

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida pela ~~condi~~ aluna Andrea de Castro Perez e aprovada pela comissão julgadora

ANDREA DE CASTRO PEREZ

J. Bonfatti
20/06/86

PERMEABILIDADE DO Ca^{2+} NAS CÉLULAS β : EFEITO DA GENTAMICINA

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de MESTRE em Biologia na área de Fisiologia e Biofísica.

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO CARLOS BOSCHERO

CAMPINAS

-1986-

É NECESSÁRIO CRER em alguém ou nalguma coisa. Mas crer.

Crer nos homens e em Deus, num só coração ou em toda a humanidade. Crer nos invisíveis sinais das almas, nos mudos a pelos do coração, nas profundas vozes da consciência. Mas crer ainda.

Crer nos destinos que se encontram, se entrelaçam e se reconhecem; nas fontes luminosas das inspirações, das vocações e das predestinações; no fluxo e refluxo das almas, dos corações e dos destinos que cantam os eternos motivos da sinfonia do mundo. Mas crer sempre.

Crer nas energias espirituais capazes de alimentar a nossa vida mais íntima e mais profunda; nas forças magnéticas que nascem do amor e da dor, astros criadores de corações e de almas, de consciências e de destinos.

Crer nos ideais que flutuam acima da nossa mortal humanidade; numa pátria mais bela e mais justa que recólha as almas vitoriosas; no infinito dos mundos onde reina a harmonia suprema, da qual o nosso coração é o primeiro acorde misterioso.

Mas crer ainda e sempre nos valores fundamentais da vida, bela ainda quando trágica, grande ainda quando miserável.

Crer, porque a fê é a chama que diviniza o amor.

OLEGÁRIO PEREZ

A presença do homem faz lem
brar alguma coisa. A presença das
coisas faz lembrar Alguém.

Aos meus pais e irmãos,
dedico.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
Antagonistas do Cálcio	5
PROPOSIÇÃO DO TRABALHO	9
MATERIAL E MÉTODOS	10
Animais	10
Isolamento das Ilhotas de Langerhans	10
Incorporação de ^{45}Ca por Ilhotas de Langerhans Isola- das	11
Efluxo do ^{86}Rb	13
Radioisótopos e Reagentes	14
SOLUÇÕES	16
Solução de Hanks	16
Tratamento Estatístico	17
RESULTADOS	18
Efeito da Gentamicina sobre a Incorporação de ^{45}Ca ..	18
Efeito do D600 sobre a Incorporação de ^{45}Ca	19
Efeito da Gentamicina sobre o Efluxo do ^{86}Rb	20
DISCUSSÃO	36
RESUMO E CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

INTRODUÇÃO

Os íons Ca^{2+} tem função regulatória em muitos eventos celulares (RAVAZZOLA e cols., 1976 e RASMUSSEN & GOODMAN, 1977), sendo este papel regulatório em secreção, primeiramente demonstrado na liberação de adrenalina por células cromafins da medula suprarenal (DOUGLAS & RUBIN, 1961).

A exemplo do acoplamento excitação-contração em células musculares, um aumento da concentração de Ca^{2+} ionizado em um compartimento crítico do citosol das células secretoras leva a exocitose (RUBIN, 1970). Nas células β este íon tem papel importante na regulação da liberação de insulina (WOLLHEIM & SHARP, 1981 e MALAISSE, 1984b).

Dentre os agentes que estimulam a secreção de insulina (iniciadores ou estímulos primários) temos: carboidratos (glicose, manose, N-acetilglucosamina, inosina, gliceraldeído, diidroxiacetona, glucosamina); aminoácidos (arginina, leucina, lisina, fenilalanina); ácidos graxos e outros, sendo a α -D-glicose o maior estímulo fisiológico. Os outros agentes que "per se" não desencadeiam a resposta secretória são denominados potencializadores ou estímulos secundários (DELATTRE, 1981).

Assim, "in vivo" a liberação de insulina é regulada por vários fatores, podendo os mesmos serem agrupados em controle direto, que englobaria um controle nutricional, hormonal e neuro humoral e, um controle indireto correspondente à ontogênese, endócrino e alimentar (MALAISSE e cols., 1979; MALAISSE, 1984 e PIPELEERS, 1984).

O processo de secreção de insulina induzido pela glicose pode ser visto como uma sequência de eventos metabólicos (identificação da glicose pela célula β como estímulo); catiônicos (acúmulo intracelular de K^+ e Ca^{2+}) e mecânicos (ativação do sistema de microtúbulos e microfilamentos responsável pela translocação e exocitose dos grânulos secretores WOLLHEIM & SHARP, 1981; HENQUIM & MEISSNER, 1984; HOWEL & TYHURST, 1984 e SENER & MALAISSE, 1984).

Por muito tempo duas teorias foram discutidas para explicar o evento iniciador da liberação de insulina. A primeira por MATSCHINSKY e cols. (1971) postulava a existência de um glicoreceptor que desencadearia a resposta secretória. A segunda por MALAISSE e cols. (1976) metabólica (ou sítio substrato), sendo presentemente aceita pela grande maioria dos investigadores da área.

De acordo com a hipótese de MALAISSE e cols (1976) temos um aumento da concentração intracelular de $NAD(P)H^+$, H^+ e ATP como consequência do metabolismo da glicose. O primeiro atuaria aumentando a atividade ionoforética do Ca^{2+} a nível da membrana, e o segundo reduziria o contratransporte Na^+/Ca^{2+} , bem como o transporte ionoforético do K^+ pela membrana. A redução da saída do K^+ despolariza a membrana e consequentemente abre os canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, (SEHLIN & TÄLJEDAL, 1975 e MALAISSE e cols., 1978b).

A produção aumentada de ATP, essencial para preencher a necessidade de energia daquela célula, também parece contribuir para o aumento intracelular de K^+ provavelmente pelo fechamento dos canais de K^+ sensíveis ao ATP (CARPINELLI & MALAISSE, 1980b e COOK & HALES, 1984).

Ao contrário da síntese (CURRY, BENNETT & GRODS-

KY, 1968 e PIPELLERS, MARICHAL & MALAISSE, 1973), a liberação de insulina, induzida pela glicose, ocorre somente na presença de Ca^{2+} . Comprovadamente, um aumento na concentração extracelular desse íon leva a um aumento da secreção de insulina (CURRY, BENNETT & GRODSKY, 1968; KIKUCHI e cols., 1978 e HELLMAN e cols., 1979), enquanto que em concentrações extracelulares reduzidas ocorre inibição da secreção (HENQUIM, 1978; MALAISSE e cols., 1978b e HELLMAN e cols., 1979). Além dessa participação do Ca^{2+} extracelular, há um pool de Ca^{2+} mobilizado de organelas intracelulares, comprovado recentemente por experimentos com Quin2, um traçador de Ca^{2+} citoplasmático (PRENTKI & WOLLHEIM, 1984).

Há quatro modos que podem ser combinados pelos quais os diferentes secretagogos aumentam o nível de Ca^{2+} citosólico:

- 1) aumento do influxo de Ca^{2+} do líquido extracelular pela abertura de canais voltagem-dependentes ou independentes, resultando na entrada passiva do íon (gradiente eletroquímico).
- 2) Diminuição do seu efluxo.
- 3) Inibição do sequestro de Ca^{2+} por organelas intracelulares.
- 4) Mobilização do Ca^{2+} desses depósitos intracelulares.

Com certeza o estímulo da secreção induzida pela glicose utiliza uma combinação destes mecanismos, porém a participação de cada um ainda não está completamente elucidada.

MALAISSE-LAGAE e MALAISSE (1971), foram os primeiros a demonstrar que ilhotas de ratos incubadas por 90 minutos em altas concentrações de glicose retinham mais Ca^{2+} do

que aquelas incubadas na ausência ou em presença de baixas concentrações do açúcar. Esse efeito da glicose em aumentar a retenção de Ca^{2+} parece ser exclusivo para as ilhotas, visto que não ocorre no pâncreas exócrino, e nem no fígado (BLOOM e cols., 1977). Glicose também inibe o efluxo de Ca^{2+} , seguramente pela redução do contra transporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (HERCHUELZ, SENNER & MALAISSE, 1980). É provável ainda que a redução da saída do Ca^{2+} tenha a ver com um possível aumento da incorporação de Ca^{2+} por organelas intracelulares, como sugerido por RIBES e cols. (1981).

Em relação ao K^+ prevalece hoje em dia o conceito de que elevação da concentração extracelular do mesmo estimula, enquanto que uma redução inibe a secreção de insulina (GRODSKY & BENNETT, 1966). Porém devemos considerar o trabalho de HERCHUELZ & MALAISSE (1980) o qual relata que a retirada do K^+ do meio extracelular poderia acarretar a longo prazo uma estimulação da secreção devido ao acúmulo intracelular de Na^+ e conseqüentemente, despolarização celular.

A secreção de insulina provocada pela glicose ocorre devido à sua capacidade em reduzir a permeabilidade ao K^+ . O acúmulo deste íon na célula β também se deve à participação da bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ (BOSCHERO e cols., 1977).

Já o efluxo de K^+ envolve a ativação das permeabilidades "voltagem sensível" e " Ca^{2+} -sensível" que podem ser inibidas pela tetraetilamonia e quinina respectivamente (ATWATER, 1980 e CARPINELLI & MALAISSE, 1980a).

Aminoácidos também induzem secreção de insulina tanto "in vivo" como "in vitro" (LAMBERT e cols., 1969 e MILNER, 1969). Neste caso a metabolização não parece ser um passo determinante pois, arginina e seus análogos não metabolizáveis estimulam secreção de insulina quando na presença

de Ca^{2+} (LAMBERT e cols., 1969, MILNER, 1969; MALAISSE - LA-GAE, BRISSON & MALAISSE, 1971; FAJANS e cols., 1974, LE-CLERQ-MEYER, MARCHAND & MALAISSE, 1976; HELLMANN e cols. , 1977 e MALAISSE e cols., 1980). O aminoácido arginina despolariza a célula β (BEIGELMAN, RIBALET & ATWATER, 1977 e HENQUIN & MEISSNER, 1981), porém não reduz o efluxo de K^+ da mesma (HENQUIN & MEISSNER, 1981). CHARLES, TAMAGAWA & HENQUIN, (1982) sugeriram que a despolarização da célula é devida às cargas elétricas dessa molécula.

A arginina estimula a incorporação de Ca^{2+} pela abertura de canais de cálcio voltagem-independentes, e essa entrada de Ca^{2+} poderia contribuir para despolarizar a membrana da célula β (HERCHUELZ e cols., 1984).

ANTAGONISTAS DE CÁLCIO

Essas drogas tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores, e entre elas podemos citar os antibióticos aminoglicosídicos, que são substâncias básicas (exceção à viomicina) elaboradas por actinomicetos dos gêneros Streptomyces e Micromonospora (RINEHART, 1964).

Formam o grupo as famílias da estreptomicina (estreptomicina e diidroestreptomicina); da canamicina (canamicina, tobramicina e amicacina); da gentamicina (gentamicina, sisomicina, netilmicina); e da neomicina (neomicina, paromomicina, ribostamicina e lividomicina), além de outros como aminosidina, soframicina, espectinomicina, becanamicina, etc.

Entre eles a estreptomicina , a diidroestreptomicina, a aminosidina e a gentamicina são de maior importância clínica devido ao seu amplo uso terapêutico.

Suas estruturas moleculares são similares (dois ou mais aminoaçúcares, conectados por enlaces glicosídicos a um anel inositólico modificado - o aminociclitol) (SANDE & MANDELL, 1980) e induzem qualitativamente efeitos tóxicos similares que, dependendo da dosagem, método de administração e duração do tratamento pode levar a quadros de toxicidade crônica ou aguda.

Esses antibióticos interferem com uma variedade de funções fisiológicas tais como: interrupções na transmissão neuromuscular (PRINDGEN, 1956; VITAL BRAZIL & CORRADO, 1957; CORRADO, RAMOS & DE ESCOBAR, 1959; VITAL BRAZIL & PRADO FRANCESCHI, 1969a e b; PITTINGER, ERYASA & ADAMSOM, 1970; PITTINGER & ADAMSON, 1972; DUNKLEY, SANGHVI & GOLDSTEIN, 1973; WRIGHT & COLLIER, 1977 e LEE & DE SILVA, 1979), desacoplamento do processo de excitação contração no músculo cardíaco (SWAIN, KIPLINGER & BLODY, 1956; LEADERS, PITTINGER & LONG, 1960; ADAMS, 1975a e b; ADAMS & DURRETT, 1978; PAYET e cols., 1980), efeitos inibidores sobre os processos fisiológicos da contratilidade na musculatura lisa vascular (WOLF & WIGTON, 1971; WEISS, GOODMAN & ADAMS, 1973; GOODMAN, WEISS & ADAMS, 1974; ADAMS & GOODMAN, 1975; ADAMS, 1976 e GOODMAN & ADAMS, 1976), musculatura bronquial (BENZI e cols., 1971 e ALTINKURT & KANZIK, 1980), musculatura lisa intestinal (LEADERS, PITTINGER & LONG, 1960; DZOLJIC & ATANACKOVIC, 1965 e PIMENTA DE MORAIS, CORRADO & SUAREZ-KURTZ, 1978), bloqueio ganglionar (CORRADO, 1958; CORRADO & RAMOS, 1958, 1960; LEADERS, PITTINGER & LONG, 1960; WRIGHT & COLLIER, 1977 e ALKADHI & McISAAC, 1978), em alguns parâmetros fisiológicos de fibras nervosas mielinizadas (DIECKE, WESTECKER & VOGT, 1971) além de oto e renal toxicidade (HAWKINS, 1970 e HORI e cols., 1984).

Em membranas artificiais os antibióticos testados inibiram a passagem de íons tais como Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ e Na^+ , sendo o efeito da gentamicina dose dependente e o mais potente (PICCININI e cols, 1973).

VITAL BRASIL & CORRADO (1957) foram os primeiros a mostrar fortes similaridades entre o bloqueio neuromuscular causado pelos antibióticos aminoglicosídicos e Mg^{2+} e, a demonstrar que neostigmina e Ca^{2+} são drogas antidotas capazes de bloquear os efeitos tóxicos.

Estudos posteriores confirmaram que Ca^{2+} é o antagonista de escolha, mesmo nos casos de toxicidade aguda causada pelos aminoglicosídicos no homem (JONES, 1959 e MULLET & KEATS, 1961).

A hipótese de que esses antibióticos formavam um complexo com Ca^{2+} defendida por CORRADO (1963) foi contestada por VITAL BRAZIL & PRADO FRANCESCHI (1969b). Estes demonstraram que os antibióticos assim como o Mg^{2+} competiam com Ca^{2+} por sítios nos receptores do terminal neural, tornando a hipótese competitiva amplamente aceita.

Além disso, como dito inicialmente por SWAIN, KIPPLINGER & BRODY (1956) e posteriormente por ELMQVIST & JOSEFSSON, (1962), PITTINGER & ADAMSON (1972), SUAREZ-KURTZ (1974), CORRADO, PRADO & PIMENTA DE MORAIS (1975) e KOHLHEPP e cols (1982), esses antibióticos não tem efeito quelante de Ca^{2+} .

