena elevação do efluxo do cátion, seria praticamente imperceptível para o nível de resolução do sistema de contagem.

Com referência ao aumento rápido e transitório da secreção de insulina, induzido por 10,0 mM de 4-AP, na presença de 6,0 mM de glicose, alguns pontos precisam ser analisados.

Os níveis de secreção de insulina, obtidos na presença de 6,0 mM de glicose, são praticamente comparáveis aos detectados na ausência do açúcar, em ilhotas isoladas.

Segundo resultados obtidos por DEVIS, SOMERS e MAILAISSE (1977), na ausência de glicose, a introdução de 10,0 a 12,0 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , provoca um aumento lento e progressivo da secreção de insulina. O período de latência para o alcance do pico secretório, chega a 15 minutos (após a introdução do cátion no meio), a partir do qual, a secreção retoma os níveis basais. Comparativamente, o efeito estimulatório da 4-AP, na presença de 6,0 mM de glicose (figura IA), foi representado por um padrão rápido e transitório, podendo-se inferir algumas hipóteses. O estímulo produzido pela 4-AP seria decorrente de uma rápida incorporação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelas células beta. Por sua vez, o influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , resultaria de um bloqueio da permeabilidade do  $\text{K}^+$  - voltagem dependente, associado com uma

despolarização da membrana. Na verdade, este efeito representaria, transientemente, uma ação potencializadora da droga, mediante a glicose. Conforme observação anterior, o influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  poderia, alternativamente, ser consequência de uma ação direta da 4-AP sobre canais de  $\text{Ca}^{2+}$  - voltagem sensíveis. Ademais, a rápida liberação de insulina, provocada pela 4-AP, poderia resultar, de uma ação sobre os mecanismos distais de exocitose. Dentro deste raciocínio, não se deve excluir a possibilidade, de uma interferência da droga, na mobilização de estoques de insulina, prontamente disponíveis para o processo secretório.

Nesta análise, deve-se ressaltar que um efeito insulinotrópico da 4-AP, foi também demonstrado por AHRÉN, LEANDER e LUNDQUIST (1981), em camundongos adrenalectomizados e quimicamente simpatectomizados. Aqui, os autores atribuíram o efeito estimulatório da 4-AP, a uma ação direta sobre as células beta, de acordo com as proposições de LUNDH, LEANDER e THESLEFF (1977) e LEANDER, ARNER e JOHANSSON (1977), segundo as quais, a droga facilita o influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  às células excitáveis.

No presente estudo, imediatamente após o estímulo transitório, na presença de 6,0 mM de glicose, a 4-AP não alterou o tônus basal de secreção de insulina. Como a liberação espontânea de insulina, depende da integridade do aparato microtúbulo-microfilamentar, é muito provável, que a 4-AP não tenha afetado a organização estrutural, dessa parte do sistema efetor. Contudo, a confirmação desse indício, exigiria uma investigação mais apurada.

A utilização da 4-AP, como um instrumento farmacológico, foi e será, um procedimento valioso para a orientação

do estudo da fisiologia das células beta, principalmente no tocante ao melhor conhecimento das distintas características da permeabilidade do  $K^+$  e  $Ca^{2+}$ .

Finalmente, alguns estudos necessitariam ser realizados, para esclarecer algumas questões geradas neste trabalho.

Uma análise do efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , a intervalos de tempo mais reduzidos, é um detalhe operacional que certamente trará elementos importantes acerca dos efeitos de concentrações menores de 4-AP. Assim, flutuações temporais da dinâmica do efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , poderiam ser detectadas e confrontadas com um estudo eletrofisiológico. Conduta semelhante, poderia ser adotada com respeito ao estudo da oxidação da glicose, por períodos de incubação gradualmente diminuídos.

## V - RESUMO E CONCLUSÕES

A proposição central do presente estudo, foi a análise dos efeitos da 4-AP, sobre a permeabilidade das células beta, ao  $K^+$  e, conseqüentemente, avaliar a secreção de insulina por ilhotas de Langerhans isoladas. Por outro lado, o objetivo terminal, foi uma contribuição preliminar, para um melhor entendimento das múltiplas etapas do mecanismo de secreção de insulina.

A execução da parte experimental, foi primeiramente constituída pela incubação ou perfusão de grupos de ilhotas pancreáticas de rato, submetido a diferentes protocolos. A incubação de ilhotas por períodos de 90 a 120 minutos, prestou-se para a avaliação da incorporação de  $^{45}\text{Ca}$  ou da oxidação da glicose. Com a perfusão de ilhotas durante 70 a 90 minutos, efetuou-se a análise de efluxo fracionário do  $^{86}\text{Rb}$ , e da dinâmica da secreção de insulina e do efluxo do  $^{45}\text{Ca}$ . Os resultados obtidos são resumidos a seguir:

1 - Sob a análise da dinâmica da secreção de insulina, observou-se que, em meio contendo concentrado limiar de glicose (6,0 mM), a taxa secretória média atingiu, respectivamente,  $0,169 \pm 0,008$ ,  $0,245 \pm 0,031$  e  $0,115 \pm 0,009$   $\mu\text{U/ilhota/minuto}$ , antes, durante e após a introdução de 10,0 mM de 4-AP, ao sistema perfusor. O pico estimulatório de secreção foi rápido e passageiro, para a seguir retomar os níveis basais. Todavia, quando as ilhotas foram perfundidas, em meio contendo uma concentração supra-limiar de glicose (16,7 mM), a taxa secretória média atingiu,  $0,864 \pm 0,02$ ,  $0,532 \pm 0,05$  e  $0,185 \pm 0,002$   $\mu\text{U/ilhota/minu}$ to, respectivamente, antes, durante e após a introdução de 10,0

mM de 4-AP. O efeito inibitório da secreção de insulina foi mantido, mesmo após a remoção da droga do meio perfusor. Não obstante a nítida queda da taxa secretória, houve indícios de um ligeiro aumento da secreção, durante os três primeiros minutos em que as ilhotas foram expostas à 4-AP.

2 - A adição de 0,1 ou 1,0 mM de 4-AP ao meio perfusor, na ausência ou na presença de 3,0 mM de glicose, não afetou, significativamente, o efluxo fracionário do  $^{86}\text{Rb}$ . Contudo, na ausência de glicose, aumentando-se a concentração da 4-AP para 10,0 mM, obteve-se uma elevação lenta e progressiva do efluxo do radioisótopo, que persistiu mesmo após a remoção da droga do meio perfusor. Na presença de 3,0 mM de glicose, a adição do 10,0 mM de 4-AP provocou um aumento de alta amplitude do efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ . Por sua vez, na presença de 6,0 e 16,7 mM de glicose, a 4-AP (10,0 mM) elevou o efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , embora para níveis bem inferiores àqueles obtidos com 3,0 mM do açúcar. Resultados similares foram obtidos, quando ilhotas pancreáticas foram perfundidas com 50,0  $\mu\text{M}$  de propranolol ou 15,0  $\mu\text{M}$  de atropina, simultaneamente introduzidos com 10,0 mM de 4-AP, na presença de 6,0 mM de glicose.

Nos protocolos em que se aplicou 10,0 mM de 4-AP, ao meio perfusor, notamos, invariavelmente, que mesmo após a remoção da droga, o efluxo fracionário mantinha-se elevado, em relação à primeira etapa de perfusão.

