

EVERARDO MAGALHÃES CARNEIRO

Este exemplar corresponde à edição final da tese defendida pelo candidato Everardo de Magalhães Carneiro e aprovada pela comissão julgadora -

Cpnos 18/12/89

Bonheur

PERMEABILIDADE AO POTÁSSIO [CÁLCIO INTRACELULAR-DEPENDENTE]
NAS CÉLULAS BETA DE PÂNCREAS DE RATO. EFEITO DA GENTAMICINA.

Tese submetida ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas, para a obtenção do
grau de Mestre em Biologia, na
área de Fisiologia

CAMPINAS - SÃO PAULO

1989

À CAUSA DA MULHER,

DO NEGRO E

DO ÍNDIO,

DEDICO.

ORIENTADOR

PROF. DR. ANTONIO CARLOS BOSCHERO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, "por tudo".

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero pelo grande ser humano que é, e sem o qual não seria possível executar este trabalho.

À Prof^{ma}. Angelina Zanesco por sua batalha em introduzir-me no mundo da ciência.

À Oneida Dias de Carvalho pelos incentivos constantes.

Ao Prof. Eduardo Kokubun pela orientação prestada quanto aos métodos estatísticos.

À Mara, Andréia e Lécio, amigos do cotidiano.

A todos os colegas da pós graduação que de uma forma ou de outra contribuíram para a minha formação.

A todos os professores que, participaram de minha formação passando um pouco de sua experiências.

À minha namorada, Maristela Zocca, pela paciência e préstimos nos momentos difíceis.

Ao Dr. Gilberto D'Assunção Fernandes, Dr. Ari Gonçalves, Dra. Ilani Atwater e ao Dr. Nelson Duran por cederem seus laboratórios para a realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Sérgio De Moraes pela sua colaboração e presteza.

Ao Prof. Mauro F. Patrocínio, pela revisão do texto.

Aos datilógrafos Angelina Zanesco, Maristela Zocca e Antonio Carlos Bento, pelos seus préstimos.

Ao Departamento de Educação Física do Instituto de Biociências e à Reitoria da UNESP pelo apoio e compreensão durante o período de afastamento para execução da tese.

Aos órgãos financiadores FAPESP, CNPq e CAPES sem os quais não teríamos tido condições materiais para a realização deste trabalho.

OBRIGADO.

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1. Canais de Potássio.	3
1.1.1. Canais de cátions dependentes de cálcio (não seletivos ao potássio).	4
1.1.2. Canais de potássio de alta condutância (cálcio dependentes).	5
1.1.3. Canais de potássio modulado pelo ATP.	6
1.2. Glicoconjugados e resíduos de ácido siálico.	8
1.3. Antagonistas de cálcio.	9
1.4. Proposta do trabalho.	14
2 - MATERIAL E MÉTODOS	
2.1. Animais.	15
2.2. Técnica de isolamento das ilhotas de Langerhans de ratos.	15
2.3. Efluxo de Rubídio.	16
2.4. Tratamento estatístico.	19
2.5. Radioisótopos e reagentes.	20
2.6. Soluções.	21
3 - RESULTADOS	
3.1. Efeito da gentamicina sobre o fluxo de rubídio na ausência e na presença de glicose.	23
3.2. Efeito da gentamicina sobre o fluxo de rubídio em diferentes concentrações de cálcio.	24
3.3. Efeito da teofilina, na ausência e na presença de	

gentamicina sobre o fluxo do rubídio.

25

3.4. Efeito da gentamicina na presença de neuroaminidase
sobre o fluxo do rubídio.

26

4 - DISCUSSÃO

36

5 - RESUMO E CONCLUSÕES

44

6 - RESUMO EM INGLÊS

46

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

48

1 - INTRODUÇÃO

Sabe-se, há mais de 20 anos, que os íons desempenham papel importante no estímulo-secreção das células beta pancreáticas. Sua importância foi primeiramente demonstrada pela influência dos cátions extracelulares na liberação de insulina (Grodsky e Bennett, 1968), pelo efeito da glicose na retenção do K^+ em ilhotas de Langerhans (Sehlin e Taljedal, 1975), e pelo aparecimento de atividade elétrica em células beta, estimuladas por secretagogos de insulina (Dean e Mathews, 1968).

Mais recentemente, tem aparecido na literatura uma série de trabalhos dando ênfase ao estudo da permeabilidade ao K^+ em membranas de células beta. Sehlin e Taljedal (1975) registraram, pela primeira vez, um acúmulo de $^{86}Rb^+$ (usado como traçador de K^+) quando o meio continha 3 ou 20 mM de glicose. Esses resultados foram definitivamente comprovados por Boschero e Malaisse (1977) e Henquin (1978). Essa retenção do K^+ , induzida pela glicose, contribui para a despolarização celular, fenômeno fundamental para o processo secretório (Sehlin e Taljedal, 1975).