Em relação ao pâncreas endócrino, os vários antibióticos aminoglicosídicos inibem "in vitro" a secreção de insulina. Assim, a tobramicina, a sisomicina e especificamente a gentamicina têm sido efetivos em reduzir a secreção de insulina e incorporação de ^{45}Ca , os quais não estão rela

cionados com interferências no metabolismo da glicose ou sistema efetor responsável pela extrusão dos grânulos contendo insulina (DELATTRE, SANTOS & BOSCHERO, 1982 e BOSCHERO & DELATTRE, 1985).

A gentamicina, gentamicina C ou Gentiomicina C, um antibiótico pertencente à divisão aminociclitólica do grupo dos antibióticos aminoglicosídicos foi escolhido para este trabalho devido à sua ação antagonista de Ca^{2+} .

PROPOSIÇÃO DO TRABALHO

Recentemente tanto em músculo liso, quanto em células β foi sugerida a existência de uma permeabilidade ao Ca^{2+} voltagem independente (MEISHERI, HWANG & VAN BREEMEN, 1981 e LEBRUN, MALAISSE & HERCHUELZ, 1982), além de uma permeabilidade voltagem-dependente (DEAN & MATTEWS, 1970; ATWATER e cols., 1981 e FINDLAY & DUNNE, 1985).

A gentamicina reduziu a secreção de insulina mesmo na ausência de glicose (quando as células se encontram polarizadas), porém não afetou a secreção em presença de altas concentrações de glicose e K^+ e/ou em presença de Bário e teofilina (DELATTRE, SANTOS E BOSCHERO, 1982 e BOSCHERO & DELATTRE, 1985). De acordo com o exposto acima o presente trabalho tem como objetivo estudar os efeitos da gentamicina sobre estas diferentes permeabilidades tentando discriminar uma possível preferência de bloqueio sobre a permeabilidade insensível à voltagem.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos Wistar, de ambos os sexos de 3 - 6 meses de idade, procedentes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas, mantidos em ciclo fotoperiódico de 14 horas de claro e 10 horas de escuro, a uma temperatura controlada de aproximadamente 23°C. Foi fornecida ração comercial^{*} balanceada suplementada com complexo vitamínico^{**} e água *ad libitum*.

ISOLAMENTO DAS ILHOTAS DE LANGERHANS

Foi utilizada a técnica descrita por MOSKALENSKI (1965) e LACY & KOSTIANOVSKY (1967), modificada por BOSCHERO, DELATTRE & SANTOS (1980).

Em cada experimento 3 - 6 ratos foram sacrificados por concussão cerebral, decapitados para sangria e laparatomizados. O ducto biliar comum foi ocluído na sua porção distal, junto ao duodeno e canulado na porção próximo ao hilo hepático. Através da cânula foram injetados 10 - 20 ml de solução de Hanks enriquecida com glicose (2,8mM) que fluindo através dos ductos pancreáticos, em sentido contrário, promoveu a divulsão do tecido acinoso.

O pâncreas foi retirado (livre de gordura e nódulos)

* Labina (Purina)

** Vitagold

los linfáticos) e reduzido a fragmentos de aproximadamente $0,5 \text{ mm}^3$ com auxílio de uma tesoura e, posteriormente transferidos para um tubo de ensaio de $12 \times 1,5 \text{ cm}$, contendo de 6-10mg de collagenase para cada pâncreas. Incubou-se a 37°C durante 16 minutos sob agitação constante. Nos primeiros 8 minutos, o conteúdo foi movimentado pela passagem de carbogênio - $95\% \text{ O}_2$ $5\% \text{ CO}_2$ - sendo agitado manualmente no restante do tempo.

Finda a digestão do tecido acinoso, foram executadas 4 lavagens sucessivas do conteúdo com solução de Hanks, seguindo-se decantações, em que o sobrenadante foi aspirado, ficando as ilhotas depositadas no fundo. As lavagens serviram para segregar parte do tecido acinoso, reduzir o conteúdo de collagenase e enzimas digestivas do meio e, concentrar as ilhotas.

O produto final foi depositado em placa de Petri, sendo as ilhotas coletadas sob lupa, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, previamente siliconizada e estirada em bico de Bunsen.

INCORPORAÇÃO DE ^{45}Ca POR ILHOTAS DE LANGERHANS ISOLADAS

Foi utilizada a técnica originalmente descrita por MALAISSE-LAGAE & MALAISSE (1971).

Aproximadamente 400 ilhotas foram coletadas e distribuídas em 3 ou 4 grupos. A coleta foi feita alternadamente, 10 ilhotas de cada vez, em cada um dos tubos de ensaio ($5 \times 1 \text{ cm}$).

Terminada a coleta, o sobrenadante de cada tubo

foi descartado, sendo adicionado 150 μl de solução de Krebs contendo ^{45}Ca (60 $\mu\text{Ci/ml}$). Foram acrescentados à solução de Krebs glicose, K^+ , arginina, gentamicina ou D600 quando necessário. A seguir os tubos foram acondicionados em frascos de vidro, providos de tampa com dispositivo para entrada e saída de carbogênio. O pH (7,4) da solução de Krebs radioativa foi ajustado através da passagem desse gás durante os 10 minutos iniciais. Os frascos foram completamente vedados, procedendo-se a incubação por 10 ou 90 minutos, a 37°C .

Após a incubação, o sobrenadante de cada tubo foi transferido para novos recipientes, para ser usado como padrão externo (MÁXIMO): As ilhotas foram lavadas quatro vezes com meio idêntico ao usado na incubação, porém não radioativo. Em seguida, as ilhotas foram distribuídas em placas de Petri e recoletadas em grupos de 8, em frascos plásticos apropriados para cintilação líquida, os quais continham 0,8 ml de água.

Todos os frascos plásticos receberam 6,0 ml de líquido de cintilação (30% de agente tensoativo Tinovetine, 70% de Tolueno e 400 mg/100 ml do cintilador orgânico Omni-fluor), sendo a radioatividade medida em um contador de radiações beta (BECKMAN LS 7000, California, U.S.A.).

Operacionalmente, para se determinar a quantidade de ^{45}Ca incorporado, obtivemos de início um fator F pela seguinte fórmula:

$$F = \frac{1000}{\text{cpm do (máximo)} \times 8}$$

A multiplicação do fator F pelo número de cpm de

cada amostra forneceu a quantidade, em picomoles, de cálcio incorporado, durante 10 ou 90 minutos, por ilhota.

Na fórmula:

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

$\text{cpm do (máximo)} = \text{número de cpm contados a partir de } 1,0 \mu\text{l do meio de incubação.}$

$8 = \text{número de ilhotas coletadas em cada frasco.}$

EFLUXO DO ^{86}Rb

O isótopo ^{86}Rb foi utilizado como substituto dos íons K^+ . O efluxo do ^{86}Rb revelou-se semelhante ao do ^{42}K , podendo ser usado como seu substituto sem grande margem de erro (BOSCHERO e cols., 1977) já que o último apresenta uma meia vida muito curta (12,5 horas). Este procedimento tem sido empregado em ilhotas (SEHLIN E TÄLJEDAL, 1974 e BOSCHERO & MALAISSE, 1977) bem como em outros tecidos (STIEVE & HARTUNG, 1977).

Foram coletadas alternadamente como descrito no item acima, dois grupos contendo 100 ilhotas cada. Estas ilhotas foram incubadas durante 90 minutos a 37°C em solução de Krebs contendo 16,7 mM de glicose e ^{86}Rb ($80 \mu\text{Ci/ml}$) sendo o pH (7,4) equilibrado durante os 10 minutos iniciais com carbogênio.

Após incubação, as ilhotas foram lavadas três vezes com solução de Krebs não radioativa e transferidas para uma câmara de perfusão (vol = 0,3 ml) forrada com um filtro de acetato de celulose com poros de diâmetro igual a

5 μ m. A câmara foi ligada a dois recipientes contendo soluções nutritivas por intermédio de catêteres e uma torneira com duas saídas. As soluções nutritivas foram mantidas a 37°C e continuamente equilibrado com carbogênio para manutenção do pH em 7,4.

A perfusão das ilhotas começou imediatamente após transferência das mesmas para a câmara, com o meio perfusor percorrendo o sistema na razão de 0,6ml/min, impelido por uma bomba peristáltica (Holter pump 5-900 Extracorporeal Med. Spec. Inc., King Prussia, Pa). O meio contendo solução nutritiva proveio do primeiro recipiente até 32º minuto, do segundo até o 52º minuto, e novamente do primeiro recipiente até o 72º minuto, quando a perfusão foi encerrada.

A coleta das amostras teve início no 12º minuto a intervalos regulares de dois minutos. A radioatividade de cada frasco foi avaliada também com um contador de radiações beta, usando-se para isso o efeito CERENKOV, o qual dispensa o líquido de cintilação.

Os resultados serão expressos em termos de taxa fracional de efluxo do ^{86}Rb (%/min).

RADIOSÓTOPOS E REAGENTES

Todos os sais utilizados, bem como a glicose e demais substâncias adicionadas ao meio de isolamento e/ou incubação, eram de grau analítico de pureza (PA). Albumina bovina fração V, Colagenase, e EGTA foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.) ; frascos de polietileno para contagem de radiação e

Omnifluor da New England Corp. (Boston, Mo.), filtro da Millipore Corp. (Bedford, Mass.), Complexo Vitamínico Vitagold do Lab. Tortuga (São Paulo, SP), Tinovetine da COEMA, (São Paulo, SP), ^{86}Rb e ^{45}Ca da Amershan International (Buckinghamshire, England). Gentamicina na forma de sal sulfato foi gentilmente cedido pelo Lab. Schering (Rio de Janeiro, RJ). D600 (metoxiverapamil) da Knoll (Ludwighagen, FRG). Tolueno da Merck (Rio de Janeiro, RJ). Ração Comercial da Purina (São Paulo, S.P.).

SOLUÇÕES

SOLUÇÃO DE HANKS

A solução para isolamento de ilhotas foi preparada segundo a composição salina descrita por HANKS & WALLACE (1949), apresentando a seguinte fórmula:

NaCl	8,000 g
KCl	0,400 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,185 g
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	0,200 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,060 g
KH ₂ PO ₄	0,060 g
NaHCO ₃	0,350 g
H ₂ O destilada (q.s.p.)	1,000 ml

No momento de uso adicionou-se 0,5 g/l de glicose.

A solução de KREBS tem a seguinte composição:

Solução I	NaHCO ₃	13,443 g
	H ₂ O destilada (q.s.p.)	500 ml
Solução II	NaHCO ₃	4,0325 g
	KCl	0,7456 g
	MgCl ₂ 6H ₂ O	0,4067 g
	H ₂ O destilada (q.s.p.)	500 ml
Solução III	CaCl ₂ 2H ₂ O	0,29405 g
	H ₂ O destilada (q.s.p.)	500 ml

Para confecção final da solução de Krebs adicionou-se:

1 vol. sol. I

1 vol. sol. II

1 vol. sol. III

1 vol. H₂O

No momento de uso foram adicionados 3 mg/ml de albumina bovina fração V.

TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A significância estatística foi avaliada pela aplicação do teste t de Student, sendo os resultados expressos como médias e seus respectivos erros padrão.

RESULTADOS

EFEITO DA GENTAMICINA SOBRE A INCORPORAÇÃO DE ^{45}Ca

As figuras 2, 4 e 6 ilustram o efeito estimulador da glicose (8,3 mM), da arginina (10 mM) e do K^+ (20 mM) sobre a incorporação de ^{45}Ca por ilhotas isoladas e incubadas durante 90 minutos.

O aumento da incorporação de ^{45}Ca observado foi de 33,97%, 63,28% e 44,65% respectivamente na presença de glicose, arginina e K^+ , sendo significativamente diferente em relação ao controle (G0, Arg0 e K^+5) ($p < 0,001$). As figuras 2, 4 e 6 mostram ainda o efeito inibidor da gentamicina (1 mM) sobre a incorporação de ^{45}Ca induzida pelos referidos estimuladores. Gentamicina reduziu em 27,81% a incorporação na presença de glicose ($p < 0,001$), em 39,59% na presença de arginina ($p < 0,01$) e apenas em 17,80% ($p < 0,01$) na presença de alta concentração de K^+ .

Como a incorporação do ^{45}Ca após 90 minutos de incubação reflete uma situação de equilíbrio, decidimos repetir estes experimentos com tempo de incubação mais reduzido, ou seja, 10 minutos, onde o influxo de ^{45}Ca prevalece sobre o efluxo.

Os resultados observados estão ilustrados nas figuras 1, 3 e 5. Após 10 minutos de incubação houve aumento significativo da incorporação de ^{45}Ca apenas na presença de glicose 8,3 mM e de K^+ 20 mM, em relação ao controle ($p < 0,001$ e $p < 0,01$ respectivamente). Gentamicina (1 mM) reduziu a incorporação de ^{45}Ca na presença de glicose, K^+ e mes

mo arginina em 28,55%, 8,5% e 28,06% respectivamente, sendo estatisticamente diferente apenas em presença de glicose e arginina ($p < 0,001$).

Os resultados observados na tabela 1 mostram, um terceiro protocolo, onde quatro situações experimentais foram conduzidas ao mesmo tempo, ou seja, situação controle (K^+ 5 mM, G0), controle + gentamicina, substância estimuladora (G 8,3 mM e K^+ 20 mM), substância estimuladora + gentamicina. Observa-se que tanto glicose quanto altas concentrações de K^+ potencializaram significativamente a incorporação de ^{45}Ca pelas ilhotas isoladas. A exemplo dos dados anteriores a inibição provocada por gentamicina foi maior em presença de glicose quando comparado com aquele induzido em presença de 20 mM de K^+ .

Nos experimentos seguintes (tabela 2) não notamos inibição significativa da incorporação de ^{45}Ca pelas ilhotas em nenhuma das condições experimentais (G 8,3 mM, arginina 10 mM e K^+ 20 mM) quando gentamicina foi utilizada na concentração de 0,1 mM.

EFEITO DO D600 SOBRE A INCORPORAÇÃO DE ^{45}Ca

As figuras 7 e 8 ilustram o efeito de (D600) ou outro antagonista de Ca^{2+} sobre a incorporação de ^{45}Ca induzida por Glicose (8,3 mM) e K^+ (20 mM). A incorporação de ^{45}Ca foi potencializada em 23,06% pela glicose e 28,55% pelo K^+ 20 mM ($p < 0,001$). Na presença de D600 houve significativa redução da incorporação de ^{45}Ca em 47,93% e 46,68% para glicose e K^+ respectivamente ($p < 0,001$).

EFEITO DA GENTAMICINA SOBRE O EFLUXO DO ^{86}Rb

Nas figuras 9 - 13 observamos o efeito da gentamicina (1 mM) sobre o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas previamente marcadas com o referido isótopo e perfundidas durante 72 minutos.

Na ausência (fig. 9) ou presença de 8,3 mM de glicose (fig. 10) a introdução de Gentamicina (1 mM) no meio perfusor entre os minutos 32 e 52, não alterou significativamente a razão do efluxo do ^{86}Rb .

A figura 11 mostra o efeito da glicose (8,3 mM) sobre o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas perfundidas na presença de 1 mM de gentamicina. Nota-se que após a introdução de glicose no meio perfusor houve uma rápida, duradoura e significativa redução do efluxo do ^{86}Rb , a qual permaneceu enquanto a glicose esteve presente no meio. Após a retirada desta (min 52) a razão do efluxo voltou próximo aos valores observados nos minutos que antecederam a introdução da glicose.