3 - A oxidação da glicose por ilhotas isoladas e incubadas, foi significativamente inibida pela 4-AP, na presença de 16,7 mM da hexose. Os valores atingidos foram de  $23,28 \pm 1,89$ ;  $18,78 \pm 1,87$  e  $10,75 \pm 0,99$  picomol/120 min/ilhota, respectivamente, na

ausência e na presença de 1,0 e 10,0 mM de 4-AP.

4 - A incorporação de  $^{45}\text{Ca}$  por ilhotas isoladas e incubadas, foi significativamente estimulada por 10,0 mM de 4-AP, atingindo valores de 68; 110 e 115 por cento maiores, respectivamente, na ausência e na presença de 6,0 e 16,7 mM de glicose, em relação ao experimento controle (na ausência de 4-AP).

5 - Quanto à análise do efluxo do  $^{45}\text{Ca}$ , por ilhotas isoladas e perfundidas, observou-se que a adição de 10,0 mM de 4-AP ao meio perfusor, induziu um ligeiro aumento da fração de efluxo do radioisótopo, na presença de 6,0 mM de glicose. Após período de aproximadamente 5 minutos, a tendência declinante do efluxo foi retomada. Por outro lado, na presença de 16,7 mM de glicose, a adição de 10,0 mM de 4-AP, provocou uma queda da fração de efluxo do  $^{45}\text{Ca}$ .

Os resultados obtidos propiciaram a definição das seguintes conclusões:

- A 4-AP (10,0 mM) estimulou transitoriamente a secreção de insulina, na presença de 6,0 mM de glicose, provavelmente por intermédio de uma rápida e significativa incorporação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  pelas células beta. Não obstante ao efeito facilitatório da 4-AP sobre o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , obteve-se indícios de que, adicionalmente, a droga ativa a mobilização intracelular do cátion. Apoiando-se no fato de que a secreção basal de insulina não foi alterada, após o estímulo inicial evocado pela 4-AP, evidenciou-se que provavelmente a droga não afeta o aparato microtúbulo-microfilamentar.

- Por sua vez, a drástica inibição da secreção de insulina, provocada por 10,0 mM de 4-AP, na presença de 16,7 mM

de glicose, certamente decorreu de uma inibição do metabolismo da hexose, associada a uma provável hiperpolarização da membrana das células beta.

- Quanto à análise do efluxo do  $^{86}\text{Rb}$ , não se conseguiu demonstrar nitidamente, uma inibição da permeabilidade do  $\text{K}^+$  - voltagem dependente. Todavia, o efeito estimulatório da secreção de insulina produzido pela 4-AP (10,0 mM) foi um indício representativo da manifestação daquele evento.

Conquanto se admita que a 4-AP tenha debilmente inibido a permeabilidade do  $\text{K}^+$  - voltagem dependente, ficou patente que esta foi totalmente mascarada pela ativação da permeabilidade do  $\text{K}^+$ , sensível ao acúmulo citosólico de íons  $\text{Ca}^{2+}$ .

- A ativação da permeabilidade do  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  - sensível, provavelmente decorreu, do extraordinário acúmulo citosólico do cátion, evocado pela 4-AP.

Por outro lado, os resultados obtidos, são compatíveis com a inferência de que a 4-AP aumenta a eficácia do transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  através da membrana, ativa a mobilização intracelular e potencializa os efeitos subcelulares do cátion. Contudo, a hiperpolarização da membrana, provavelmente resultante, intensificada pela inibição do metabolismo da glicose, culminam por provocar uma drástica queda da secreção de insulina, quando as ilhotas são estimuladas a um nível secretório maximal.

## VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTON, S.; van WEERDEN, T.; WESTRA, P. and BROEKERT, A. Effects of 4-aminopyridine in Eaton Lambert syndrome. Br. J. Anaesth., 50: 383-385, 1978
- AHNERT-HILGER, G. and HABERMANN, E. Increase of cGMP and accumulation of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  evoked by drugs acting on sodium or potassium channels. Eur. J. Pharmacol., 70: 301-310, 1981.
- AHRÉN, B.; LEANDER, S. and LUNDQUIST, I. Effects of 4-aminopyridine on insulin secretion and plasma glucose levels in intact and adrenalectomized - chemically sympathectomized mice. Eur. J. Pharmacol., 74: 221-226, 1981.
- ATWATER, I. Control mechanisms for glucose induced changes in the membrane potential of mouse pancreatic  $\beta$ -cell. Ciênc. Biol. (Portugal), 5: 299-314, 1980.
- \_\_\_\_\_ and BEIGELMAN, P. M. Dynamic characteristic of electrical activity in pancreatic beta cells. I. Effects of calcium and magnesium removal. J. Physiol. (Paris), 72: 769-786, 1976.
- \_\_\_\_\_; RIBALET, B. and ROJAS, E. Cyclic changes in potential and resistance of the  $\beta$ -cell membrane induced by glucose in islets of Langerhans from mouse. J. Physiol., 278: 117-139, 1978.
- \_\_\_\_\_; DAWSON, C. M.; RIBALET, B. and ROJAS, E. Potas-

sium permeability activated by intracellular calcium ion concentration in the pancreatic  $\beta$ -cell. J. Physiol., 288: 575-588, 1979.

ATWATER, I.; RIBALET, B. and ROJAS, E. Mouse pancreatic  $\beta$ -cells: Tetraethylammonium blockage of the potassium permeability increase induced by depolarization. J. Physiol., 288: 561-574, 1979.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_, SCOTT, A.; EDDLESTONE G. and ROJAS, E. The nature of the oscillatory behavior in electrical activity from pancreatic  $\beta$ -cell. Horm. Metab. Res. 10:100-109, 1980.

\_\_\_\_\_; GONÇALVES, A. A. and ROJAS, E. Electrophysiological measurement of an oscillating potassium permeability during the glucose-stimulated burst activity in mouse pancreatic  $\beta$ -cell. Biomed. Res. 3: 645-648, 1982.

BAETENS, D. F.; MALAISSE-LAGAE, F.; PERRELET, A. and ORCI, L. Endocrine pancreas: Three dimensional reconstruction shows two types of islets of Langerhans. Science, 206:1323, 1979.

BENNETT, M. V. and GOODENOUGH, D. H. Gap junctions, electronic coupling and intercellular communication. Neurosci. Program. Bull., 16: 377, 1978.

BERGER, W.; DAHL, G. and MEISSNER, H. P. Structural and functional alterations in fused membranes of secretory granules during exocytosis in pancreatic islet cells of the mouse. Cytobiologie, 12: 119-139, 1975.

BLOOM, G. D.; HELLMAN, B.; SEHLIN, J. and TALJEDAL, I. B. Glucose-stimulated and  $\text{La}^{3+}$ -nondisplaceable  $\text{Ca}^{++}$  pool in pancreatic islets. *An. J. Physiol.*, 232:E114-E118, 1977.

BOSCHERO, A. C. Secreção de insulina: Efeito das alterações na permeabilidade das células beta ao  $\text{K}^+$ . [Apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Livre Docente em Fisiologia e Biofísica, 1979].

\_\_\_\_\_; KAWAZU, S.; DUNCAN, G. and MALAISSE, W. J. Effect of glucose on  $\text{K}^+$  handling by pancreatic islets. *FEBS Lett.*, 83: 151-154, 1977.