A despolarização de membrana, provocada pela retenção do K^+ , promove uma atividade elétrica típica (Dean, Mathews e Sakamoto, 1975; Meissner e Atwater 1976; Meissner e Schmelz, 1974). Esta atividade caracteriza-se por

um padrão bifásico (Meissner e Atwater, 1976), com a primeira fase correspondendo a uma longa despolarização, sobreposta por "spikes" contínuos, seguida por uma repolarização parcial. A essa repolarização segue-se uma fase de ondas lentas. Cada uma das ondas apresenta uma despolarização rápida, seguida de um platô, depois do qual ocorre a repolarização lenta. Durante o referido platô ocorre atividade em "spikes".

Essas ondas lentas têm sido registradas quando a célula beta é estimulada por glicose e também por outros secretagogos, tais como: gliceraldeído (Dean, Mathews e Sakamoto, 1975), leucina (Henquin e Meissner, 1981), fenilpiruvato (Meissner e Henquin, 1982), ou ainda por baixas concentrações de tolbutamida (Henquin e Meissner, 1982). Para que esses secretagogos (em especial a glicose) induzam atividade elétrica em células beta é preciso que, com exceção da tolbutamida, os mesmos sejam metabolizados pela célula, induzindo redução na taxa de efluxo do K^+ e consequente despolarização celular (Henquin, 1978; Boscher e Malaisse, 1979; Henquin, Meissner e Preissler, 1979; Dean, Mathews e Sakamoto, 1975).

Uma vez que a metabolização dos substratos é necessária para provocar secreção de insulina, é lógico pensar que um ou mais metabólitos estejam relacionados com o processo secretório. Assim, a retenção do K^+ , que induz despolarização celular, foi imputada por diferentes pesquisadores ao aumento da relação $NADP/NADP(H)$, aumento da

concentração de H^+ e, mais recentemente pela variação da razão ATP/ADP (Henquin, 1980; Lebrun, Malaisse e Herchuelz, 1983; Malaisse e Herchuelz, 1982; Pace, Trauin e Smith, 1983; Kakei, Kelly, Ashcroft e Ashcroft, 1986; Dunne e Petersen, 1986; Troube, Rorsman e Shosaku, 1986).

1.1. CANAIS DE POTÁSSIO

Devido à importância do K^+ no processo secretório, foi dado ênfase ao estudo da permeabilidade desse íon nas células beta. Atualmente conhecemos três diferentes classes de canais de K^+ em células beta, a saber: a) um canal de cátion não seletivo dependente de Ca^{+2} , (Sturgess, Hales e Ashford, 1986), encontrado também em células cardíacas de rato e em neuroblastoma de camundongo (Colquhoun, Neher, Reuter e Stevens, 1981; Yellen, 1982); b) um canal de K^+ dependente de Ca^{+2} (Cook, Ikeuchi e Fujimoto, 1984; Findlay, Dunne e Petersen, 1985), o qual também foi registrado em células cromafins da adrenal (Marty, 1981), células musculares esqueléticas de rato (Barret, Magleby e Pallotta, 1982); em células acinares exócrinas (Trautman e Marty, 1984), e células renais (Hunter, Lopes, Boulpaep e Giebisch, 1984); c) um canal de potássio ATP dependente (Cook e Hales, 1984; Sturgess, Ashford, Carrington e Hales, 1986; Dunne, Findlay, Petersen e Wollheim, 1986), encontrados também em outros tecidos tais como: músculo cardíaco (Noma, 1983),

nódulo átrio ventricular de coelho (Kakei e Noma, 1984), músculo esquelético de sapo (Spruce, Standen e Stanfield, 1985).

1.1.1. CANAIS DE CÁTIONS DEPENDENTES DE Ca^{+2} NÃO SELETIVO AO K^{+}

Canaís de cátions não seletivos, dependentes de Ca^{+2} foram descritos inicialmente por Colquhoun, Neher, Reuter e Stevens (1981) em células cardíacas de ratos mantidas em cultura. Sua abertura e seu fechamento são independentes do potencial de membrana e não mostram seletividade nem ao Na^{+} nem ao K^{+} . Estes canais são específicos para cátions necessitando de íons Ca^{+2} para sua abertura.

Confirmando esses achados, Marty, Tan e Trautmann (1984) demonstraram que a ativação destes canais somente ocorre quando a concentração interna de Ca^{+2} atinge valores maiores que 1 mM. Já em linhagem de células secretoras de insulina (CRI-G1), esses canais apresentam uma condutância de 25 pS, sendo igualmente ativados pelo Ca^{+2} intracelular, e sendo permeáveis tanto ao Na^{+} quanto ao K^{+} (Ashford, Hales e Sturgess, 1986a).

Outra característica interessante encontrada para esses canais na célula beta é a modulação da sua cinética exercida pelo ATP, ADP e AMP, quando colocados na superfície

citoplasmática da membrana celular (Ashford, Hales e Sturgess, 1986b; Sturgess, Hales e Ashford, 1986).

1.1.2. CANAIS DE POTÁSSIO DE ALTA CONDUTÂNCIA (Ca^{+2} -DEPENDENTES)

Os canais de K^{+} de alta condutância, alvo principal da nossa atenção neste trabalho, foram descritos pela primeira vez em células beta pancreáticas por Cook, Ikeuchi e Fujimoto (1984); e também por Findlay, Dunne e Petersen (1985). Observações semelhantes haviam sido feitas anteriormente em células cromafins, musculares e epiteliais (Marty, 1981; Barnett, Magleby e Pallotta, 1982; Maruyama, Gallacher e Petersen, 1983).