A figura 12 mostra o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas perfundidas na presença de 20 mM de K^+ . A introdução de gentamicina (1 mM) ao meio introduziu uma ligeira redução da taxa de efluxo, embora não significativa. Tal redução desapareceu quando o mesmo protocolo foi realizado na ausência de Ca^{2+} no meio perfusor acrescido de 0,5 mM de EGTA (fig. 13).

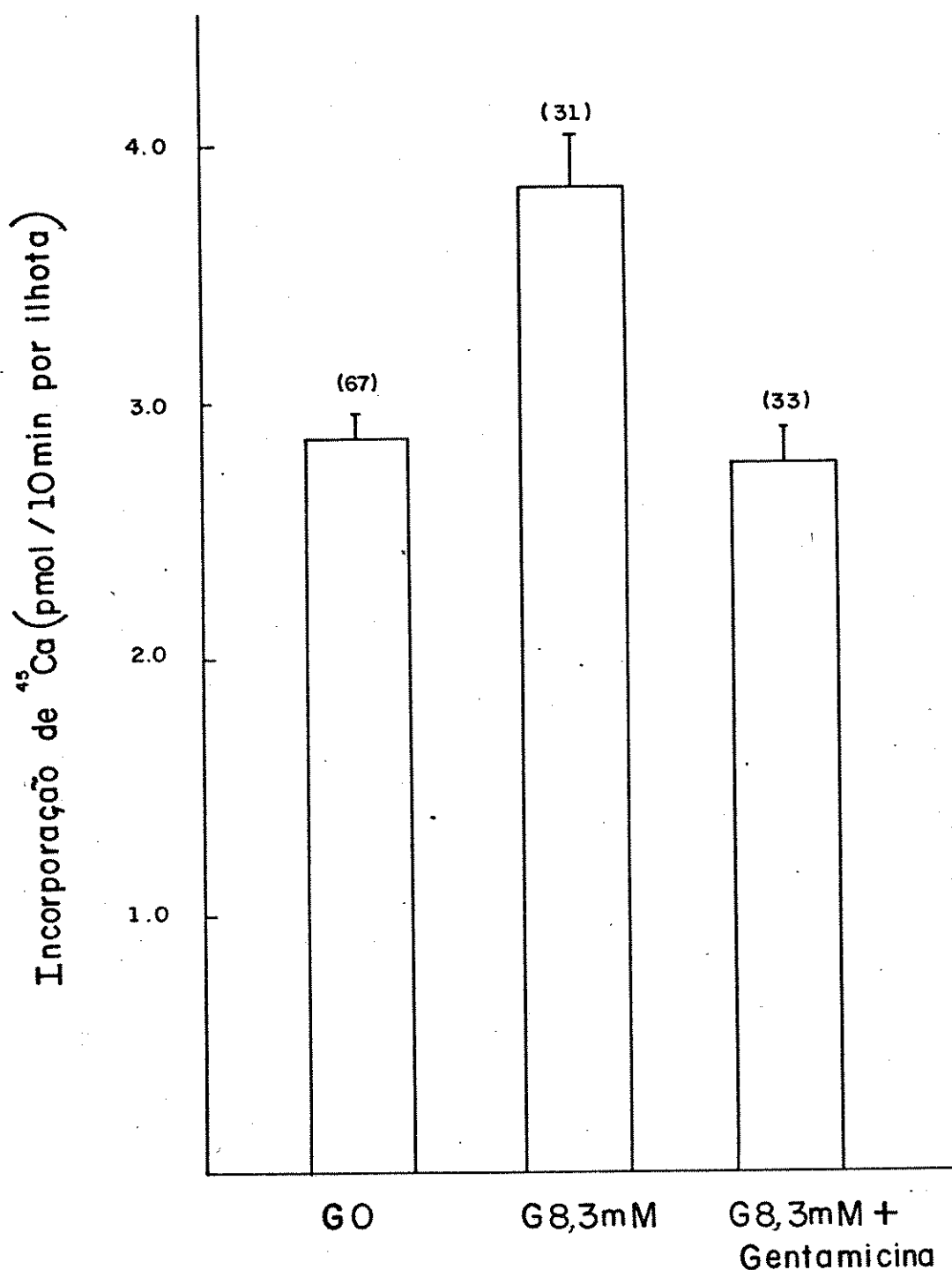


FIGURA 1 - Incorporação de ^{45}Ca por ilhotas incubadas durante 10 minutos na ausência de glicose (G0), presença de 8,3mM de glicose (G 8,3mM) ou presença de 8,3 mM de glicose e 1 mM de gentamicina (G 8,3 mM + gentamicina). Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão e o número de experimentos entre parênteses.

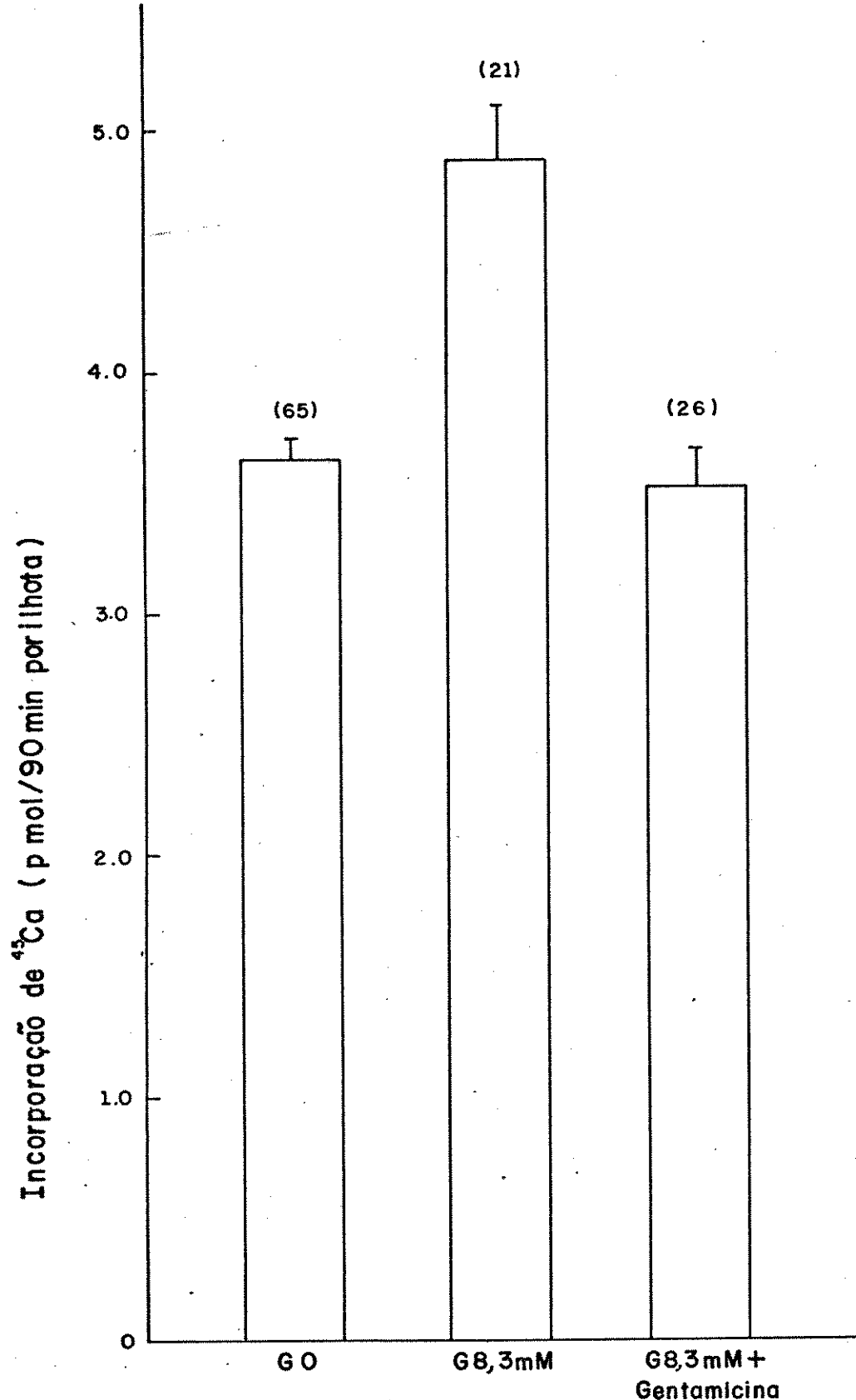


FIGURA 2 - Incorporação de ^{45}Ca por ilhotas incubadas durante 90 minutos na ausência de glicose (G0), presença de 8,3 mM de glicose (G 8,3 mM) ou presença de 8,3 mM de glicose e 1 mM de gentamicina (8,3 mM + gentamicina). Os valores são médias $\pm$ erro padrão, com o número de experimentos entre parênteses.

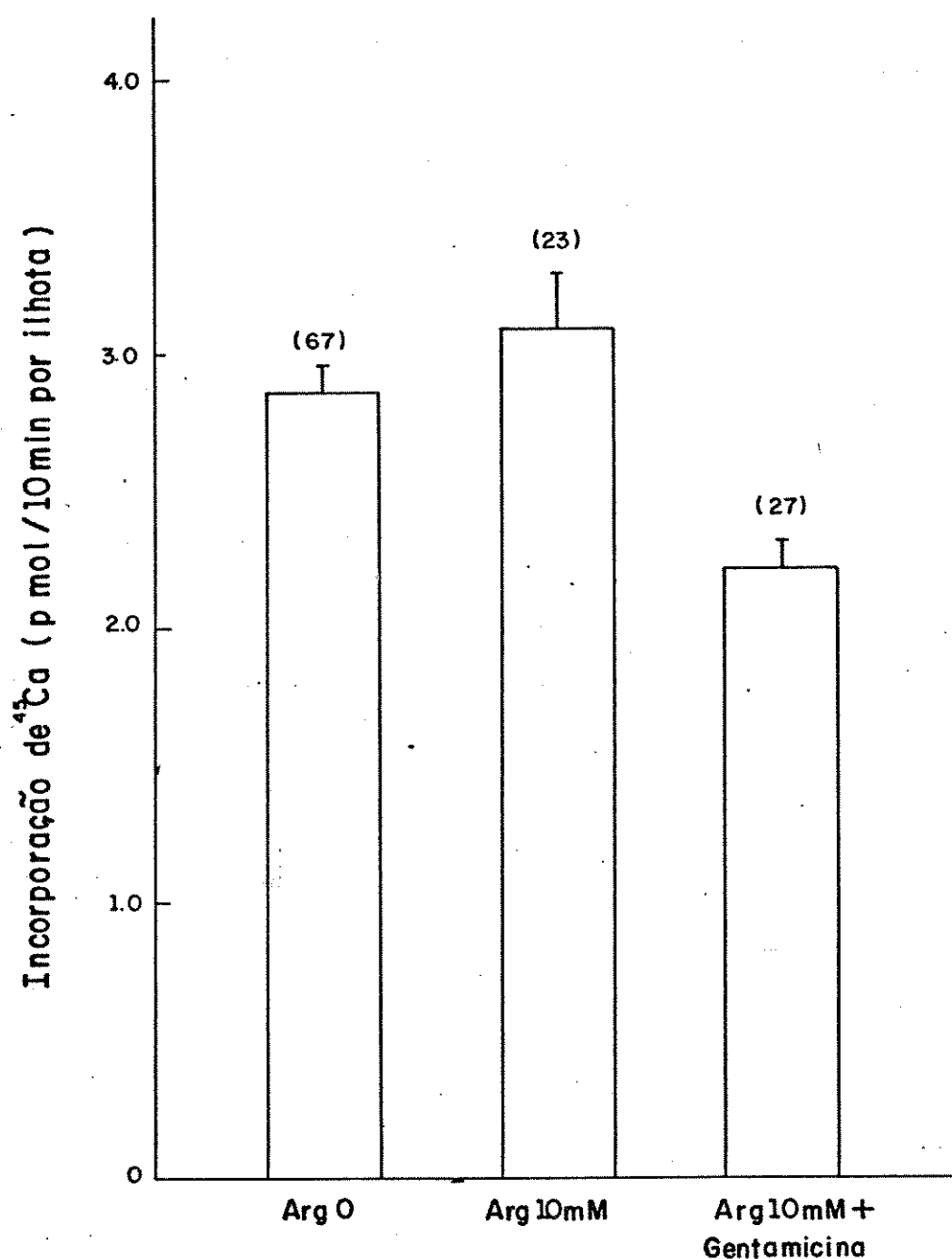


FIGURA 3 - Incorporação de ^{45}Ca por ilhotas incubadas durante 10 minutos na ausência de arginina (Arg 0), presença de 10 mM de arginina (Arg 10 mM) ou presença de arginina 10 mM e 1 mM de gentamicina (Arg 10 mM + gentamicina). São indicadas as médias $\pm$ erro padrão e o número de experimentos entre parênteses.

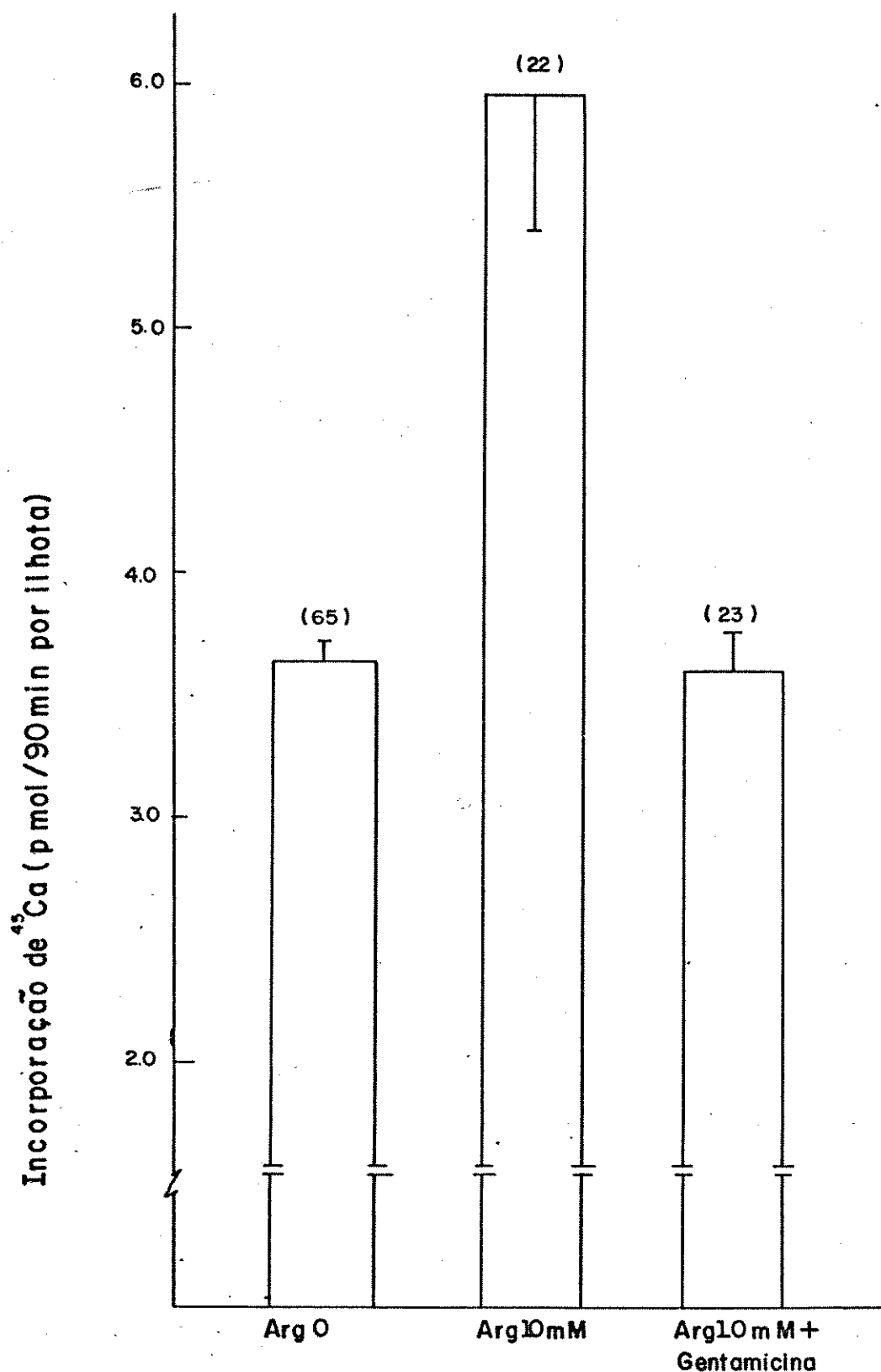


FIGURA 4 - Incorporação de ^{45}Ca por ilhotas incubadas durante 90 minutos na ausência de arginina (Arg 0), presença de 10 mM de arginina (Arg 10 mM) ou presença de 10 mM de arginina e 1 mM de gentamicina (Arg 10 mM + gentamicina). Os valores representam as médias com os respectivos erros padrão, e com o número de experimentos entre parênteses..