\_\_\_\_\_ and MALAISSE, W. J. The stimulus-secretion coupling of glucose induced insulin release. XXIX. The regulation of  $^{86}\text{Rb}$  efflux from perifused islets. *Am J. Physiol.*, 236: E139-E146, 1979.

\_\_\_\_\_; DELATTRE, E. and SANTOS, M. L. Isolamento de ilhotas de Langerhans de rato. (Apresentado ao 12º Congresso Brasileiro de Fisiologia, Ribeirão Preto, 1980).

\_\_\_\_\_; GONÇALVES, A. A. and LANGONE, F. Tiopental induz alterações da permeabilidade ao  $\text{K}^+$  nas células beta: Efeitos sobre o potencial e a resistência da membrana. *Anais do VII Congresso Anual da Soc. Bras. Biofísica*, p. 77, 1982.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; DAWSON, C. M.; ATWATER, I. J. and RO

JAS, E. Valinomycin inhibition of the electrical activity of mouse pancreatic.  $\beta$ -cells. Brazilian J. Med. Biol. Res., 16:153-160, 1983.

BOWMAN, W. C.; HARVEY, A. L. and MARSHALL, I. G. The actions of aminopyridines on avian muscle. Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol., 297:99-103, 1977.

\_\_\_\_\_ ; KHAN, H. H. and SAVAGE, A. O. Some antagonists of dantrolene sodium on the isolated diaphragm muscle of the rat. J. Pharm. Pharmac., 29: 616-625, 1977.

BRISSON, G. R.; MALAISSE-LAGAE, F. and MALAISSE, W. J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. VII. A proposed site of action for adenosine-3',5'-cycle monophosphate. J. Clin. Invest., 51: 232-241, 1972.

BURLEY, E. S. and JACOBS, R. S. The effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmission in frog sartorius muscle. Fed. Proc., 36: 976, 1977.

\_\_\_\_\_ and JACOBS, R. S. Effects of 4-aminopyridine on nerve terminal action potentials. J. Pharmacol. Exp. Ther., 219: 268-273, 1981.

CARPINELLI, A. R. and MALAISSE, W. J. Regulation of  $^{86}\text{Rb}^+$  outflow from pancreatic islets. I. Reciprocal changes in the response to glucose, tetraethylammonium and quinine. Mol. Cell. Endocrinology, 17: 103-110, 1980.

\_\_\_\_\_ ; MATHIAS, P. C.; SANNOMYA, P.; PUPO, A. A.; ROCHA,

M. S. and SALVATO, E. M. Alterações no fluxo de  $^{86}\text{Rb}$  e  $^{45}\text{Ca}$  na inibição da secreção de insulina, provocada pela adrenalina. Anais do VII Congresso Anual da Soc. Bras. Biofísica, p. 84, 1982.

CHANELET, J. and LEMEIGNAN, M. Effet d'une application microregionale de 4-aminopyridine au niveau de la moelle lombaire du chat. C. R. Séances Soc. Biol., 163: 365-372, 1969.

CREUTZFELDT, W. The incretion concept today. Diabetologia, 16: 75-85, 1979.

\_\_\_\_\_ ; FEURLE, G. and KETTERER, H. Effect of gastrointestinal hormones on insulin and glucagon secretion. N. Engl. J. Med., 282: 1139-1141, 1970.

\_\_\_\_\_ ; EBERT, R.; ARNOLD, R.; FRERICH, H. and BROWN, J. C. Gastric inhibitory polypeptide (GIP), gastrin and insulin: response to test meal in coeliac disease and after duodeno-pancreatectomy. Diabetologia, 12: 279-286, 1976.

\_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_ ; WILLMS, B.; FRERICH, H. and BROWN, J. C. Gastric inhibitory polypeptide (GIP) and insulin in obesity: increased response to stimulation and defective feedback control of serum levels. Diabetologia, 14: 15-24, 1978.

CURRY, D. L.; BENNETT, L. L. and GRODSKY, G. M. Requirement for calcium ion in insulin secretion by the perfused rat pancreas. Am. J. Physiol., 214: 174-178, 1968.

DANIEL, E. E. Peptidergic nervs in the gut. Gastroenterology, 75: 142-144, 1978.

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

\_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. Glucose-induced electrical activity in pancreatic islets cells. J. Physiol., 210: 255-264, 1970a.

\_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. Electrical activity in pancreatic islets cells: Effects of ions. J. Physiol., 210: 265-275, 1970b.

DELATTRE, E. Efeitos de antibióticos aminoglicosídicos da família da gentamicina sobre a secreção de insulina. (Apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do grau de Mestre em Biologia, na área de Fisiologia e Biofísica, 1981).

DEVIS, G.; SOMERS, G. and MALAISSE, W. J. Dynamics of calcium-induced insulin release. Diabetologia, 13:531-536, 1977.

DIAS, O.; REIS, L. C.; DELATTRE, E.; GONÇALVES, A. A. and BOSCHERO, A. C.  $K^+$ -Permeability and insulin secretion: Effect of thiopental. Brazilian J. Med. Biol. Res., 15:303, 1982.

DONATSCH, P.; LOWE, D. A.; RICHARDSON, B. P. and TAYLOR, P. The functional significance of sodium channels in pancreatic beta-cell membranes. J. Physiol., 267: 357-376, 1977.

ENOMOTO, K. I. and MAENO, T. Presynaptic effects of 4-aminopyridine and streptomycin on the neuromuscular junction. Eur. J. Pharmacol., 76: 1-8, 1981.

FISCHER, T. L.; VERCELLOTTI, S. V. and ANDERSON, B. M. Interactions of 3-aminopyridine adenine dinucleotide with dehydrogenases. J. Biol. Chem., 248: 4293-4299, 1973.

FUJIMOTO, W. Y. and ENSINK, J. W. Somatostatin inhibition of insulin and glucagon secretion in rat islet culture: Reverse by ionophore A23187. Endocrinology, 98: 259-262, 1976.

GAGERMAN, E. and HELLMAN, B. Islet contents of cyclic 3',5'-guanosine monophosphate under condition which affect the cycle 3',5'-adenosine monophosphate. Acta Endocrinol. (Copenh), 86: 344, 1977.

GAGLIARDINO, J. J. and MARTIN, J. M. Studies on the mechanism of insulin release. Metabolism, 15: 1068-1075, 1966.

\_\_\_\_\_ ; HARRISON, D. E.; CHRISTIE, M. R.; GAGLIARDINO, E. E. and ASHCROFT, J. H. Evidence for calmodulin in stimulus-secretion coupling in the pancreatic  $\beta$ -cell. Biochem. J., 192: 919-927, 1980.

GALINDO, J. and RUDOMIN, P. Facilitation of synaptic activity in the frog spinal cord produced by 4-aminopyridine. Neuroscience Lett., 10: 299-304, 1978.

GERICH, J. E.; CHARLES, M. A. and GRODSKY, G. M. Regulation

of pancreatic insulin and glucagon secretion. Ann. Rev. Physiol., 38: 353-388, 1976.

GILLESPIE, J. I. and HUTTER, O. F. The actions of 4-aminopyridine on the delayed potassium current in skeletal muscle fibres. J. Physiol. (Lond.), 252: 70P-71P, 1975.