Em células secretoras de insulina, esses canais apresentam uma condutância de 220 pS, muito aproximada daquela registrada em outros tipos celulares (Lattore e Miller, 1983; Petersen e Maruyama, 1984). Canais de K^{+} de alta condutância desempenham papel fundamental no mecanismo secretório (Atwater, Frankel, Rojas e Grodsky, 1983), uma vez que sua ativação ou inativação depende não só do nível do potencial de membrana, como também da concentração citoplasmática de Ca^{+2} .

A ativação dos canais de K^{+} de alta condutância dependentes de Ca^{+2} leva à repolarização celular, que, em última análise, funciona como um mecanismo de "feedback" no controle da concentração citoplasmática de Ca^{+2} . Além do

controle sobre esses canais exercido pela concentração citoplasmática de Ca^{+2} , os mesmos podem ser ainda controlados pelo potencial de membrana, bem como modulados pela concentração externa de glicose e/ou por drogas específicas, tais como a tetraetilamônio (Iwatsuki e Petersen, 1985).

1.1.3. CANAIS DE POTÁSSIO MODULADOS PELO ATP

Os canais de K^{+} , modulados por ATP intracelular, foram reconhecidos pela primeira vez em células cardíacas (Noma, 1983), e, posteriormente, em cultura de células de ilhotas pancreáticas, de ratos recém-nascidos (Cook e Hales, 1984). Nas células secretoras de insulina, esses canais desempenham papel importante no acoplamento estímulo-secreção. (Ashcroft, Harrison e Ashcroft, 1984; Dunne, Findlay, Petersen e Wollheim, 1986).

Estudos mais recentes em ilhotas pancreáticas têm contribuído muito para o conhecimento do canal de K^{+} , modulados pelo ATP. Tais estudos têm revelado que esses canais constituem o principal determinante do potencial de repouso da membrana na ausência de secretagogos (Ashcroft, Harrison e Ashcroft, 1984; Rorsman e Trube, 1985).

Sturgess, Ashford, Carrington e Hales (1986), mostraram que os canais de K^{+} sensíveis ao ATP são rápida e reversivelmente inibidos, de maneira dose-dependente, pela

aplicação de ATP na superfície interna da membrana, corroborando assim observações de Cook e Hales (1984). Estudos de Kakei, Kelly e Ashcroft (1986) mostraram que o ADP tem a propriedade de modular a sensibilidade desses canais ao ATP. ADP nas concentrações de 1 a 2 mM reverte a inibição dos canais de K^+ induzida pelo ATP. Esses resultados foram confirmados por Dunne e Petersen (1986) em RIN m5F, onde 100 a 500 μ M de ADP podem ativar esses canais, mesmo em presença de ATP. Já o análogo não hidrolizável do ADP (ADP-B-S) foi incapaz de causar ativação. Tal fato sugere que a fosforilação é necessária para que o ADP ative a condutância dos canais de K^+ durante a inibição provocada pelo ATP. Isso indica que a razão ATP/ADP é relevante em determinar a abertura dos canais de K^+ e não somente a concentração de ATP.

Coincidentemente esses canais de K^+ , ATP dependentes, são alvo das sulfoniluréias, como por exemplo, a tolbutamida, (Troupe, Rorsman e Shosaku, 1986), droga usada na clínica médica em pacientes diabéticos tipo II. As sulfoniluréias, potencializam a secreção de insulina nesses pacientes. A propósito, redução do efluxo do $^{86}Rb^{+}$ induzido pela tolbutamida em ilhotas isoladas foi registrado há vários anos por Boscher e Malaisse (1979) e Henquin (1981).

1.2. GLICOCONJUGADOS E RESÍDUOS DE ÁCIDO SIÁLICO

A superfície da maior parte das células animais são negativamente carregadas. A principal causa dessa negatividade consiste na ionização de grupos carboxil do ácido siálico (Gottschlak, 1966), os quais ocupam posição terminal periférica na porção oligossacarídica das glicoproteínas e glicolípides que fazem parte da camada superficial da membrana celular (Steck, 1974; Winzler, 1970). Esses resíduos, que apresentam particular afinidade por Ca^{+2} , constituem um componente importante de ligação para cátions na superfície celular, como demonstrado em membrana de eritrócitos (Long e Mouat, 1971). Tanto a afinidade como a negatividade desses radicais podem ser comprovadas pela tendência que o La^{+3} tem em ligar-se à superfície das células cardíacas, deslocando grandes quantidades de Ca^{+2} . Este fato sugere um papel importante dos radicais de ácido siálico na regulação da permeabilidade ao Ca^{+2} , nas células de um modo geral (Long e Mouat, 1971; Langer e Frank, 1972).