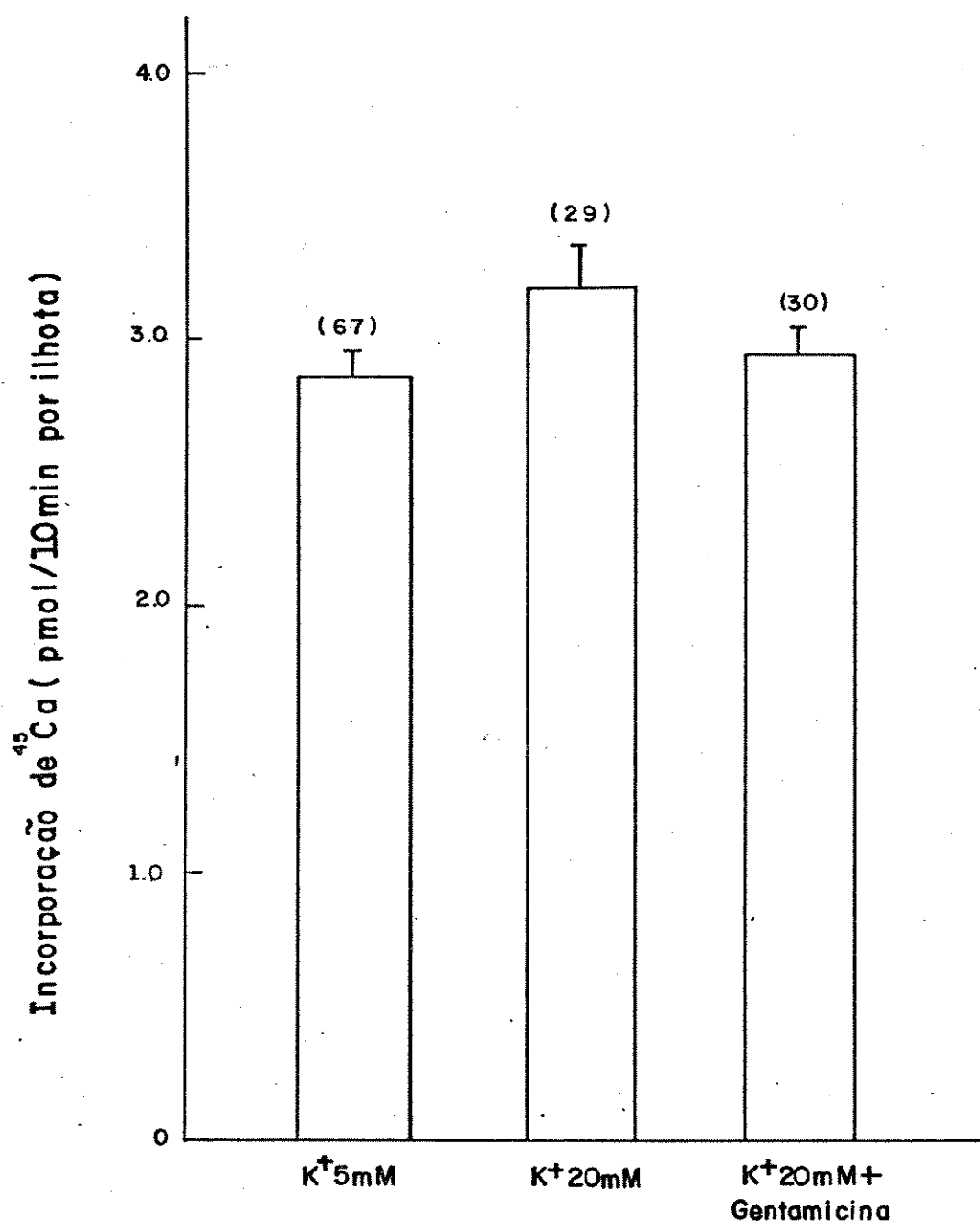


FIGURA 5 - Incorporação de ^{45}Ca por ilhotas incubadas durante 10 minutos na presença de 5 mM de K^+ ($\text{K}^+ 5\text{mM}$), 20 mM de K^+ ($\text{K}^+ 20\text{mM}$) ou 20 mM de K^+ e 1 mM de gentamicina ($\text{K}^+ 20\text{mM} + \text{gentamicina}$). São indicadas na figura as médias ($\pm$ erro padrão) e o número de experimentos entre parênteses.

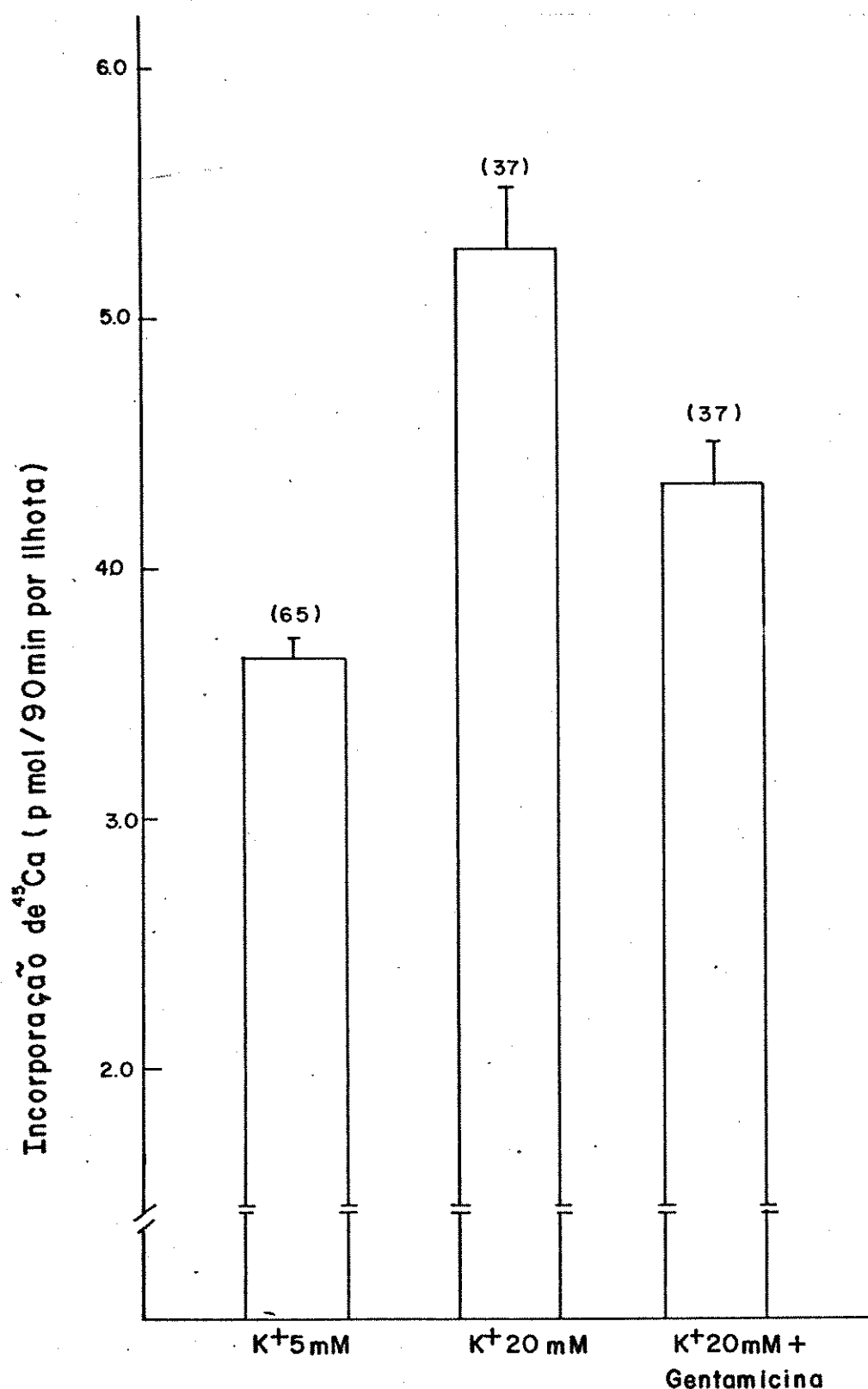


FIGURA 6 - Incorporação de ^{45}Ca por ilhotas incubadas durante 90 minutos na presença de 5 mM de K^+ ($\text{K}^+ 5 \text{ mM}$), 20 mM de K^+ ($\text{K}^+ 20 \text{ mM}$) ou 20 mM de K^+ e 1 mM de gentamicina ($\text{K}^+ 20 \text{ mM} + \text{gentamicina}$). Os resultados são expressos como médias $\pm$ erro padrão e o número de experimentos entre parênteses.

AGENTES (mM)	p mol/90 min por ilhota	% de potencialização	p mol / 90 min por ilhota em pre- sença de gentamicina (1mM)	% de inibição
K ⁺ 5. (controle)	5,21 ± 0,19 (83)		4,74 ± 0,19 (93)	8,84 p < 0,10
K ⁺ 20	10,94 ± 0,39 (49)	110,03 p < 0,001	8,68 ± 0,29 (49)	20,61 p < 0,001
G 8,3	8,52 ± 0,59 (36)	63,57 p < 0,001	5,62 ± 0,40 (38)	35,01 p < 0,001

TABELA 1

Efeito da gentamicina (1,0 mM) sobre a incorporação de ⁴⁵Ca por ilhotas isoladas e incubadas durante 90 min.

Os resultados são expressos como média ± erro padrão e o número de experimentos entre parênteses.

AGENTES (mM)	p mol / 90 min por ilhota	% de potencialização	p mol / 90 min por ilhota em pre- sença de gentamicina (0,1 mM)	% de inibição
K ⁺ 5	3,91 ± 0,15			
K ⁺ 20	5,84 ± 0,32 (16)	49,36 p < 0,001	5,29 ± 9,27 (17)	9,42 p < 0,20
G 8,3	5,08 ± 0,23 (18)	30,00 p < 0,001	4,58 ± 0,32 (15)	9,84 p < 0,10
Arginina	5,15 ± 0,35 (18)	31,71 p < 0,001	5,63 ± 0,38 (18)	não houve inibição p < 0,40

TABELA 2

Efeito da gentamicina (0,1 mM) sobre a incorporação de ⁴⁵Ca por ilhotas isoladas e incubadas durante 90 min.
Os resultados são expressos como média ± erro padrão e o número de experimentos entre parênteses.

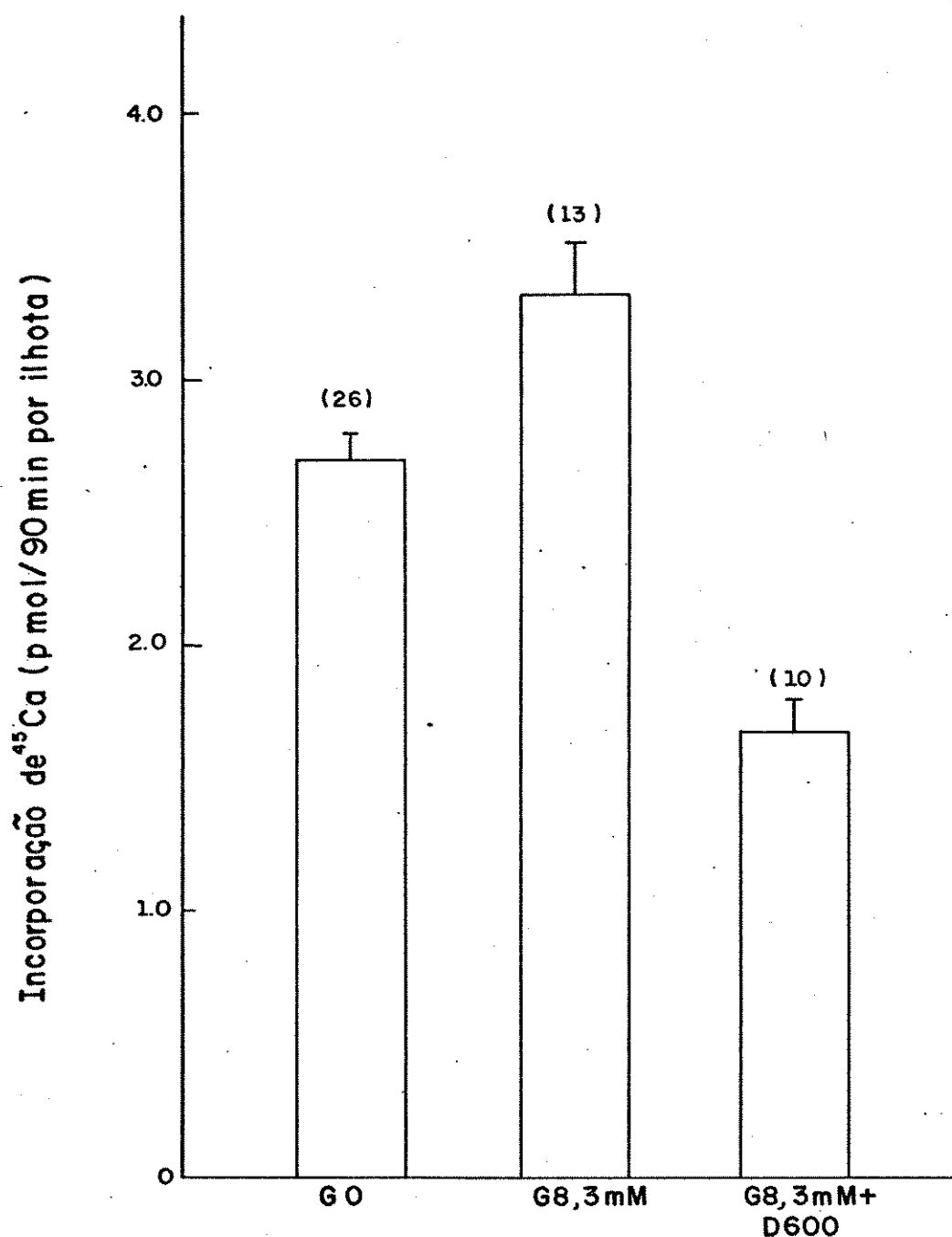


FIGURA 7 - Incorporação de ^{45}Ca por ilhotas incubadas durante 90 minutos na ausência de glicose (G0), presença de 8,3 mM de glicose (G 8,3 mM) ou presença de 8,3 mM de glicose e 5 μM de D600 (G 8,3 mM + D600). São representadas na figura as médias ($\pm$ erro padrão) e o número de experimentos entre parênteses.