GLOVER, W. E. Potentiation of vasoconstrictor responses by 3-and 4-aminopyridine. Br. J. Pharmacol., 63: 577-585, 1978.

GOLENHOFEN, K. and MANDREK, K. Slow automatic activity in squid axons induced by 4-aminopyridine. J. Physiol., 284: 69P-70P, 1978.

GONÇALVES, A. A.; ROJAS, E.; ATWATER, I. and BANGHAM, A. Effect of pentobarbital on the electrical activity and input membrane resistance of mouse islet  $\beta$ -cells. Brazilian. J. Med. Biol. Res., 15: 331, 1982.

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

HANKS, J. H. and WALLACE, R. E. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. Proc. Soc. Exp. Biol., 71: 196-200, 1949.

HARVEY, A. L. and MARSHALL, I. G. The actions of three diaminopyridines on the chick biventer cervicis muscle. Eur. J. Pharmacol., 44: 303-309, 1977a.

HARVEY, A. L. and MARSHALL, I. G. The facilitatory actions of aminopyridines and tetraethylammonium on neuromuscular transmission and muscle contractility in avian muscle. Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol., 299: 53-60, 1977b.

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

HELLMAN, B. Modifying actions of calcium ionophores on insulin release. Biochim. Biophys. Acta, 399: 157-169, 1975.

\_\_\_\_\_. Calcium and pancreatic  $\beta$ -cell function. I. Stimulatory effects of pentobarbital on insulin release. Biochim. Biophys. Acta, 497: 766-774, 1977.

HENQUIN, J. C. Tetraethylammonium potentiation of insulin release and inhibition of rubidium efflux in pancreatic islets. Biochem. Biophys. Res. Comm., 77: 551-556, 1977.

\_\_\_\_\_. D-Glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islet cells. Nature, 271: 271-273, 1978a.

\_\_\_\_\_. Relative importance of extracellular calcium for the two phases of glucose-stimulated insulin release. Studies with theophylline. Endocrinology, 102: 723-729, 1978b.

\_\_\_\_\_. Opposite effects of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and glucose on  $\text{K}^{+}$  permeability of pancreatic islet cells. Nature, 280: 66-68, 1979.

\_\_\_\_\_ ; MEISSNER, H. P. and PREISSLER, M. 9-Aminoacridi

ne and tetraethylammonium-induced reduction of the potassium permeability in pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 587: 579-592, 1979.

HENQUIN, J. C. and MEISSNER, H. P. The electrogenic sodium-potassium pump of mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Physiol.*, 332: 529-552, 1982.

HERBERT, V.; LAU, K. S.; GOTTLIEB, C. W. and BLEICHER, S. J. Coated charcoal immunoassay of insulin. *J. Clin. Endocrinol.*, 25: 1375-1384, 1965.

HERCHUELZ, A.; LEBRUN, P. and MALAISSE, W. J. Calcium fluxes in the process of glucose-induced insulin release. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 246: 173-174, 1980.

\_\_\_\_\_ and MALAISSE, W. J. Regulation of calcium fluxes in rat pancreatic islets: Two calcium movements dissociated response to glucose. *Am. J. Physiol.*, 238: E87-E95, 1980a.

\_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. Regulation of calcium fluxes in rat pancreatic islets: Dissimilar effects of glucose and of sodium ion accumulation. *J. Physiol.*, 302: 263-280, 1980b.

\_\_\_\_\_; THONNART, N.; SENER, A. and MALAISSE, W. J. Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: The role of membrane depolarization. *Endocrinology*, 107: 491-497, 1980a.

- HERCHUELZ, A.; THONNART, N.; CARPINELLI, A.; SENER, A. and MAILAISSE, W. J. Regulation of calcium fluxes in rat pancreatic islets: The role of  $K^+$  conductance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 215: 213-220, 1980b.
- HERMAN, L.; SATO, T. and HALES, C. N. The electron microscopic localization of cations to pancreatic islet of Langerhans and their possible role in insulin secretion. *J. Ultrastructure Res.*, 42: 298-311, 1973.
- HERMANN, A. and GORMAN, A. L. F. Different action of TEA and 4-AP on the Ca-dependent  $K^+$  current of molluscan pacemaker neurons. *Pfluegers Arch.*, 377: R-41, 1978.
- \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. Effects of 4-aminopyridine on potassium currents in a molluscan neuron. *J. Gen. Physiol.*, 78: 63-86, 1981.
- HORN, A. S.; LAMBERT, J. J. and MARSHALL, I. G. A comparison of the facilitatory actions of 4-aminopyridine methiodide and 4-aminopyridine on neuromuscular transmission. *Br. J. Pharmacol.*, 65: 53-62, 1979.
- HÖSLI, L.; ANDRÉS, P. F. and HÖSLI, E. Effects of 4-aminopyridine and tetraethylammonium on the depolarization by GABA of cultured satellite glial cells. *Neurosc. Lett.*, 11: 193-196, 1979.
- HOWELL, S. L. Intracellular localization of calcium in pancreatic beta cells. 569<sup>th</sup> Meeting (Sussex), 5: 875-879, 1977.

HOWELL, S. L. and TYHURST, M. <sup>45</sup>Calcium in islets of Langerhans, a study by electron-microscopic autorradiography. J. Cell. Sci., 21: 415-422, 1976a.

\_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. Barium accumulation in rat pancreatic  $\beta$ -cells. J. Cell. Sci., 22: 455-462, 1976b.

\_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. Microtubules, microfilaments and insulin secretion. Diabetologia, 22: 301-308, 1982.

HUE, B.; PELHATE, M. and CHANELET, J. Effets de la 4-aminopyridine (4-AP) sur l'activité de la fibre nerveuse géante isolée d'insecte (*Periplaneta americana*). J. Physiol. (Paris), 67: 346A, 1973.

\_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_ ; CALLEC, J. J. et CHANELET, J. Modifications par la 4-aminopyridine de l'activité synaptique au niveau du dernier ganglion abdominal de la Blatte (*Periplaneta americana*). C. R. Soc. Biol. (Paris), 169: 876-883, 1975.

\_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_ ; et \_\_\_\_\_. Synaptic transmission in the sixth ganglion of the cockroach: Action of the 4-aminopyridine. J. Exp. Biol., 65: 517-527, 1976.

ILLES, P. and THESLEFF, S. 4-Aminopyridine and evoked transmitter release from motor nerve endings. Br. J. Pharmacol., 64: 623-629, 1978.

ISHIBASHI, F.; SATO, T.; ONARI, K.; TSUBOTA, M. and KAWATE, K.

Close interrelationships among glucose oxidation, glucose-induced  $^{45}\text{Ca}$  uptake and insulin release of presumed pancreatic  $\beta$ -cell mass. Horm. Metab. Res., 12: 89-94, 1980.

JACOBS, R. S. and BURLEY, E. S. Nerve terminal facilitatory action of 4-aminopyridine: An analysis of the rising phase of the endplate potential. Neuropharmacology, 17: 439-444, 1978.

JANKOWSKA, E.; LINDBERG, A.; RUDOMIN, P. and SYKOVA, E. Effects of 4-aminopyridine on transmission in excitatory and inhibitory synapses in the spinal cord. Brain Res., 136: 387-392, 1977.