A exemplo do La^{+3} , outros antagonistas de Ca^{+2} foram testados por Hattori, Hazama, Kanno e Nakao (1986), em células cardíacas pré-tratadas com neuroaminidase, enzima que extrai os radicais de ácido siálico da membrana. Verapamil, diltiazem e nifedipine foram testados, e com exceção do nifedipine, os resultados encontrados sugerem que

o ácido siálico pode estar envolvido no mecanismo de ação destes antagonistas de Ca^{+2} .

A participação de resíduos de ácido siálico na fisiologia celular não se restringe apenas à modulação da permeabilidade iônica. Sabe-se que sua remoção pela neuroaminidase, em tecido adiposo, altera a ação da insulina no transporte de glicose, bem como sobre a lipólise (Cuatrecasas e Illiano, 1971; Yamaguchi, Sato e Kathuria, 1985).

Outro papel importante desses radicais é a possível proteção de certos antígenos, os quais normalmente são encobertos por esses resíduos. A retirada dos mesmos pode induzir reações antígeno-anticorpo, como bem demonstrado em células de insulinoma (RINm5F) (Uchigata, Spitalnik, Tachiwaki, Salata e Notkins, 1987).

1.3. ANTAGONISTAS DE CÁLCIO

Diversos estudos "in vitro" têm demonstrado que a concentração dos íons Ca^{+2} , em fluidos extracelulares, é de fundamental importância para a liberação de insulina (Grodsky e Bennett, 1968; Devis, Somers e Malaisse, 1975).

O papel do Ca^{+2} tem sido investigado diretamente por diversas técnicas, entre elas, as técnicas bioelétrica, ultraestrutural e radioisotópicas (Mathews e Sakamoto 1975; Hellman, Sehlin e Taljedal, 1976).

Por outro lado, parte considerável dos conhecimentos sobre a importância desse cátion, tanto na secreção de insulina quanto nos mecanismos de trocas iônicas a nível de membrana, está baseada nas observações obtidas com antagonistas orgânicos e/ou inorgânicos de Ca^{+2} , tais como: Co^{+2} , La^{+3} , verapamil, nifedipine, (Hellman, Sehlin e Taljedal, 1976; Henquin e Lambert, 1975; Malaisse e Boscher, 1977; Devis, Somers e Obberghen, 1975) e mais recentemente pela utilização da gentamicina (GEN) (Boscher e Delattre, 1985). Dentre estes, o mais utilizado foi o verapamil. Contudo, trabalhos com fibras de Purkinje cardíacas caninas, ilhotas pancreáticas de rato e axônio de lula (Posner, Miller e Lambert, 1975; Boscher e Malaisse, 1979; Begenisick e Linck, 1974), demonstraram que, tanto o verapamil quanto o Co^{+2} , não são bloqueadores específicos de canais de Ca^{+2} , pois estes atuam também como inibidores diretos das correntes de Na^{+} e, especialmente, de K^{+} .

Há na literatura inúmeros relatos sobre o efeito dos antibióticos aminoglicosídeos (particularmente a GEN), indicando que possuem um efeito bloqueador na permeabilidade ao Ca^{+2} em grande número de preparações biológicas (Corrado, Prado e Pimenta, 1982). Essa substância mostrou-se efetiva em inibir a secreção de insulina e reduzir a captação do $^{45}\text{Ca}^{+2}$ por ilhotas pancreáticas isoladas (Boscher e Delattre, 1985). Outros antibióticos desse grupo, tais como estreptomicina, neomicina, podem interferir na atividade miocárdica, ganglionar autonômica bem como

transmissão neuromuscular (Pittinger e Adamson, 1972; Swain, Kiplinger e Brody, 1956). A ação do bloqueio neuromuscular pode ser revertida pelo aumento da concentração do Ca^{+2} , e tem sido sugerido que os aminoglicosídeos competem com o Ca^{+2} por um sítio específico do receptor (Pittinger e Adamson, 1972).

Fairhurts e Macri (1975), observaram que a estreptomicina e a neomicina inibem o efluxo do $^{45}\text{Ca}^{+2}$ em fragmentos de retículo sarcoplasmático de músculo esquelético. Tulkens e Trossel (1978) mostraram que os aminoglicosídeos, por serem compostos polibásicos e hidrofílicos (esquema I), não penetram na membrana, mas interferem com ligantes de Ca^{+2} .

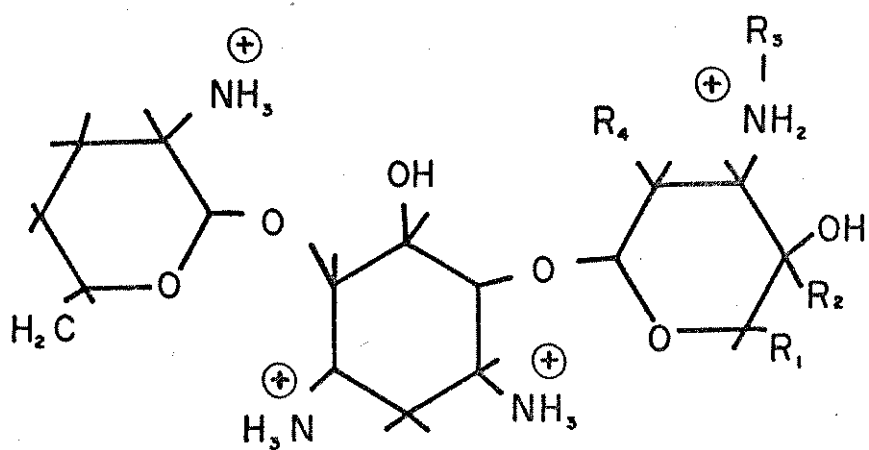
Lullmann e Schwarz (1985) determinaram, em músculo cardíaco, que os antibióticos dibecacina, sisomicina e gentamicina reduzem o conteúdo de Ca^{+2} em até 20%. A perda do Ca^{+2} , ligado superficialmente, foi acompanhada por uma redução na força contrátil de 40 a 90%.