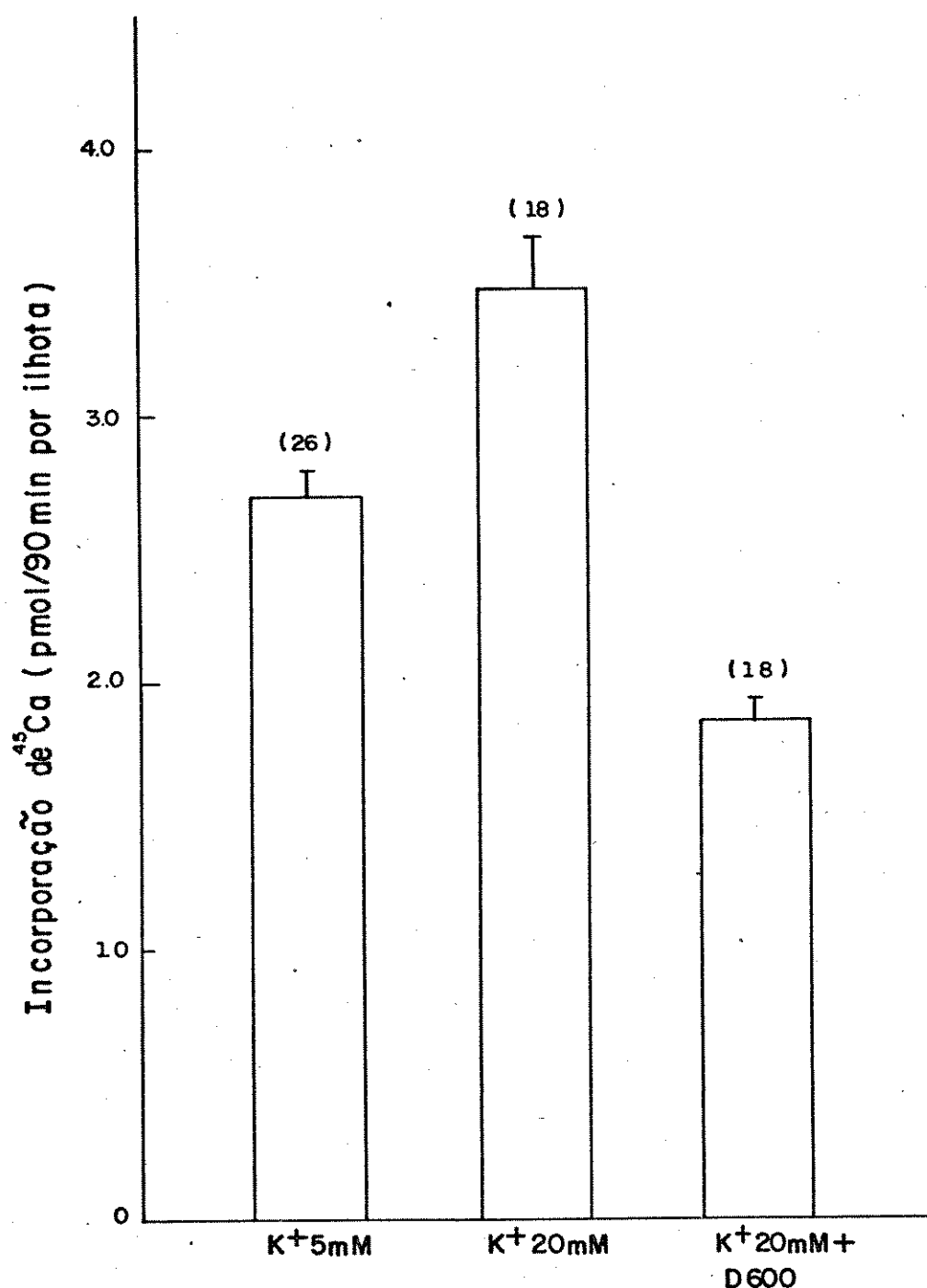


FIGURA 8 - Incorporação de ^{45}Ca por ilhotas incubadas durante 90 minutos na presença de 5 mM de K^+ ($\text{K}^+ 5\text{mM}$), presença de 20 mM de K^+ ($\text{K}^+ 20\text{mM}$) ou presença de 20 mM de K^+ e 5 μM de D600 ($\text{K}^+ 20\text{mM} + \text{D600}$). Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão e o número de experimentos entre parênteses.

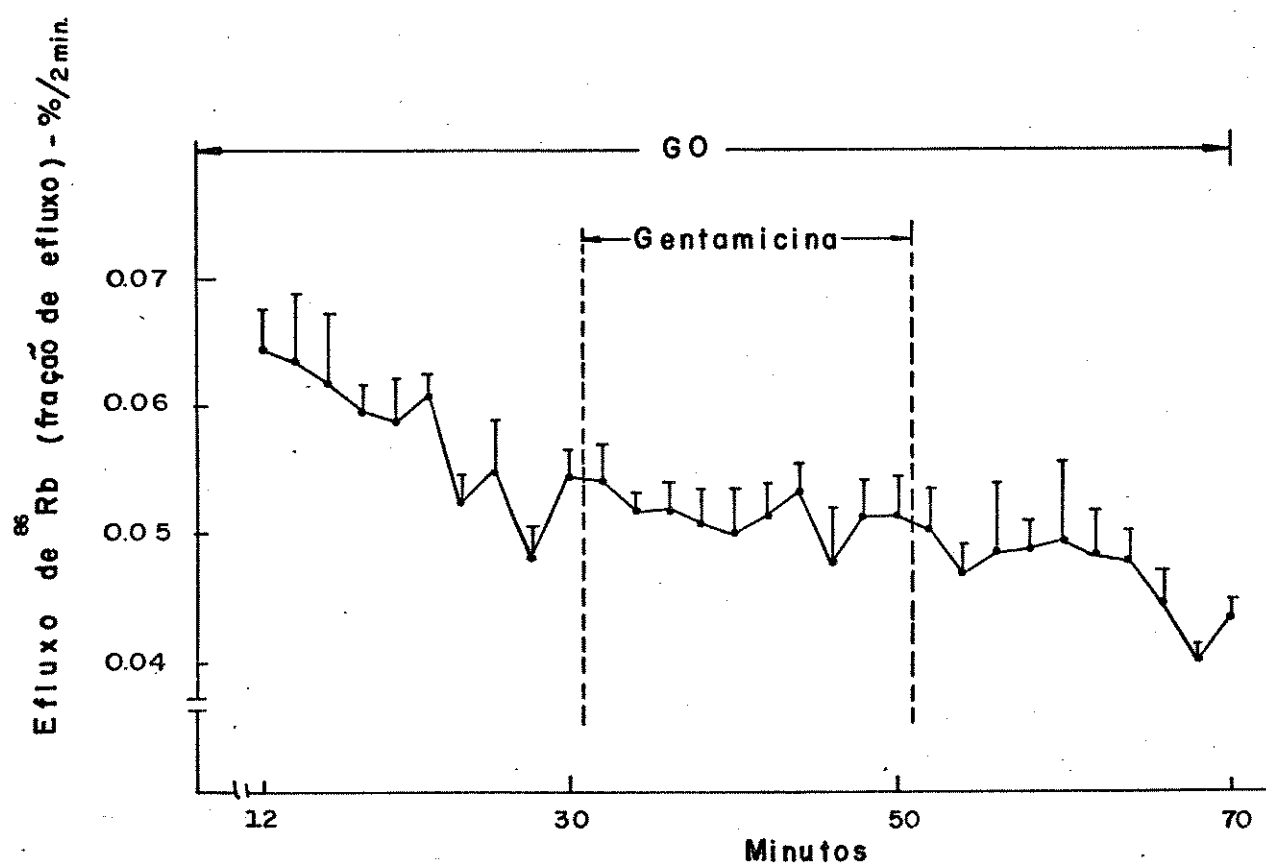


FIGURA 9 - Efeito da gentamicina (1 mM) sobre o efluxo de ^{86}Rb em condições basais (ausência de glicose, G0). As linhas tracejadas delimitam o período em que a gentamicina esteve presente no meio perfusor. Cada ponto corresponde aos valores médios e as barras aos respectivos erros padrão ($n = 4$).

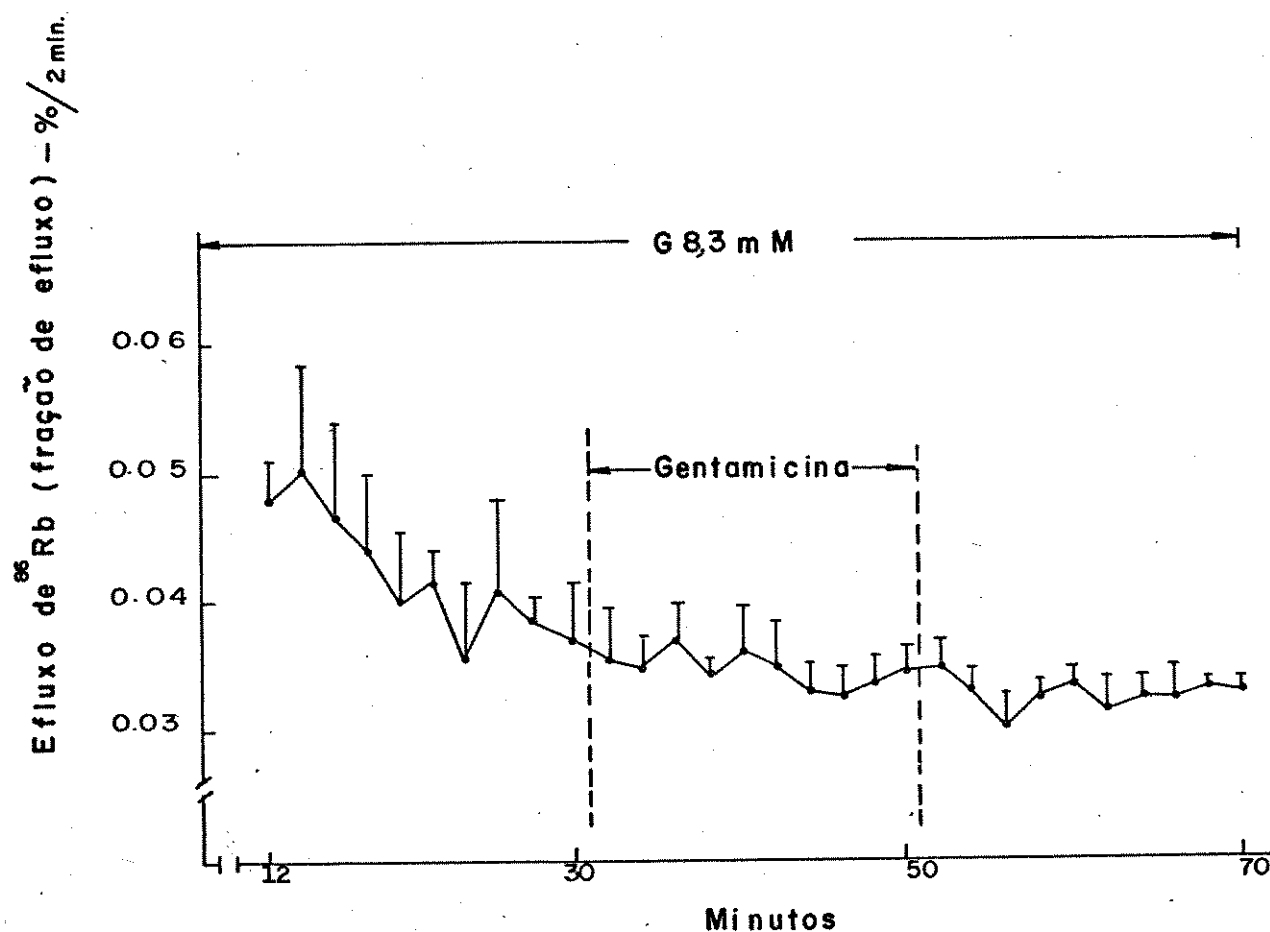


FIGURA 10 - Efeito da gentamicina (1 mM) sobre o efluxo de ^{86}Rb na presença de glicose (G) 8,3 mM. Glicose esteve presente durante toda a perfusão e gentamicina do 32º ao 52º min como indicado pelas linhas tracejadas. São indicadas na figura as médias ($\pm$ erro padrão). $n = 4$

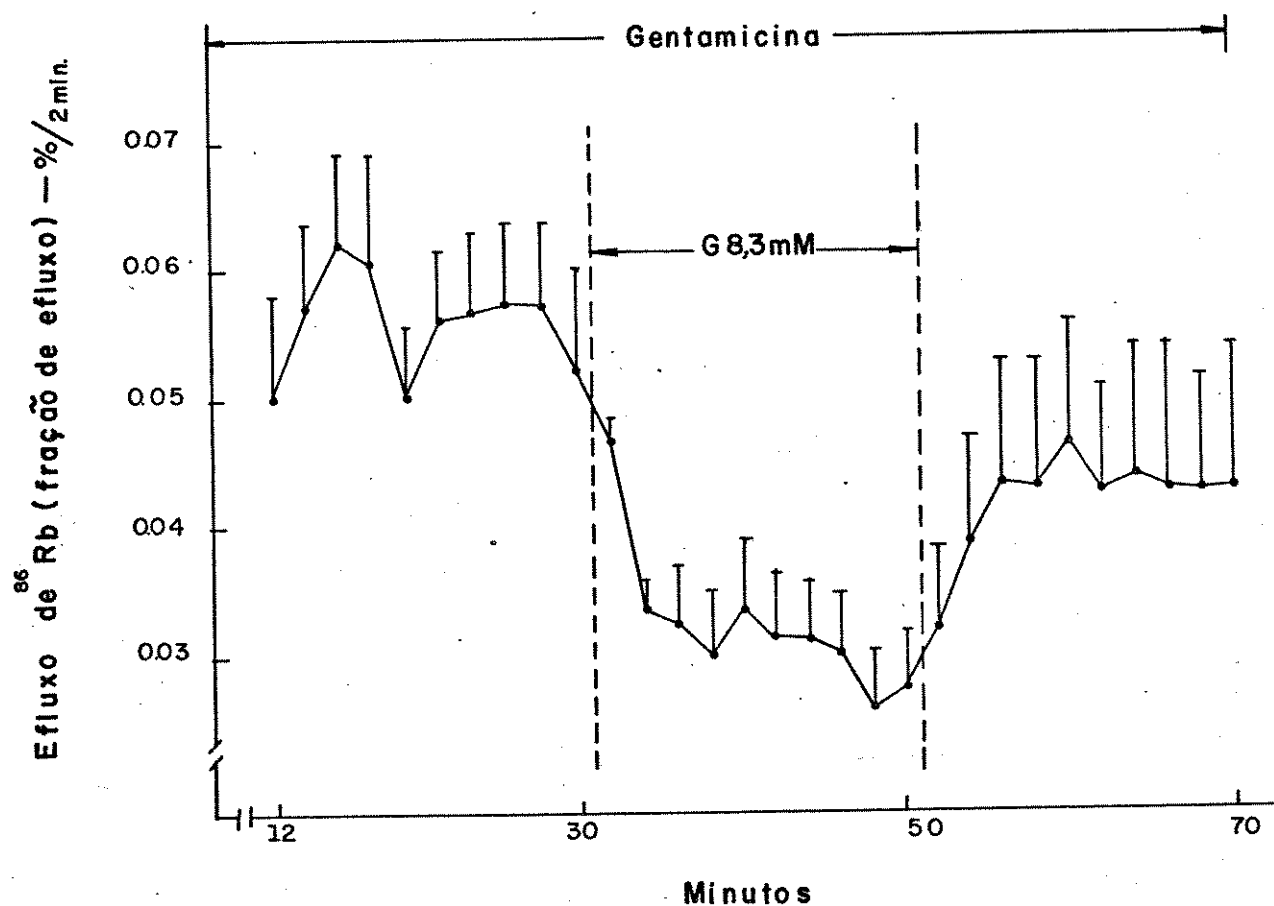


FIGURA 11 - Efeito da glicose (G) 8,3 mM sobre o efluxo de ^{86}Rb em presença de 1 mM de gentamicina. A substância esteve presente durante todo o período de perfusão. As linhas tracejadas indicam o momento da introdução e retirada de glicose (G) 8,3 mM do meio perfusor. São indicadas as médias ($\pm$ erro padrão) $n = 4$.