JOHNS, A.; GOLKO, D. S.; LAUZON, P. A. and PATON, D. M. The potentiating effects of 4-aminopyridine on adrenergic transmission in the rabbit vas deferens. Eur. J. Pharmacol., 38: 71-78, 1976.

KATAOKA, K.; YAMAMOTO, M.; YAMAMOTO, T. and OCHI, J. Inter<sup>u</sup>cellular canalicular system and intercel<sup>u</sup>llar junctions in the pancreatic islet of the Mongolian gerbil (Meriones unguiculatus). Biomed. Res., 3: 235-238, 1982.

KENYON, J. L. and GIBBONS, W. R. 4-Aminopyridine and the ear<sup>u</sup>ly outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. J. Gen. Physiol., 73: 139-157, 1979.

KHAN, A. R. and EDMAN, K. A. P. Effects of 4-aminopyridine on the excitation-contraction coupling in frog and rat skeletal muscle. Acta Physiol. Scand., 105: 443-452, 1979.

KIKUCHI, M.; WOLLHEIM, C. B.; SIEGEL, E. G.; RENOLD, A. E. and SHARP, G. W. G. Biphasic insulin release in rat islets of Langerhans and the role of intracellular  $\text{Ca}^{++}$  stores. Endocrinology, 105: 1013-1019, 1979.

KIRPEKAR, M.; KIRPEKAR, S. M. and PRAT, J. C. Effect of 4-aminopyridine on release of noradrenaline from the perfused cat spleen by nerve stimulation. J. Physiol., 272:517-528, 1977.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. Reversal of guanethidine blockade of sympathetic nerve terminals by tetraethylammonium and 4-aminopyridine. Br. J. Pharmacol., 62:75-78, 1978.

KLEE, M. R. TEA and 4-AP: Blockage VS. voltage shift of the calcium dependent potassium current in Aplysia S-neurones. Pfluegers. Arch., 377: R-41, 1978a.

\_\_\_\_\_. Tetraethylammonium and 4-aminopyridine distinguish between two types of Aplysia neurones. J. Physiol. (Lond), 284-125P, 1978b.

KOCSIS, J. D.; MALENKA, R. C. and WAXMAN, S. G. Effects of 4-aminopyridine on the frequency following properties of the parallel fibers of the cerebellar cortex. Brain. Res., 195: 511-516, 1980.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. Enhanced parallel fiber frequency-following after reduction of postsynaptic activity. Brain. Res., 207: 321-331, 1981.

- KOHEN, E.; KOHEN, C.; THORELL, B.; MINTZ, D. H. and RABINOVITCH, A. Intracellular communication in pancreatic monolayer cultures: A microfluometric study. *Science*, 204: 862, 1979.
- KRAUSZ, Y.; WOLLHEIM, C. B.; SIEGEL, E. and SHARP, G. W. G. Possible role for calmodulin in insulin release. Studies with trifluoperazine in rat pancreatic islets. *J. Clin. Invest.*, 66: 603-607, 1980.
- KUO, J. F.; KUO, W. N. and HODGINS, D. S. Regulation of cyclic nucleotide systems in pancreatic islets of Langerhans: implication in insulin secretion. In: Weiss B (ed) *cyclic nucleotides in disease*: University Park, Baltimore, p. 211, 1975.
- LACY, P. E. and KOSTIANOVSKY, M. Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, 16: 35-39, 1967.
- \_\_\_\_\_ and MALAISSE, W. J. Microtubules and beta cell secretion. *Recent Progr. Horm. Res.*, 29: 199p, 1973.
- LAMBERT, A. E.; JUNOD, A.; STAUFFACHER, W.; JEANRENAUD, B. and RENOLD, A. E. Organ culture of fetal rat pancreas. I. Insulin release induced by caffeine and by sugars and some derivatives. *Biochim. Biophys. Acta*, 184: 529-539, 1969.
- LARSSON, L. I.; FAHRENKRUG, J.; HOLST, J. J. and SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL, O. D. Innervation of the pancreas by vasoac

tive intestinal polypeptide (VIP) immunoreactive nerves. *Life Sci.*, 22: 773-780, 1978.

LAYCHOCK, S. G. Evidence for guanosine 3',5'-monophosphate as a putative mediator of insulin secretion from isolated rat islets. *Endocrinology*, 108: 1197-1205, 1981.

LEANDER, S.; ARNER, A. and JOHANSSON, B. Effects of 4-aminopyridine on mechanical activity and noradrenaline release in the rat portal vein "in vitro". *Eur. J. Pharmacol.*, 46: 351-361, 1977.

\_\_\_\_\_ and THESLEFF. On the mode of action of botulinum toxin. *Acta Physiol. Scand.*, 108: 195-196, 1980.

LEBRUN, P.; MALAISSE, W. J. and HERCHUELZ, A. Evidence for two distinct modalities of  $\text{Ca}^{2+}$  influx into pancreatic  $\beta$ -cell. *Am. J. Physiol.*, 242: E59-E66, 1982.

LEMEIGNAN, M. Abord pharmacologique de l'étude du mécanisme de l'action convulsivante de l' amino-4 pyridine. *Thérapie* (Paris), 927-940, 1971.

\_\_\_\_\_. Analysis of the actions of 4-aminopyridine on the cat lumbar spinal cord. I-Modification of the afferent volley, the monosynaptic discharge amplitude and the polysynaptic evoked responses. *Neuropharmacology*, 11: 551-558, 1972.

\_\_\_\_\_. Analysis of the effects of 4-aminopyridine on the lumbar spinal cord of the cat. II-Modifications of certain

spinal inhibitory phenomena, post-tetanic potentiation and dorsal root potentials. *Neuropharmacology*, 12: 641-651, 1973.

LEMEIGNAN, M. et LECHAT, P. Sur l'action anticurare des aminopyridines. *C. R. Acad. Sci. (Paris), Série D*, 264: 169-172, 1967.

\_\_\_\_\_ ; CHANELET, J. and SAADÉ, N. E. Étude de l'action d'un convulsivant special (la 4-aminopyridine) sur les nerfs de vertébrés. *C. R. Séances Soc. Biol. France*, 163:356-365, 1969.

\_\_\_\_\_ ; AUCLAIR, M. C.; RODALLEC, A. et LECHAT, P. Analyse eletrophysiologique de effets de l' amino-4 pyridine sur le lambeau ventriculaire isolé de coeur de cobaye. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 216: 165-176, 1975.

LIN, B. J.; HENDERSON, M. J.; NIKI, H.; NIKI, A. and HAIST, R. E. Effects of acetylcholine and cGMP on insulin biosynthesis. *Diabetes*, 24: 403, 1975.

LLINÁS, R.; WALTON, K. and BOHR, V. Synaptic transmission in squid grant synapse after potassium conductance blockage with external 3-and 4-aminopyridine. *Biophys. J.*; 16: 83-86, 1976.

LUNDH, H. Effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmission. *Brain. Res.*, 153: 307-318, 1978.

\_\_\_\_\_. Effects of 4-aminopyridine on statistical para-

meters of transmitter release at the neuromuscular junction. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 44: 343-346, 1979.

LUNDH, H.; LEANDER, S. and THESLEFF, S. Antagonism of the paralysis produced by botulinum toxin in the rat: The effects of tetraethylammonium, guanidine and 4-aminopyridine. *J. Neurol. Sci.*, 32: 29-43- 1977.