O esquema II (Lullmann e Schwarz, 1985), sugere um possível mecanismo de ação dos aminoglicosídeos na superfície da membrana de células cardíacas. Em (a), a concentração do Ca^{+2} extracelular está em equilíbrio com numerosos sítios ligantes aniônicos na superfície externa da membrana. Primeiramente, o Ca^{+2} seria liberado, dependente de voltagem, de um depósito situado na superfície interna, o qual está em equilíbrio com o Ca^{+2} da superfície externa. A seguir o Ca^{+2} ligado na superfície externa fluiria, através

ESQUEMA I

Fórmula química da Gentamicina, Dibecacina e
Sisomicina, demonstrando sua natureza polibásica e
hidrofílica.

ESQUEMA I

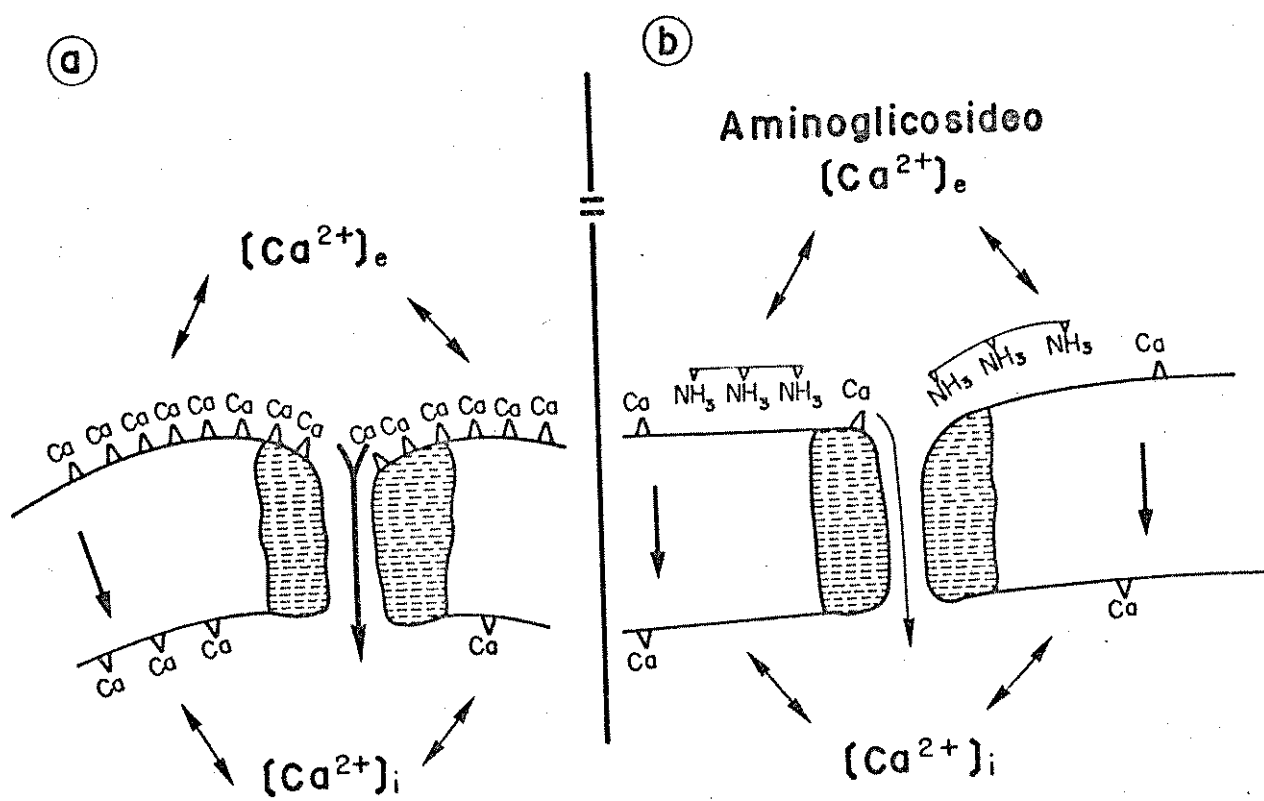


	R_1	R_2	R_3	R_4
Gentamicina	— H	— CH_3	— CH_3	— OH
Dibecacina	— CH_2OH	— H	— H	— OH
Sisomicina	— H	— CH_3	— CH_3	— H

ESQUEMA II

Esquema representando o efeito dos antibióticos aminoglicosídeos sobre a ligação de Ca^{+2} na superfície da membrana celular. Em (a) controle, em (b) na presença de antibióticos aminoglicosídeos, como proposto por Lüllmann e Schwarz (1985).