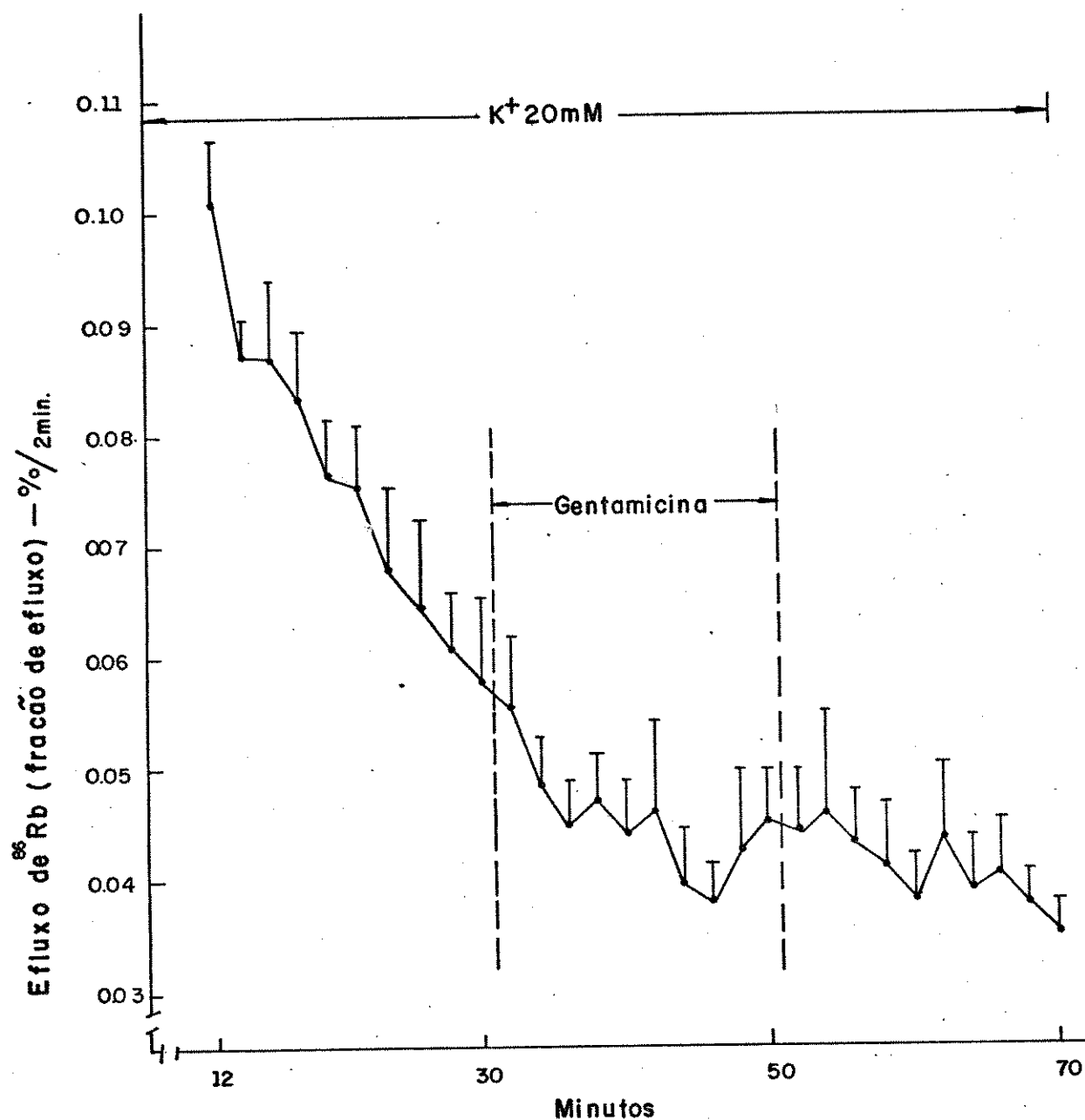


FIGURA 12 - Efeito da gentamicina (1 mM) sobre o efluxo de ^{86}Rb na presença de $\text{K}^+ 20\text{ mM}$. Gentamicina esteve presente do 30º ao 50º min como indicado pelas linhas tracejadas. São indicadas na figura as médias ($\pm$ erro padrão) $n = 4$.

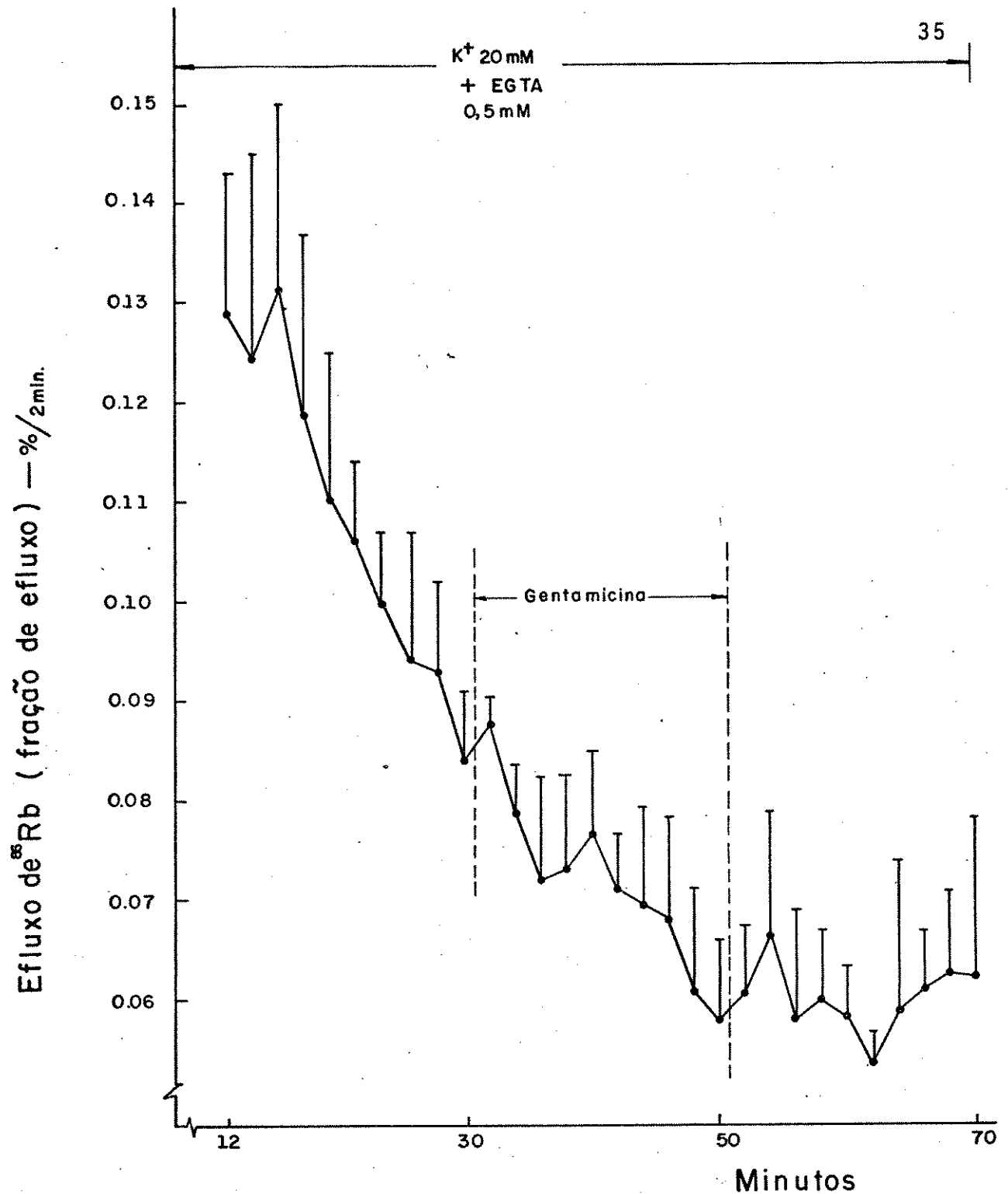


FIGURA 13 - Efeito da gentamicina (1 mM) sobre o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas perfundidas na ausência de Ca^{2+} e presença de 20 mM de K^+ . O meio foi ainda enriquecido com 0,5 mM de EGTA. As barras verticais tracejadas indicam o momento de introdução e retirada da gentamicina (1 mM) do meio perfusor. São indicadas as médias ($\pm$ erro padrão) $n = 4$.

DISCUSSÃO

A membrana plasmática separa concentrações assimétricas de Ca^{2+} , podendo este penetrar na célula através de canais de Ca^{2+} voltagem dependentes ou independentes, ou ainda pelos canais de Na^+ (DEAN & MATHEWS, 1970; MATTHEWS & SAKAMOTO, 1975 e MALAISSE e cols., 1978b). Os primeiros parecem ser mais universais do que os canais de Na^+ , sua existência constitui regra e não exceção, porém a razão destes serem menos conhecidos relaciona-se à dificuldade de se encontrar preparações adequadas para seu estudo. As evidências sugerem que os canais de Ca^{2+} são formados por uma estrutura única. Algumas membranas têm mais de um componente de corrente de Ca^{2+} , as quais diferem em quase todas as suas propriedades. Por exemplo, podemos encontrar na mesma membrana diferenças quanto à dependência à voltagem, cinética e afinidade a outros íons. Estes canais já foram descritos em inúmeros tipos celulares como músculo de invertebrados ou vertebrados, axônios ou corpos celulares de neurônios, terminais neurais, células secretoras, receptores, organismos unicelulares, células epiteliais, etc. Os canais de Ca^{2+} voltagem dependentes não são condutores do Ca^{2+} quando a membrana está polarizada e se abrem para permitir a entrada de Ca^{2+} durante a despolarização. Já os canais voltagem independentes se abrem pela interação de um agonista com seu receptor, sendo conhecido pelos farmacologistas como ROC (canal operado por receptor) (HAGIWARA, 1973; 1975; HAGIWARA & BYERLY, 1981; REUTER, 1973; BAKER & GLITSCH, 1975 e TSIEN, 1983).

Resultados recentes em nosso laboratório demonstraram que a sisomicina (BOSCHERO, DELATTRE & SANTOS, 1981) e a gentamicina (DELATTRE, SANTOS & BOSCHERO, 1982) inibiram a incorporação de ^{45}Ca e a secreção de insulina em ilhotas isoladas. Essa inibição foi dose-dependente e rapidamente revertida após a retirada da droga do meio perfusor.

Por outro lado, esses antibióticos não interferiram com outros parâmetros celulares, tais como: metabolismo da glicose, redução do efluxo do K^+ induzido pela glicose, secreção de insulina provocada pela combinação de Ba^{2+} e teofilina, ou pela combinação de glicose e altas concentrações de K^+ (BOSCHERO & DELATTRE, 1985).

Pelo exposto acima, concluiu-se que os antibióticos aminoglicosídicos testados, não interferem com os eventos iniciais (reconhecimento e metabolização da glicose) ou distais (ativação do sistema efetor) do processo secretório. As observações, de que gentamicina não inibiu a secreção de insulina na presença de glicose e altas concentrações de K^+ , e não inibiu a atividade elétrica induzida por glicose (A.A. GONÇALVES & A.C. BOSCHERO, comunicação pessoal) indicam que os mecanismos de inibição de entrada de Ca^{2+} nas células β , induzidas pela gentamicina, podem ser diferentes daqueles provocados por Co^{2+} , verapamil ou D600. Estes antagonistas inibem a entrada de Ca^{2+} através do bloqueio da permeabilidade voltagem sensível (DEVIS e cols., 1975; HENQUIN & LAMBERT, 1975 e ATWATER, 1980) além de terem ação intracelular (BAYER e cols., 1975 e CHURCH & ZSÖTER, 1980), o que não ocorre com a gentamicina, a qual por ser uma base catiônica não penetra na célula (WRIGHT & COLLIER, 1977).

Nesta série de experimentos utilizamos K^+ (20mM) que despolariza a membrana celular e abre os canais de Ca^{2+} voltagem dependentes, enquanto que arginina (10 mM) e glicose (concentrações até 8,3 mM) ativam preferencialmente os canais voltagem-independentes (LEBRUN, MALAISSE & HERCHUELZ, 1982 e HERCHUELZ e cols., 1984).

A inibição da incorporação de Ca^{2+} pela gentamicina foi muito maior (27,81% e 39,59%) quando as células foram estimuladas respectivamente pela glicose e arginina do que pelo K^+ (17,8%).

O tempo de incubação foi reduzido de 90 minutos (situação de equilíbrio) para 10 minutos (onde há predomínio do influxo). A mesma tendência da gentamicina em inibir preferencialmente a permeabilidade ao Ca^{2+} voltagem-independente (8,3 mM e arginina) foi observada também em 10 minutos.

Esse fato foi mais uma vez comprovado no terceiro protocolo, em que a redução de incorporação de ^{45}Ca por ilhotas estimuladas por K^+ (que ativa a permeabilidade voltagem-dependente) foi menor (20,61%) quando comparado com glicose 8,3 mM (34,01%).

O efeito da gentamicina parece ser dose-dependente, já que na concentração de 0,1 mM não inibiu de maneira significativa a incorporação de ^{45}Ca .