\_\_\_\_\_; NILSSON, O. and ROSÉN, I. 4-Aminopyridine - a new drug tested in the treatment of Eaton - Lambert syndrome. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.*, 40: 1109-1112, 1977.

\_\_\_\_\_ and THESLEFF, S. The mode of action of 3-aminopyridine and guanidine on transmitter release from motor nerve terminals. *Eur. J. Pharmacol.*, 42: 411-412, 1977.

\_\_\_\_\_; NILSSON, O. and ROSÉN, I. Effects of 4-aminopyridine in myasthenia gravis. *J. Neurol. Psych.*, 42: 171-175, 1979.

MALAISSÉ, W. J. Hormonal and environmental modification of islets activity. In: *Handbook of Physiology and Endocrinology*. Washington, D. C. Am. J. Physiol. Soc., I: 237-260, 1972.

\_\_\_\_\_. Role of cations. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Ed. BORN, G. V. R.; EICHLER, O.; FARAH, A.; HERKEN, H. and WELCH, A. D. Vol. XXXII/2 Springer - Verlag, Berlin, 146-155, 1975.

\_\_\_\_\_; MALAISSÉ-LAGAE, F. and MAYHEW, D. A possible ro-

le for adenylcyclase system in insulin secretion. J. Clin. Invest., 46: 1725-1734, 1967.

MALAISSSE, W. J.; BRISSON, G. and MALAISSSE-LAGAE, F. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. I. Interaction of epinephrine and alkaline earth cations. J. Lab. Clin. Med., 76: 895-902, 1970.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ and BAIRD, L. E. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. X. Effect of glucose on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  efflux from perifused islets. Am. J. Physiol., 224: E389-E394, 1973.

\_\_\_\_\_ and PIPELEERS, D. G. The role of cations on insulin synthesis and release. In: Congress of the International Diabetes Federation, 8., Brussels, Proceedings. Amsterdam, Excerpta Medica, p. 95-103 (Series 312-Diabetes), 1973.

\_\_\_\_\_; SENER, A. and MAHY, M. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XVIII. Sorbitol metabolism in isolated islet. Eur. J. Biochem., 47: 365-370, 1974.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; KOSER, M. and HERCHUELZ, A. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Metabolism of  $\alpha$ - and  $\beta$ -D-glucose in isolated islets. J. Biol. Chem., 251: 5936-5943, 1976a.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. Identification of the  $\alpha$ -stereospecific glucosensor in the pancreatic  $\beta$ -cell. FEBS Lett., 65: 131-134, 1976b.

MALAISSSE, W. J.; SENER, A.; LEVY, J. and HERCHUELZ, A. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXII. Qualitative and quantitative aspects of glycolysis in isolated islets. *Acta Diabet. Lat.*, 13: 202-215, 1976c.

\_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_ ; HERCHUELZ, A.; HUTTON, J. C.; DEVIS, G.; SOMERS, G.; BLONDEL, B.; MALAISSSE-LAGAE, F. and ORCI, L. Sequential events in the process of glucose-induced insulin release. In: CONGRESS of the INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 9. New Delhi, Proceedings. Amsterdam, *Excerpta Medica*, p. 95-102 (Series 413. Diabetes), 1976d.

\_\_\_\_\_ ; BOSCHERO, A. C.; KAWAZU, S. and HUTTON, J. C. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXVII. Effect of glucose on  $K^+$  fluxes in isolated islets. *Pflügers Arch.*, 373: 237-242, 1978a.

\_\_\_\_\_ ; HERCHUELZ, A.; DEVIS, G.; SOMERS, G.; BOSCHERO, A. C.; HUTTON, J. C.; KAWAZU, S.; SENER, A.; ATWATER, I. J.; DUNCAN, G.; RIBALET, B. and ROJAS, E. Regulation of calcium fluxes and their regulatory roles in pancreatic islets. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 307-562-582, 1978b.

\_\_\_\_\_ ; HUTTON, J. C.; KAWAZU, S. and SENER, A. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Metabolic effects of menadione in isolated islets. *Eur. J. Biochem.*, 87: 121-130, 1978c.

\_\_\_\_\_ ; SENER, A.; BOSCHERO, A. C.; KAWAZU, S.; DEVIS,

G. and SOMERS, G. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Cationic and secretory effects of menadione in the endocrine pancreas. Eur. J. Biochem., 87: 111-120, 1978d.

MALAISSSE, W. J.; SENER, A.; HERCHUELZ, A.; VALVERDE, I.; HUTTON, J. C. and MEYER, V. L. The interplay between metabolic and cationic events in islets cells. Coupling factors and feed-back mechanisms. In: Biochemistry and Biophysics of the pancreatic  $\beta$ -cell. European Workshop Brussels, p. 61-66, 1979a.

\_\_\_\_\_; HUTTON, J. C.; KAWAZU, S.; HERCHUELZ, A.; VALVERDE, I. and SENER, A. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXXV. The links between metabolic and cationic events. Diabetologia, 16: 331-341, 1979b.

\_\_\_\_\_ and ORCI, L. The role of the cytoskeleton in pancreatic  $\beta$ -cell function. Meth. Ach. Exp. Pathol., 9: 112-136, 1979.

MALAISSSE-LAGAE, F. and MALAISSSE, W. J. The stimulus-secretion of glucose-induced insulin release. III. Uptake of  $^{45}\text{Ca}$  by isolated islets of Langerhans. Endocrinology, 88: 72-88, 1971.

MARSHALL, I. G.; LAMBERT, J. J. and DURANT, N. N. Inhibition of aminopyridine-induced contractile activity in skeletal muscle by magnesium. Eur. J. Pharmacol., 54: 9-14, 1979.

MARTÍNEZ-AGUIRRE, É.; WIKINSKI, J. A.; BELLO, A.; IZQUIERDO, J.; GARCIA, A. and VELARDE, H. Effect of 4-aminopyridine on cardiovascular functions in the dog. *Canad. Anaesth. Soc. J.*, 28: 114-120, 1981.

MATSCHINSKY, F. M.; ELLERMAN, J. E.; KRZANOWSKI, J.; KOTLER-BRAJTBURG, J.; LANDGRAF, R. and FERTEL, R. The dual function of glucose in islets of Langerhans. *J. Biol. Chem.*, 246: 1007-1011, 1971.

MATTHEWS, E. K. and SAKAMOTO, Y. Pancreatic islet-cell. Electrogenic and electrodiffusional control of membrane potential. *J. Physiol.*, 246: 439-457, 1975.

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

\_\_\_\_\_ and SCHMELZ, H. Membrane potential of beta-cells in pancreatic islets. *Pflügers Arch.*, 351: 195-206, 1974.

\_\_\_\_\_ and ATWATER, I. The kinetics of electrical activity of beta cells in response to a "square wave" stimulation with glucose or glibenclamide. *Horm. Metab. Res.*, 8: 11-16, 1976.

MEVES, H. and PICHON, Y. Effects of 4-aminopyridine on the potassium current in internally perfused giant axons of the squid. *J. Physiol.*, 1975.

\_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. The effect of internal and external 4-aminopyridine on the potassium currents in intracel-

5686/7B

lularly perfused squid giant axons. J. Physiol., 268: 511-532, 1977.

MILNER, R. D. G. and HALES, C. N. The stimulation by potassium of insulin secretion from rabbit pancreas "in vitro". Biochem. J., 105: 28p, 1967.