ESQUEMA II



dos canais, para o interior da célula. Em (b), a situação é esquematicamente representada em presença de antibióticos aminoglicosídicos, os quais competem por esses sítios ligantes aniônicos, reduzindo assim a ligação do Ca^{+2} nesses sítios e como consequência uma diminuição no acoplamento excitação-contracção do músculo cardíaco.

Esses autores concluíram ainda que os grupos ácidos dos fosfolípidos pertencentes à superfície externa da membrana plasmática, e os grupos ácidos das glicoproteínas que formam o glicocálice representam um sítio de ligação aniônica do Ca^{+2} . Contudo, convém mencionar que estudos "in vivo" e "in vitro", em túbulos renais (Marche, Oliver, Girard e Morin 1985), mostraram que o fosfoinositol desempenha um papel de grande importância na interação entre aminoglicosídeos e células epiteliais renais de coelhos. O fosfatidilinositol 4-bifosfato (PI-P2) é um componente chave da membrana, pois regula o transporte de Ca^{+2} e a sua mobilização intracelular. Assim, modificações induzidas por aminoglicosídeos no metabolismo do fosfoinositol podem ser consideradas como um evento primário na toxicidade desta droga, que poderia resultar em alterações na homeostase do Ca^{+2} nestas células.

1.4. PROPOSTA DO TRABALHO

Pela revisão da literatura, constata-se a importância das permeabilidades iônicas no processo secretório celular. Em especial o papel do K^+ e do Ca^{+2} nas células secretoras de insulina, onde os íons K^+ desempenham um papel fundamental na regulação do potencial de membrana dessas células.

Basicamente, podemos destacar duas permeabilidades específicas ao K^+ em células beta. Uma dependente da concentração citoplasmática de Ca^{+2} e outra dos níveis celulares de ATP.

Nosso intuito, na realização deste trabalho, foi estudar a permeabilidade ao K^+ , em especial aquela controlada pelo Ca^{+2} interno. Para avaliar tal permeabilidade, utilizamos a gentamicina, que, segundo a literatura, interfere no acúmulo do Ca^{+2} intracelular. Também utilizamos a neuroaminidase, uma enzima que extrai da membrana radicais de ácido siálico provavelmente envolvidos no transporte do Ca^{+2} para o interior da célula.

2 - MATERIAL E MÉTODO

2.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos WISTAR, de ambos os sexos, de 3 a 4 meses de idade, procedentes do BIOTÉRIO CENTRAL DA UNICAMP. Esses animais foram rotineiramente mantidos por um período de adaptação de 5 a 6 dias no biotério de manutenção do DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA e alimentados com ração (Labina-Purina) e água "ad libitum", a qual continha um complexo vitamínico (Vitagold).

2.2. TÉCNICA DE ISOLAMENTO DAS ILHOTAS DE LANGERHANS DE RATOS

Após o sacrifício e laparotomização do animal, o ducto biliar comum foi canulado próximo ao hilo do fígado e ligado na sua posição distal adjacente ao duodeno. Através da cânula de polietileno, injetou-se 10 ml de solução de Hanks enriquecida com glicose (2.8 mM) que fluindo através dos ductos pancreáticos em sentido retrógrado, promoveu a divulsão do tecido acinoso.

O pâncreas foi retirado livre do tecido acinoso e nódulos linfáticos, sendo a seguir, reduzido a fragmentos de aproximadamente 0,5 mm³ com o auxílio de uma tesoura.

Posteriormente os fragmentos foram transferidos para um tubo de ensaio de 12 x 1,5 cm, em presença de Hanks, contendo 6 a 8 mg de collagenase por pâncreas. Em seguida, os fragmentos foram incubados a 37 °C durante aproximadamente 14 min, sob constante agitação. Nos 8 min iniciais, o conteúdo foi movimentado pela passagem de carbogênio (95% O₂ : 5% CO₂) e o restante do tempo por agitação manual. Após o período de incubação, o material foi lavado 5 vezes para a remoção da collagenase, das enzimas digestivas liberadas durante a incubação e também dos fragmentos celulares. Um período de mais ou menos 2 min entre as lavagens foi necessário para proceder a decantação do material.

As ilhotas, agora completamente separadas do tecido acinoso, foram coletadas uma a uma, sob lupa, por aspiração com o auxílio de pipeta PASTEUR, previamente siliconizada e estirada.