Observações recentes em nosso laboratório mostram que a droga na concentração de 5 mM ainda mostrou seletividade para a permeabilidade ao Ca^{2+} voltagem-independente (resultados não publicados).

O D600, por outro lado, não mostrou seletividade para essas permeabilidades na concentração de 5 μM , pois

os valores encontrados na inibição da incorporação de ^{45}Ca induzido por altas concentrações de K^+ e glicose 8,3 mM foram praticamente idênticos (46,68% e 47,93% respectivamente).

Numa segunda série de experimentos tentando obter novos subsídios para melhor compreender os efeitos da gentamicina sobre os canais de Ca^{2+} , analisamos o efluxo do ^{86}Rb (substituto do K^+) em diferentes condições experimentais. Inicialmente porque a retenção de K^+ pelas células β é fundamental para a despolarização celular e, consequentemente ativação da permeabilidade Ca^{2+} sensível à voltagem. Em segundo lugar, pela existência nas células β de uma permeabilidade ao K^+ , dependente da concentração citoplasmática de Ca^{2+} (ATWATER, 1980 e MARTY & NEHER, 1982). Assim, qualquer alteração dos fluxos de Ca^{2+} membranares poderia refletir alterações subsequentes da permeabilidade ao K^+ .

A introdução da gentamicina no meio perfusor não alterou a razão do efluxo do ^{86}Rb na ausência ou presença de 8,3 mM de glicose (figs. 9 e 10). Na ausência de glicose, a razão do efluxo encontra-se próximo a 5,5% por 2 minutos, e, a ausência do efeito do antibiótico poderia ser explicada pela pouca redução da incorporação de Ca^{2+} verificada nesta condição experimental (apenas 8,84%). A falta de efeito da gentamicina sobre o efluxo do ^{86}Rb na presença de 8,3 mM de glicose à primeira vista parece ser paradoxal uma vez que a redução da incorporação de Ca^{2+} nestas condições é significativa (aproximadamente 30% tanto após 10 quanto 90 minutos de incubação). No entanto, se houvesse alguma altera-

ção do efluxo, este deveria ser no sentido de redução, a exemplo do observado por LEBRUN, MALAISSE & HERCHUELZ (1981) para outros antagonistas de Ca^{2+} tais como verapamil e cobalto. Assim um possível efeito da gentamicina, ficou mascarado pela própria ação da glicose a qual sabidamente reduz o efluxo do ^{86}Rb em ilhotas isoladas (BOSCHERO & MALAISSE, 1979). A propósito, resultados recentes obtidos em nosso laboratório indicam que a gentamicina (2,5 e 10 mM) reduziu significativamente o efluxo do ^{86}Rb de ilhotas isoladas perfundidas na ausência de glicose. Finalmente essa nossa proposição é confirmada quando as ilhotas foram perfundidas na presença de 1 mM de gentamicina durante 72 minutos e 8,3 mM de glicose do 32º ao 52º minuto (figura 11), a qual mostra que o conhecido efeito redutor da permeabilidade do ^{86}Rb , provocado pela glicose, não foi alterado pela gentamicina. Indiretamente estes resultados indicam ainda, como já observado por BOSCHERO & DELATTRE (1985), que o referido antibiótico na concentração de 1 mM não interferiu no metabolismo celular da glicose.

Por outro lado a perfusão de ilhotas em presença de altas concentrações de K^+ (pela despolarização provocada) induziu um aumento significativo da taxa de efluxo do ^{86}Rb (fig. 12) quando comparado com o efluxo observado em concentração fisiológicas do K^+ (fig. 9), corroborando relato anterior de BOSCHERO & MALAISSE (1979).

Em presença de 20 mM de K^+ , a introdução de gentamicina no meio perfusor provocou uma ligeira redução na taxa de efluxo de ^{86}Rb . A ação da gentamicina sobre a permeabilidade ao K^+ parece ser decorrente do seu efeito blo -

queador da permeabilidade ao Ca^{2+} . Esta redução da taxa de efluxo, embora pequena, é concernente com a diminuição da incorporação de Ca^{2+} observada quando da incubação de ilhotas em presença de gentamicina e altas concentrações de K^+ . A retirada de Ca^{2+} do meio perfusor e a adição do quelante de Ca^{2+} EGTA (fig. 13) aboliu o efeito da gentamicina, evidenciando uma possível participação do Ca^{2+} , que penetra a célula pelo canal bloqueado pela gentamicina, sobre a permeabilidade do K^+ .

Concluindo, estes resultados confirmam as observações DELATTRE, SANTOS & BOSCHERO (1982), de que o efeito da gentamicina sobre a permeabilidade ao Ca^{2+} na membrana das células β se manifesta de maneira dose-dependente, mostrando ainda que nas concentrações utilizadas o bloqueio ocorre preferencialmente sobre a permeabilidade voltagem-independente.

RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da gentamicina sobre as diferentes permeabilidades do Ca^{2+} nas células β de ratos.

Dois métodos distintos foram empregados:

- 1 - Análise da incorporação do ^{45}Ca por ilhotas após 10 ou 90 minutos de incubação em diferentes situações experimentais.
- 2 - Análise do efluxo do ^{86}Rb de ilhotas previamente marcadas com o referido isótopo (substituto do ^{42}K) e perfundidas durante 72 minutos em diferentes condições experimentais.

A incorporação do ^{45}Ca foi inibida pela gentamicina (1 mM) com maior potência, quando estimulada por glicose ou arginina, quando comparada com altas concentrações de K^+ . Como a glicose (8,3 mM) e arginina (10 mM) estimulam a permeabilidade ao Ca^{2+} voltagem-insensível e altas concentrações de K^+ estimulam a permeabilidade voltagem-sensível, concluímos que nesta concentração a gentamicina age preferencialmente sobre a permeabilidade ao Ca^{2+} independente da voltagem tanto em 10 como 90 minutos de incubação. Na concentração de 0,1 mM não observamos efeito inibitório da gentamicina, indicando que a manifestação desse efeito seja dose-dependente.

O D600 não manifestou seletividade por nenhum dos tipos de permeabilidade, inibindo de maneira semelhante a incorporação de ^{45}Ca induzida tanto por altas concentrações de K^+ , quanto por glicose.

Considerando, por um lado, que a retenção do K^+ pelas células β e, a consequente despolarização celular, é fundamental para ativação de uma permeabilidade ao Ca^{2+} -sensível à voltagem e, considerando também a existência nas células β de uma permeabilidade ao K^+ -dependente da concentração citosólica de Ca^{2+} , entendemos de essencial importância estudar o efluxo do ^{86}Rb (traçador do K^+) de ilhotas isoladas nas condições experimentais empregadas neste trabalho. Logicamente qualquer alteração dos fluxos membranares de Ca^{2+} poderia refletir as alterações subsequentes da permeabilidade ao K^+ .

Gentamicina não alterou o efluxo do ^{86}Rb na presença ou ausência de 8,3 mM de glicose e nem alterou o efeito da glicose em reduzir o efluxo de ^{86}Rb , indicando que gentamicina não interfere no metabolismo da glicose.

Por outro lado, quando as ilhotas foram perfundidas com $K^+ 20mM$, a introdução da gentamicina no meio perfusor provocou ligeira redução da taxa de efluxo. Na ausência de Ca^{2+} no meio perfusor esse efeito não foi observado demonstrando uma possível participação do Ca^{2+} proveniente do meio extracelular sobre a permeabilidade do K^+ .

Os resultados obtidos permitem-nos concluir que:

- 1 - Gentamicina (1 mM) reduziu de maneira mais efetiva a incorporação de ^{45}Ca em situações experimentais (8,3 mM de glicose e arginina) onde predomine a permeabilidade ao Ca^{2+} voltagem insensível.
- 2 - A ausência do efeito da gentamicina sobre o efluxo do ^{86}Rb quando da perfusão em presença de 20 mM de K^+ , EGTA e ausência de Ca^{2+} indica uma participação impor-

tante do Ca^{2+} oriundo do líquido extracelular sobre a permeabilidade do $\text{K}^+-\text{Ca}^{2+}$ dependente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, H.R. Cardiovascular depressant effects of neomycin and gentamicin in rhesus monkeys. *Brit. J. Pharmacol.*, 54:453-62, 1975a.
- ADAMS, H.R. Cardiovascular depressant effects of the neomycin-streptomycin group of antibiotic. *Amer. J. vet. Res.*, 36:103-8, 1975b.
- ADAMS, H.R. Antibiotic-induced alterations of cardiovascular reactivity. *Fed. Proc.*, 35:1148-50, 1976.
- ADAMS, H.R. & GOODMAN, F.R. Differential inhibitory effect of neomycin on contractile responses of various canine arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 193:393-402, 1975.
- ADAMS, H.R. & DURRET, L.R. Gentamicin blockade of slow Ca^{++} channels in atrial myocardium of guinea pigs. *J. clin. Invest.*, 62:241-7, 1978.
- ALKADHI, K.A. & McISSAC, R.J. Ganglionic blocking effects of streptomycin. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 232:58-67, 1978.
- ALTINKURT, O. & KANZIK, I. Inhibitory effects of streptomycin on bronchoconstrictor, hypotensive and inflammatory responses to bradykinin and histamine. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 246:277-85, 1980.

ATWATER, I. Control mechanism for glucose induced changes in the membrane potential of mouse pancreatic β -cell.

Cienc. Biol., Portugal, 5:299-314, 1980.

ATWATER, I.; DAWSON, C.; EDDLESTONE, J.T. & ROJAS, E.

Voltage noise measurements across the pancreatic β - cell membrane: calcium characteristics. *J. Physiol.*, 314: 195-212, 1981.

BAKER, P.F.; GLITSCH, H.G. Voltage-dependent changes in the permeability of nerve membranes to calcium and other divalent cations. *Physiol. Trans. R. Soc.* London , B270:389-409, 1975.

BAYER, R.; HENNEKES, R.; KAUFMANN, R. & MANHOLD, R. Inotropic and electrophysiological actions of verapamil and D600 in mammalian myocardium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 290:49-68, 1975.

BEIGELMAN, P.M.; RIBALET, B. & ATWATER, I. Electrical activity of mouse pancreatic beta cells. II. Effects of glucose and arginine. *J. Physiol.*, Paris, 73:201-17 , 1977.

BENZI, G.; ARRIGONI, E.; MANZO, L. & DE BERNARDI, M. Action of antibiotics on respiratory tract - VII: Aminocyclitol. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 194:-233-7, 1971.

- BLOOM, G.D.; HELLMAN, B.; SEHLIN, J. & TÄLJEDAL, I.B. Glucose-stimulated and La^{3+} -nondisplaceable Ca^{++} pool in pancreatic islets. *Amer. J. Physiol.*, 232:E114-E118, 1977.
- BOSCHERO, A.C. & MALAISSE, W.J. Effect of glucose, theophylline, Ca^{2+} and Ba^{2+} upon $^{86}\text{Rb}^{+}$ efflux from pancreatic islets. *Proc. Intern. Union Physiol. Sci.*, (Paris), 13:89p, 1977.
- BOSCHERO, A.C. & 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:E139-46, 1979.
- BOSCHERO, A.C. & DELATTRE, E. The mechanism of gentamicin-inhibited insulin release by isolated islets. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 273:167-76, 1985.
- BOSCHERO, A.C.; DELATTRE, E. & SANTOS, M.L. Isolamento de ilhotas de Langerhans de rato. XXII Congresso Brasileiro de Fisiologia, Ribeirão Preto, 1980.
- BOSCHERO, A.C.; DELATTRE, E. & SANTOS, M.L. Inhibition of insulin release by aminoglycoside antibiotic sisomicin. *Horm. Metab. Res.*, 13:531-2, 1981.
- BOSCHERO, A.C.; KAWAZU, S.; DUNCAN, G. & MALAISSE, W.J. Effect of glucose on K^{+} handling by pancreatic islets. *FEBS Letters*, 83:151-4, 1977.

CARPINELLI, A. & MALAISSE, W.J. Regulation of ^{86}Rb outflow from pancreatic islets. I. Reciprocal changes in the response to glucose, tetraethylammonium and quinine. *Mol. and Cell. Endocrinol.*, 17:103-10, 1980a.

CARPINELLI, A. & MALAISSE, W.J. Regulation of ^{86}Rb outflow from pancreatic islets. III. Possible significance of ATP. *J. Endocrinol. Invest.*, 4:365-70, 1980b.

CHARLES, S.; TAMAGAWA, T. & HENQUIM, J.C. A single mechanism for the stimulation of insulin release and ^{86}Rb efflux from rat islets by cationic amino acids. *Biochem. J.*, 208:301-8, 1982.

CHURCH, J. & ZSOTER, T.T. Calcium antagonistic drugs. Mechanism of action. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, 58: 254-64, 1980.

COOK, D.L. & HALES, N. Intracellular ATP directly blocks K^+ channel in pancreatic β -cell. *Nature*, 311: 271-3, 1984.

CORRADO, A.P. Ganglioplegic action of streptomycin. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 114:166-78, 1958.

CORRADO, A.P. Respiratory depression due to antibiotics: calcium in treatment. *Anesth. analog. Curr. Res.*, 42: 1-5, 1963.

CORRADO, A.P. & RAMOS, A.O. Neomycin - its curariform and ganglioplegic actions. *Rev. bras. Biol.*, 18:81-5, 1958.

CORRADO, A.P. & RAMOS, A.O. Some pharmacological aspects of a new antibiotic-kanamycin. *Rev. bras. Biol.*, 20:43 - 50, 1960.

CORRADO, A.P.; RAMOS, A.O. & DE ESCOBAR, C.T. Neuro-muscular blockade by neomycin potentiation by ether anesthesia and d-tubocurarine and antagonism by calcium and prostigmine. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 121:380-94, 1959.

CORRADO, A.P.; PRADO, W.A. & PIMENTA DE MORAES, I. Competitive antagonism between calcium and aminoglycoside antibiotics in skeletal and smooth muscles. In: ROCHA E SILVA, M. & SUAREZ KURTZ, G. *Concepts of membranes in regulation and excitation*. New York, Raven Press, 1975. p. 201-15.

CURRY, D.L.; BENNETT, L.L. & GRODSKY, G.M. Requirement for calcium ion in insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Am. J. Physiol.*, 214:174-8, 1968.

DEAN, P.M. & MATTHEWS, E.K. Electrical activity in pancreatic islets cells: effect of ions. *J. Physiol.*, 210: 265-75, 1970.

DELATTRE, E. Efeito de antibióticos aminoglicosídicos da família da gentamicina sobre a secreção de insulina. Tese de Mestrado - Instituto de Biologia, UNICAMP, 1981.