MOLGÓ, J.; LEMEIGNAN, M. et LECHAT, M. P. Modifications de la libération du transmetteur à la jonction neuromusculaire de grenouille sous l'action de l' amino-4-pyridine. C. R. Acad. Sci. (Paris), Série D, 281: 1637-1639. 1975.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ et \_\_\_\_\_. Effects of 4-aminopyridine at the frog neuromuscular junction. J. Pharmacol. Exp. Ther., 203: 663, 1977.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ et \_\_\_\_\_. Analysis of the action of 4-aminopyridine during repetitive stimulation at the neuromuscular junction. Eur. J. Pharmacol., 53: 307-311, 1979.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; UCHIYAMA, T. and LECHAT, M. P. Inhibitory effect of Kanamycin on evoked transmitter release reversal by 3,4-diaminopyridine. Eur. J. Pharmacol., 57: 93-97, 1979.

\_\_\_\_\_ and THESLEFF, S. Electrotonic properties of motor nerve terminals. Acta Physiol. Scand., 114: 271-275, 1982.

MORITOKI, K.; TAKEI, M.; NAKAMOTO, N. and ISHIDA, Y. Actions of aminopyridines on guinea-pig ileum. Arch. Int. Pharmacol.

codyn., 232: 28-41, 1978.

MOSKALEWSKI, S. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. Gen. Comparat. Endocrinol., 5: 342-353, 1965.

NICHOLSON, C.; STEINBERG, R.; STÖCKLE, H. and TEN BRUGGENCATE, G. Calcium decrease associated with aminopyridine - induced potassium increase in cat cerebellum. Neuroscience Lett., 3: 315-319, 1976.

\_\_\_\_\_; TEN BRUGGENCATE, G. and SENEKOWITSCH, R. Large potassium signals and slow potentials evoked during aminopyridine or barium superfusion in cat cerebellum. Brain Res., 113: 606-610, 1976.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; STÖCKLE, K.; and STEINBERG, R. Calcium and potassium changes in extracellular microenvironment of cat cerebellar cortex. J. Neurophysiol., 41: 1026-1039, 1978.

ORCI, L. The microanatomy of the islet of Langerhans. Metabolism, XXV: 1303-1313, 1976.

\_\_\_\_\_; MALAISSE-LAGAE, F.; RAVAZZOLA, M.; ROUILLER, D.; RENOLD, A. E.; PERRELET, A. and UNGER, R. H. A morphological basis for intercellular communication between A- and B-cells in the endocrine pancreas. J. Clin. Invest., 56:1066-1070, 1975.

\_\_\_\_\_ and UNGER, R. H. Hypothesis: Functional Subdivi

sion of islets of Langerhans and possible role of D-cells. Lancet, II: 1243-1244, 1975.

OSTLUND, R. E. Contractile proteins and pancreatic beta-cell secretion. Diabetes, 26: 245-252, 1977.

PASKOV, D. S.; STAENOV, N. A. and MIROV, V.Z. New anticurare and analeptic drug Pimadin (4-aminopyridine hydrochloride) and its use in anaesthesia. Eksp. Khir. Anesthesiol., 18: 48, 1973.

PEDERSON, R. A.; SCHUBERT, H. E. and BROWN, J. C. Gastric inhibitory polypeptide. Its physiologic release and insulinotropic action in the dog. Diabetes, 24: 1050-1056, 1975.

PELHATE, M.; HUE, B. and CHANELET, J. Effets de la 4-aminopyridine sur le system nerveux d'un insect: la blatte. C. R. Soc. Biol., 166: 1598-1605, 1972.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; PICHON, Y. and CHANELET, J. Action de la 4-aminopyridine sur la membrane de l'axone isolée d'insecte. C. R. Acad. Sci. (Paris), 278: 2807-2809, 1974.

\_\_\_\_\_ and PICHON, Y. Selective inhibition of potassium current in the giant axon of the cockroach. J. Physiol., 242: 90P-91P, 1974.

PICHON, Y. Pharmacological characterization of ionic channels in unmyelinated axons. J. Physiol. (Paris), 77:1119-1127, 1981.

- RASMUSSEN, H. and GOODMAN, D. B. P. Relationships between calcium and cyclic nucleotides in cell activation. *Physiol. Rev.*, 57: 421-509, 1977.
- REIS, L. C.; DIAS, O.; SANTOS, M. L. and BOSCHERO, A. C. Efeito da 4-aminopiridina (4-AP) sobre a secreção de insulina. *Ciência e Cultura*, 37(7): 663, 1982a.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; GONÇALVES, A. A. and BOSCHERO, A. C. Permeabilidade da membrana das células beta ao  $K^+$ : Efeitos da 4-aminopiridina (4-AP). *Anais do VII Congresso Anual da Soc. Bras. Biofísica*, p. 78, 1982b.
- RIBALET, B. and BEIGELMAN, P. M. Cyclic variation of  $K^+$  conductance in pancreatic  $\beta$ -cells:  $Ca^{2+}$  and voltage dependence. *Amer. J. Physiol.*, 237: C137-C146, 1979.
- ROSS, S. A.; BROWN, J. C. and DUPRÉ, J. Hypersecretion of gastric inhibitory polypeptide following oral glucose in diabetes mellitus. *Diabetes*, 26: 525-529, 1977.
- SAADÉ, N. E.; CHANELET, J. and LONCHAMPT, P. Action facilitatrice de microinjections de 4-aminopyridine sur les activités médullaire réflexes de la Grenouille. *C. R. Soc. Biol.*, 165: 2069-2077, 1971.
- SAND, O.; HAUG, E. and GAUTVIK, M. Effects of thyroliberin and 4-aminopyridine on action potentials and prolactin release and synthesis in rat pituitary cells in culture. *Acta Physiol. Scand.*, 108: 247-252, 1980.

- SCHAUF, C. F.; COLTON, C. A.; COLTON, J. S. and DAVIS, F. A. Aminopyridines and sparteine as inhibitors of membrane potassium conductance: Effects on Myxicola giant axons and the lobster neuromuscular junction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 197: 414-426, 1976.
- SCHUBART, U. K.; ERLICHMAN, J. and FLEISCHER, N. The role of calmodulin in the regulation of protein phosphorylation and insulin release in hamster insulinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 255: 4120-4124, 1980.
- SEE, W. R.; FOLGERING, H. and SCHLÄFKE, M. E. Central respiratory and cardiovascular effects of the Ach releaser 4-aminopyridine (4-AP). *Pflügers Arch.*, 377: R20, 1978.
- SHELIN, J. Calcium uptake by subcellular fractions of pancreatic islets. *Biochem. J.*, 156: 63, 1976.
- \_\_\_\_\_. Potassium-stimulated  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake by subcellular particles of pancreatic  $\beta$ -cells. *Am. J. Physiol.*, 240: C35-C38, 1981.
- \_\_\_\_\_ and TALJEDAL, I. B. Glucose-induced decrease in  $\text{Rb}^+$  permeability in pancreatic beta-cells. *Nature*: 253: 635-636, 1975.
- SENER, A.; LEVY, J. and MALAISSE, W. J. The stimulus - secretion coupling of glucose-induced insulin release. Does glycolysis control calcium transport in the  $\beta$ -cell? *Biochem. J.*, 156: 521-525, 1976.