2.3. EFLUXO DO RUBÍDIO (⁸⁶Rb⁺)

Para análise da permeabilidade do K⁺, utilizou-se, nesse trabalho, o ⁸⁶Rb⁺ como substituto do K⁺. Tal procedimento justifica-se por motivos técnicos, uma vez que o ⁴²K⁺ ideal como traçador do ³⁹K⁺ apresenta meia-vida muito curta (12,5 horas), o que inviabiliza sua utilização. Aliás, o uso de ⁸⁶Rb⁺ como substituto do K⁺ tem sido largamente empregado tanto em ilhotas como em outros tecidos (Sehlin e

Taljedal, 1974; Stieve e Hartung, 1977), sendo a razão de efluxo de ambos muito semelhante (Boschero e Malaisse, 1977). Após isolamento, dois grupos contendo 150 a 200 ilhotas cada, foram transferidos para tubos de ensaios (5x1 cm) contendo 1,0 ml de solução de Hanks. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 μ l de solução de Krebs contendo o $^{86}\text{Rb}^+$ (80 $\mu\text{Ci/ml}$) enriquecido com 16,7 mM de glicose. Logo após, as ilhotas foram incubadas durante 90 min a 37 °C, sendo o pH (7,4) equilibrado durante os 10 min iniciais com carbogênio. Nos experimentos onde usamos neuroaminidase (2,5 U/ml), esta foi diluída em Krebs e adicionada ao meio de incubação juntamente com o isótopo do $^{86}\text{Rb}^+$.

Após o período de incubação, as ilhotas foram lavadas três vezes com solução de Krebs não radioativa a 0 °C 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 8 μm (Millipore Corp. Bedford, Mass.). Essas câmaras foram conectadas em um sistema de perfusão que consiste de dois recipientes contendo soluções nutritivas ligadas por intermédio de cateteres a uma torneira de duas vias. As soluções nutritivas e experimentais foram mantidas a 37 °C e continuamente equilibradas com carbogênio para manutenção do pH em 7,4.

Assim que as ilhotas foram transferidas para as câmaras, iniciou-se a perfusão, durante a qual o líquido perfusor percorreu o sistema na razão de 1ml/min, sendo

impulsionado por uma bomba peristáltica (Holter Pump S. 900 Extracorporal Med. Spec. Inc., King Prussia Pa).

A solução nutritiva proveio do primeiro recipiente até o 30º min., do segundo recipiente (situação experimental) até o 50º min. e novamente do primeiro recipiente até o 70º min., quando findou a perfusão. As amostras foram coletadas a partir do 12º min. a intervalos regulares de 2 min. em frascos para contagem de radioatividade. Nos experimentos onde usamos teofilina, o tempo de perfusão foi reduzido para 45 min., sendo que o início da coleta foi no 26º min. a intervalos regulares de 1 min., até o 30º min. e de 30 seg. até o final do experimento.

A radioatividade contida no efluente de cada frasco foi avaliada em contador de radiação beta, usando-se para isto o efeito Cerenkov, o qual dispensa o uso de líquido de cintilação.

Em cada experimento, o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ (cpm) foi expresso como a razão fracional do efluxo, a qual indica a porcentagem do conteúdo total de radioatividade contida na ilhota liberada em cada intervalo de tempo (2 min.).

2.4. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para avaliar a magnitude da variação do efluxo do isótopo ($^{86}\text{Rb}^+$), calculou-se para cada experimento a diferença entre os valores registrados depois da alteração da condição experimental (30° min.) e os esperados, calculados pela extrapolação da curva exponencial, baseada nos dados obtidos antes da alteração (12° ao 30° min.). O mesmo procedimento foi mantido quando a droga foi retirada do meio (50° min.). Existe uma relação entre o efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ e seu conteúdo no interior da ilhota de Langerhans, que pode ser descrita pela equação:

$$E = a \times e^{b \times t} \quad (1)$$

onde E é igual ao efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$, a e b são constantes definidas experimentalmente, t indica o tempo e e o número de Euler. Para avaliar-mos este parâmetro realizamos uma análise de regressão linear simples, após a aplicação de logaritmo neperiano (Ln) em ambos os termos da equação (1), (Costa Neto, 1977), assim:

$$\text{Ln } E = \text{Ln } a + b \times t \quad (2)$$

Estimando-se os coeficientes a e b pelo método dos mínimos quadrados, calculou-se o efluxo esperado e a significância estatística foi avaliada pela aplicação do

teste t de Student, sendo os resultados expressos como médias e seus respectivos erros padrões.

As tabelas Ia, Ib e II foram confeccionadas a partir do tratamento acima citado e admitindo-se como não significantes valores de $p > 5\%$.

2.5. RADIOISÓTOPOS E REAGENTES

Todos os sais utilizados, bem como a glicose e demais substâncias adicionadas ao meio de isolamento e/ou incubação, possuíam grau analítico de pureza (p.a). Albumina bovina V, collagenase (260 U/mg), neuroaminidase tipo X, foram obtidas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, M.O.). Teofilina anidra foi da Schwarz-Mann (Orangeburg, N.Y.). Gentamicina na forma de sal sulfato, foi obtida do laboratório Schering (Rio de Janeiro, R.J.). $^{86}\text{Rb}^+$ e frascos de polietileno para contagem de radiação, foram da New England Nuclear Corp. (Boston, M.O.) e complexo vitamínico Vitagold do laboratório Tortuga (São Paulo, S.P.) e E.G.T.A. (Sigma Chemical Co., St Louis).