- DELATTRE, E.; SANTOS, M.L. & BOSCHERO, A.C. Effect of gentamycin on insulin release and ^{45}Ca net uptake by isolated islets. *Experientia*, 38:1320-1, 1982.
- DEVIS, G.; SOMERS, G.; VAN OBBERGHEN, E. & MALAISSE, W.J. Calcium antagonists and islets function. I. Inhibition of insulin release by verapamil. *Diabetes*, 24:547-51, 1975.
- DIECKE, F.P.J.; WESTECKER, M.E. & VOGT, R. The effect of streptomycin on sodium and potassium currents in myelinated nerve. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 193:5-13, 1971.
- DOUGLAS, W.W. & RUBIN, R.P. The role of calcium in the secondary response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J. Physiol.*, London, 159:40-57, 1961.
- DUNKLEY, B.; SANGHVI, I. & GOLDSTEIN, G. Characterization of neuromuscular block produced by streptomycin. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 201:213-23, 1973.
- DŽOLJIĆ, M. & ATANACKOVIĆ, D. Action of streptomycin on guinea pig ileum peristalsis. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 156:279-84, 1965.
- ELMQVIST, D. & JOSEFSSON, J.O. The nature of the neuromuscular block produced by neomycine. *Acta Physiol. Scand.*, 54:105-10, 1962.

FAJANS, S.S.; CHRISTENSEN, H.N.; FLOYD, Jr. J.C. & PEK, S.
Stimulation of insulin and glucagon release in the dog
by a nonmetabolizable arginine analog. *Endocrinology* ,
94:230-3, 1974.

FINDLAY, I. & DUNNE, M. Voltage-activated Ca^{2+} currents
in insulin secreting cells. *FEBS Letters*, 189:281-5 ,
1985.

GOODMAN, F.R. & ADAMS, H.R. Contractile function and ^{45}Ca
movements in vascular smooth muscle of nonhuman prima
tes: effects of aminoglycoside antibiotics. *Gen. Phar-*
macol., 7:227-32, 1976.

GOODMAN, F.R.; WEISS, G.B. & ADAMS, H.R. Alterations by
neomycin of ^{45}Ca movements and contractile responses in
vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 188:
472-80, 1974.

GRODSKY, G.M. & BENNETT, L.L. Cation requirements for in-
sulin secretion in the isolated perfused pancreas. *Dia-*
betes, 15:910-3, 1966.

HAGIWARA, S. Ca^{2+} spike. *Adv. Biophys.*, 4:71-102, 1973.

HAGIWARA, S. Ca^{2+} -dependent action potential. In *Membra-*
nes, A series of advances, Vol. 3, ed. G. Eisenman ,
3:359-81. New York: Dekker, 1975.

HAGIWARA, S.; BYERLY, L. Calcium channel. *Ann. Rev. Neurosci.*, 4:69-125, 1981.

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

HAWKINS, Jr. J.E. In Biochemical Mechanisms in Hearing and Deafness. Paparella, M.M. ed., pp. 323-339, C.C. Thomas, Springfield, Ill., 1970.

HELLMAN, B.; LENZEN, S.; SEHLIN, J. & TÄLJEDAL, I-B. Effects of various modifiers of insulin release on the lanthanum-nondisplaceable $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by isolated pancreatic islets. *Diabetologia*, 13:49-53, 1977.

HELLMAN, B.; ANDERSSON, T.; BERGGREN, P.O.; FLATT, P., GYLFE, E. & KOHNERT, K.D. The role of calcium in insulin secretion. In hormones and cell regulation, edited by J. Dumont and J. Nunez, Amsterdam: Elsevier, Vol. 3, pp. 69-97, 1979.

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

HENQUIN, J.-C. & LAMBERT, A.E. Cobalt inhibition of insulin secretion and calcium uptake by isolated rat islets. *Am. J. Physiol.*, 228:1669-77, 1975.

- HENQUIN, J.-C. & MEISSNER, H.P. Effects of aminoacids on membrane potencial and ^{86}Rb fluxes in pancreatic β -cells. *Am. J. Physiol.*, 240:E245-E252, 1981.
- HENQUIN, J.-C. & MEISSNER, H.P. Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-se_{cre}tion coupling in pancreatic β -cell. *Experientia*, 40: 1043-52, 1984.
- HERCHUELZ, A. & MALAISSE, W.J. Regulation of calcium fluxes in rat pancreatic islets: dissimilar effects of glucose and of sodium ion accumulation. *J. Physiol.*, 302: 263-80, 1980.
- HERCHUELZ, A. & MALAISSE, W.J. Regulation of calcium-fluxes in rat pancreatic islets: calcium extrusion by sodium calcium countertransport. *J. Membr. Biol.*, 57: 1-12, 1980.
- HERCHUELZ, A.; LEBRUN, P.; BOSCHERO, A.C. & MALAISSE, W.J. Mechanism of arginine-stimulated Ca^{2+} influx into the pancreatic β -cell. *Am. J. Physiol.*, 246:E38-E43, 1984.
- HORI, R.; YAMAMOTO, K.; SAITO, H.; KOHNO, M. & INUI, K.I. Effect of aminoglycosidic antibiotics on cellular functions of kidney epithelial cell line. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 230:742-5, 1984.
- HOWELL, J.L. & TYHURST, M. Insulin secretion: the effector system. *Experientia*, 40:1098-105, 1984.

JONES, W.P.G. Calcium treatment for ineffective respiration resulting from administration of neomycin. *J.A.M.A.*, 170:943-4, 1959.

KIKUCHI, M.; WOLLEIM, C.B.; CUENDET, G.S.; RENOLD, A.E. & SHARP, G.W.G. Studies on the dual effects of glucose on $^{45}\text{Ca}^{++}$ efflux from isolated rat islets. *Endocrinology*, 102:1339-49, 1978.

KOHLHEPP, S.J.; PLANT, S.B.; Mc.CARRON, D.A. & GILBERT, D. N. Gentamicin does not chelate calcium. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 21:668-9, 1982.

LACY, P.E. & KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, 16:35-9, 1967.

LAMBERT, A.E.; JEANRENAUD, B.; JUNOD, A. & RENOLD, A.E. Organ culture of fetal rat pancreas. II. Insulin release induced by amino and organic acids, by hormonal peptides, by cationic alterations of the medium and by other agents. *Biochem. Biophys. Acta*, 184:540-53, 1969.

LEADERS, F.; PITTINGER, C.B. & LONG, J.P. Some pharmacological properties of selected antibiotics. *Antibiotic. & Chemother.*, 10:503-7, 1960.

LEBRUN, P.; MALAISSE, W.J. & HERCHUELZ, A. Effect of calcium antagonists on potassium conductance in islet cells. *Biochem. Pharmacol.*, 30:3291-94, 1981.

LEBRUN, P.; MALAISSE, E.J. & HERCHUELZ, A. Evidence for two modalities of Ca^{2+} influx into the pancreatic β -cell. *Am. J. Physiol.*, 242:E59-E66, 1982.

LECLERQ-MEYER, J.; MARCHAND, J. & MALAISSE, W.J. The role of calcium in glucagon release. Interactions between arginine and calcium. *Horm. Res.*, 7:348-62, 1976.

LEE, C. & DE SILVA, A.J.C. Acute and subchronic neuromuscular blocking characteristics of streptomycin: a comparison with neomycin. *Brit. J. Anaesth.*, 51:431-4, 1979.

MALAISSE, W.J. Stimulus-secretion coupling in the pancreatic β -cell: introductory remarks. *Experientia*, 40: 1025-6, 1984a.

MALAISSE, W.J. Role of calcium in the regulation of hormonal secretion. *Horm. Res.*, 20:28-37, 1984b.

MALAISSE, W.J.; SENER, A.; KOSER, M. & HERCHUELZ, A. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release-Metabolism of α -and β -D-glucose in isolated islets. *J. biol. Chem.*, 251:5936-43, 1976.

MALAISSE, W.J.; SENER, A.; HERCHUELZ, A. & HUTTON, J.C. Insulin release: the fuel hypothesis. *Metabolism*, 28: 373-86, 1979.

MALAISSSE, W.J.; HUTTON, J.C.; CARPINELLI, A.R.; HERCHUELZ, A. & SENER, A. The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release. Metabolism and cationic effects of leucine. *Diabetes*, 29:431-7, 1980.

MALAISSSE, W.J.; HUTTON, J.C.; SENER, A.; LEVY, J.; HERCHUELZ, A.; DEVIS, G. & SOMERS, G. Calcium antagonists and islets function: VII. Effect of calcium deprivation. *J. Membrane Biol.*, 38:193-208, 1978a.

MALAISSSE, W.J.; HERCHUELZ, A.; DEVIS, G.; SOMERS, G.; BOSCHERO, A.C.; HUTTON, J.C.; KAWAZU, S.; ATWATER, I.J.; DUNCAN, G.; RIBALET, B. & ROJAS, E. Regulation of calcium fluxes and their regulatory roles in pancreatic islets. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 307:562-82, 1978b.

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

MALAISSSE-LAGAE, F.; BRISSON, G.R. & MALAISSSE, W.J. The stimulus secretion coupling of glucose induced insulin release. VI. Analogy between the insulinotropic mechanism of sugars and aminoacids. *Horm. Metab. Res.*, 3: 374-8, 1971.

MARTY, A. & NEHER, E. Ionic channels in cultured rat pancreatic islet cells. *J. Physiol.*, 326:36-7, 1982.

- MATSCHINSKY, F.M.; ELLERMAN, J.E.; KRZANOWSKI, J.; KOTLER-BRAJT-BURG, J.; LANDGRAF, R. & FERTEL, R. The dual function of glucose in islets of Langerhans. *J. biol. Chem.*, 246:1007-11, 1971.
- MATTEWS, E.K.; SAKAMOTO, Y. Electrical characteristics of pancreatic islet cells. *J. Physiol.*, London, 246:421 - 37, 1975.
- MEISHERI, K.D.; HWANG, O. & van BREEMEN. Evidence for two separate Ca^{2+} pathways in smooth muscle plasmalemma. *J. Membr. Biol.*, 59:19-25, 1981.
- MILNER, R.D.G. Stimulation of insulin secretion "in vitro" by essential amino-acids. *Lancet.*, 1:1075-6, 1969.
- MOSKALEWSKI, S. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen. Comparat. Endocrinol.*, 5:342-53, 1965.
- MULLET, R.D. & KEATS, A.S. Apnea and respiratory insufficiency after intraperitoneal administration of kanamycin. *Surgery*, 49:530-3, 1961.
- PAYET, M.D.; BKAILY, G.; SCHANNE, O.F. & RUIZ-CERETTI, E. Influence of streptomycin on spontaneous activity of clusters of cultures cardiac cells from neonatal rats. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, 58:433-5, 1980.

PICCININI, F.; FAVALLI, L. CHIARI, M.C. & CORRADO, A.P.

Interferência induzida por antibióticos aminoglicosídi -
cos-aminociclitólicos no transporte iônico em modelos de
membrana. *Ciênc. e Cult.* 25(Supl.):493, 1973. (Abs-
tract).

PIMENTA DE MORAES, I.; CORRADO, A.P. & SUAREZ-KURTZ, G. Com -
petitive antagonism between calcium and aminoglycoside an -
tibiotics on guinea-pig intestinal smooth muscle. *Arch.*
int. Pharmacodyn., 231:317-27, 1978.

PIPELLERS, D.G. Islet cell interactions pancreatic β -cell.
Experientia, 40:1114-25, 1984.

PIPELLERS, D.G.; MARICHAL, M. & MALAISSE, W.J. The stimu -
lus-secretion coupling of glucose-induced insulin relea -
se. XV. Participation of cations in the recognition of
glucose by the β -cell. *Endocrinology*, 93:1012-8, 1973.

PITTINGER, C. & ADAMSON, R. Antibiotic blockade of neuro -
muscular function. *Ann. Rev. Pharmacol.*, 12:169-84 ,
1972.

PITTINGER, C.; ERYASA, Y. & ADAMSON, R. Antibiotic-indu -
ced paralysis. *Anesth. Analg.*, 49:487-501, 1970.

PRENTKI, M. & WOLLHEIM, C.B. Cytosolic free Ca^{2+} in insu -
lin secreting cells and its regulation by isolated organe -
les. *Experientia*, 40:1052-60, 1984.

- PRIDGEN, J.E. Respiratory arrest thought to be due to intraperitoneal neomycin. *Surgery*, 40:571-4, 1956.
- RASMUSSEN, H. & GOODMAN, D.P.B. Relationship between calcium and cyclic nucleotides in cell activation. *Physiol. Rev.*, 57:421-509, 1977.
- RAVAZZOLA, M.; MALAISSE-LAGAE, F.; AMHERDT, M.; PERRELET, A.; MALAISSE, W.J. & ORCI, L. Patterns of calcium localization in pancreatic endocrine cells. *J. Cell. Sci.*, 27: 107-17, 1976.
- REUTER, H. Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 26:1-43, 1973.
- RIBES, G.; SIEGEL, E.G.; WOLLHEIN, C.B.; RENOLD, A.E. & SHARP, G.W.G. Rapid changes in calcium content of rat pancreatic islets in response to glucose. *Diabetes*, 30: 52-5, 1981.
- RINEHART, K.L. The neomycins and related antibiotics. N. Y.: Willy, 137pp., 1964.
- RUBIN, R.P. The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones. *Pharmacol. Rev.*, 22:389-428, 1970.
- SANDE, M.A. & MANDELL, G.L. Antimicrobial Agents - The aminoglycosides. In: GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S. &

- GILMAN, A. *The pharmacological basis of therapeutics*. New York, Macmillan, 1980. p. 1162-79.
- SEHLIN, J. & TÄLJEDAL, I.-B. Transport of rubidium and sodium in pancreatic islets. *J. Physiol.*, 242:505-15, 1974.
- SEHLIN, J. & TÄLJEDAL, I.-B. Glucose-induced decrease in Rb^+ permeability in pancreatic β -cells. *Nature*, 253:635-6, 1975.
- SENER, A. & MALAISSE, W.J. Nutrient metabolism in islet cells. *Experientia*, 40:1026-35, 1984.
- STIEVE, H. & HARTUNG, K. Kinetics of $^{42}\text{K}^+$ and $^{86}\text{Rb}^+$ loss from the crayfish retina in the dark and the effect of light on the rate of isotope loss. *Biochem. Biophys. Acta*, 465:643-9, 1977.
- SUAREZ-KURTZ, G. Inhibition of membrane calcium activation by neomycin and streptomycin in crab muscle fibers. *Pflüg. Arch.*, 349:337-49, 1974.
- SWAIN, H.H.; KIPLINGER, G.F. & BRODY, T.M. Actions of certain antibiotics on the isolated dog heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 117:151-9, 1956.
- TSIEN, R.W. Calcium channels in excitable cell membranes. *Ann. Rev. Physiol.*, 45:341-58, 1983.

VITAL BRAZIL, O. & CORRADO, A.P. The curariform action of streptomycin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 120:452-9, 1957.

VITAL BRAZIL, O. & PRADO-FRANCESCHI, J. The neuromuscular blocking action of gentamicin. *Arch. int. Pharmacodyn*, 179:65-77, 1969a.

VITAL BRAZIL, O. & PRADO-FRANCESCHI, J. The nature of neuromuscular block produced by neomycin and gentamicin. *Arch. int. Pharmacodyn*, 179:78-85, 1969b.

WEISS, G.B.; GOODMAN, F.R. & ADAMS, H.R. Alteration by neomycin of ^{45}Ca distribution and of contractile responses in rabbit aortic smooth muscle. *Fed. Proc.*, 22:767, 1973. (Abstract).

WOLF, G.L. & WIGTON, R.S. Vasodilatation induced by streptomycin in the perfused canine kidney. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 194:285-9, 1971.

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

WRIGHT, J.M. & COLLIER, B. The effects of neomycin upon transmitter release and action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 200:576-87, 1977.