SHAPOVALOV, A. I. and SHIRIAEV, B. I. Modulation of transmission in different electronic junctions by aminopyridine. *Experientia*, 34: 67-68, 1978.

SHARP, G. W. G.; WIEDENKELLER, D. E.; KAE LIN, D.; SIEGEL, E. G. and WOLLHEIM, C. B. Stimulation of adenylate cyclase by  $\text{Ca}^{2+}$  and calmodulin in rat islets of Langerhans. Explanation for the glucose-induced increase in cyclic AMP levels. *Diabetes*, 29: 74-77, 1980.

SHEAVES, R. M. BOWMAN, D. and HOPE, D. B. Calmodulin and posterior pituitary gland neurosecretion. *Biochem. Soc. Trans.*, 8: 557-558, 1980.

---

\_\_\_\_\_ and HOPE, D. B. Calmodulin and neurosecretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 356: 435, 1980.

SIEGEL, E. G.; WOLLHEIM, C. B.; RENOLD, A. E. and 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.

SIMPSON, L. L. Pharmacological studies on the subcellular site of action of botulinum toxin type A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 206: 661-669, 1978.

SINGH, Y. N.; MARSHALL, I. G. and HARVEY, A. L. Reversal of antibiotic-induced muscle paralysis by 3,4-diaminopyridine. *J. Pharm. Pharmac.*, 30: 249-250, 1978.

SOBEK, V.; LEMEIGNAN, M.; STREICHENBERGER, G.; BENOIST, J.

- M.; GOGUEL, A. et LECHAT, P. Étude sur le diaphragme isolé de rat de l'antagonisme entre substances curarisantes et aminopyridines. Arch. Int. Pharmacodyn., 171: 356-368, 1968.
- SOMERS, G.; BLONDEL, B.; ORCI, L. and MALAISSE, W. J. Motile events in pancreatic endocrine cells. Endocrinology, 104: 255-264, 1979.
- STOYANOV, E.; VULCHEV, P.; SHTURBOVA, M. and MARINOVA, M. Clinical electromyomechanographic and electromyographic studies in the curarization with Pymadine. Anaesth. Resus. Intern. Ther., 4: 139-142, 1976.
- SUGDEN, M. C.; CHRISTIE, M. R. and ASHCROFT, S. J. H. Presence and possible role of calcium-dependent regulator (calmodulin) in rat islets of Langerhans. FEBS Lett., 105: 95-100, 1979.
- SUTTER, B. Ch. J. Régulation hormonale de la sécrétion de l'insuline. J. Physiol. (Paris), 78: 119-130, 1982.
- SWANSTON-FLATT, S. K.; CARLSSON, L. and GYLFE, E. Actin filament formation in pancreatic  $\beta$ -cells during glucose stimulation of insulin secretion. FEBS Lett., 117: 299-302, 1980.
- SZENTE, M. and PONGRÁCZ, F. Aminopyridine-induced seizure activity. Electroenceph. Clin. Neurophys., 46: 605-608, 1979.
- TALJEDAL, I. B. On insulin secretion. Diabetologia, 21: 1-17, 1981.

- THESLEFF, S. Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience*, 5: 1413-1419, 1980.
- THOMPSON, S. H. Aminopyridine block of transient potassium current. *J. Gen. Physiol.*, 80: 1-18, 1982.
- TOKUNAGA, A.; SANDRI, C. and AKERT, K. Increase of large intramembraneous particles in the presynaptic active zone after administration of 4-aminopyridine. *Brain. Res.*, 174: 207-219, 1979.
- UCHIYAMA, T.; MOLGÓ, J. and LEMEIGNAN, M. Presynaptic effects of bekanamycin at the frog neuromuscular junction. Reversibility by calcium and aminopyridines. *Eur. J. Pharmacol.*, 72: 271-280, 1981.
- ULBRICHT, A. and WAGNER, H. H. Block of potassium channels of the nodal membrane by 4-aminopyridine and its partial removal on depolarization. *Pflügers Arch.*, 367: 77-87, 1976.
- UNGER, R. H. The milieu interieur and the islets of Langerhans. *Diabetologia*, 20: 1-11, 1981.
- \_\_\_\_\_ and EISENTRAUT, A. M. Entero-insular axis. *Arch. Inter. Med.*, 123: 261-266, 1969.
- \_\_\_\_\_; DOBBS, R. E. and ORCI, L. Insulin, glucagon and somatostatin secretion in the regulation of metabolism. *Ann. Rev. Physiol.*, 40: 307-343, 1978.
- VALVERDE, I.; VANDERMEERS, A.; ANJANEYULU, R. and MALAISSE, W.

J. Calmodulin activation of adenylate cyclase in pancreatic islets. *Science*, 206: 225-227, 1979.

VALVERDE, I.; SENER, A.; LEBRUN, P.; HERCHUELZ, A. and MALAISSE, W. J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XLVII. The possible role of calmodulin. *Endocrinology*, 108: 1305-1312, 1981.

VITAL BRAZIL, O. and PRADO FRANCESCHI, J. The nature of neuromuscular block produced by neomycin and gentamycin. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 179: 78, 1969.

WEIDE, W. and LÖFFELHOLZ, K. 4-Aminopyridine antagonizes the inhibitory effect of pentobarbital on acetylcholine release in the heart. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, 312: 7-13, 1980.

WOLLHEIM, C. B.; KIKUCHI, M.; RENOLD, A. E. and SHARP, G. W. G. Somatostatin and epinephrine - induced modifications of  $^{45}\text{Ca}^{++}$  fluxes and insulin release in rat pancreatic islets maintained in tissue culture. *J. Clin. Invest.*, 60: 1165-1173, 1977.

\_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. The roles of intracellular and extracellular  $\text{Ca}^{++}$  in glucose-stimulated biphasic insulin release by rat islets. *J. Clin. Invest.*, 62: 451-458, 1978.

\_\_\_\_\_ and SHARP, G. W. P. Regulation of insulin release by calcium. *Physiol. Rev.*, 61: 914-973, 1981.

WOLLMER, P.; WOHLFART, B. and KHAN, A. R. Effects of 4-aminopyridine on isolated papillary muscles of the rabbit. *Acta Physiol. Scand.*, 473: p30, 1979.

\_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. Effects of 4-aminopyridine on contractile response and action potential of rabbit papillary muscle. *Acta. Physiol. Scand.*, 113:183-187, 1981.

YANAGISAWA, T.; SATOH, K. and TAIRA, N. Excitation of autonomic nerves by 4-aminopyridine in the isolated blood-perfused sino-atrial node preparation of the dog. *Eur. J. Pharmacol.*, 49: 189-192, 1978.

\_\_\_\_\_ and TAIRA, N. Positive inotropic effect of 4-aminopyridine on dog ventricular muscle. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, 307: 207-212, 1979.

YEH, J. Z.; OXFORD, G. S.; WU, C. H. and NARAHASHI, T. Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid axon membranes. *Biophys. J.* 16: 77-81, 1976.

ZETLER, G. and SOWOIDNICH, T. Substance P, bethanechol, 4-aminopyridine and potassium antagonize the depressing effects of low-frequency stimulation, tetrodotoxin, procaine and of magnesium on the field-stimulated guinea-pig vas deferens. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 248: 50-68, 1980.