2.6. SOLUÇÕES

A solução para isolamento de ilhotas, foi preparada segundo a composição salina descrita por Hanks e Wallace (1949), sendo constituída da seguinte fórmula:

NaCl	8,00g
KCl	0,40g
CaCl ₂	0,14g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,20g
NaH ₂ PO ₄	0,48g
KH ₂ PO ₄	0,06g
NaHCO ₃	0,35g
H ₂ O deionizada (qsp)	1000 ml

No momento de uso adicionaram-se 0.5 g/l de glicose

A solução-tampão bicarbonato de Krebs-Ringer (Krebs), tem a seguinte composição:

NaCl	26,886g
NaHCO ₃	8,065g
KCl	1,491g
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,813g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,588g
H ₂ O destilada (qsp)	1.000ml

No momento de uso, foram adicionados 2 mg/ml de albumina bovina fração V.

3 - RESULTADOS

3.1. EFEITO DA GEN SOBRE O EFLUXO DO ^{86}Rb NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE GLICOSE

A figura I mostra o efeito de diferentes concentrações de gentamicina (GEN) sobre o efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ de ilhotas perfundidas na ausência de glicose. Na parte superior (A), observamos que o efeito da GEN (1mM) entre o 30° e o 50° min. não provocou alteração significativa no efluxo.

GEN nas concentrações de 2 a 5 mM (figura IB e IC) induziu uma acentuada redução no efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$. O cálculo dos valores reais de efluxo, observados para os min. 34, 36, 38 e 40, quando comparados com os valores teóricos obtidos pela extrapolação da curva para os respectivos minutos, foram significativamente diferentes, como demonstra a tabela Ia. Quando a droga foi retirada do meio perfusor no 50° min., o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ foi revertido e a comparação com os valores teóricos indicou diferenças significativas para alguns pontos, na figura IB e para todos os pontos na figura IC, como demonstra a tabela II.

A figura II mostra que a introdução da GEN (5mM) no meio contendo 8.3mM de glicose também induziu

redução do efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$, efeito este revertido após a retirada da droga no 50º min. Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre os valores reais do efluxo e os valores teóricos obtidos por extrapolação da curva entre os 34º e 40º min. (tabela Ia) bem como entre os 54º e 60º min. de perfusão (tabela II).

3.2. EFEITO DA GEN SOBRE O EFLUXO DE ^{86}Rb EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE Ca^{+2}

As figuras IIIA e IIIB ilustram o efeito da GEN (2 e 5mM) sobre o efluxo de Rb^+ em presença de 10 mM de Ca^{+2} . GEN (2mM) reduziu significativamente o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ para os min. 34º e 40º (tabela I). Essa redução foi passageira, com o efluxo voltando a valores semelhantes àqueles registrados no período que antecedeu a introdução da droga. GEN (5mM), (figura IIIB e tabela I), provocou redução significativa no efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$, a qual permaneceu até a retirada da droga do meio perfusor. A figura III e tabela II evidenciam que, após a retirada de GEN, houve um significativo aumento do efluxo na situação experimental com 5mM de GEN, mas não com 2mM.

A figura IV ilustra o efeito da GEN 1mM (A) e 5mM (B) sobre o efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ na ausência de Ca^{+2} e

em presença de 0.5mM de EGTA. Na ausência de Ca^{+2} , a GEN não alterou o efluxo do $^{86}\text{Rb}^{+}$.

A figura V evidencia o efeito da redução da concentração de Ca^{+} de 1mM para 0.1mM sobre o efluxo de $^{86}\text{Rb}^{+}$ na ausência de glicose. Esta alteração induziu ligeiro aumento do efluxo, embora não significativo.

3.3. EFEITO DA TEOFILINA (TEO) NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE GEN SOBRE O EFLUXO DO ^{86}Rb

A figura VI mostra o efeito da TEO (5mM) sobre o efluxo do Rb^{+} na ausência (A) e na presença (B) de GEN (5mM). Esses experimentos foram executados na presença de 8.3mM de glicose e 1mM de Ca^{+2} . A TEO foi efetiva em aumentar o efluxo quando foi introduzida ao meio de perfusão no 35º min. tanto na ausência como na presença de GEN. O cálculo dos valores reais dos efluxos observados para os minutos 37, 37.5, 38, 38.5, 39 e 39.5 de perfusão comparados com os valores teóricos, obtidos pela extrapolação da curva para os respectivos minutos, foram significativamente diferentes na maioria dos pontos, como demonstra a tabela Ib.

3.4. EFEITO DA GEN EM PRESENÇA DE NEUROAMINIDASE SOBRE O EFLUXO DO ^{86}Rb

Na figura VII observa-se, em (A), que a incubação prévia com neuroaminidase (2.5U/ml) provocou ligeira aceleração do efluxo de Rb^+ a exemplo do observado na figura IVA (em que as ilhotas foram perfundidas na ausência de Ca^{+2} e em presença de EGTA).

A figura VIIB e tabelas Ia e II evidenciam claramente que, mesmo com a suposta retirada dos resíduos de ácidos sialícos pela neuroaminidase, a GEN reduziu o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$, sendo estatisticamente significativa a partir do 34º min. Após a retirada da GEN do meio, o efluxo retornou a valores mais elevados, sendo estes estatisticamente diferentes a partir do 54º min. quando comparados com os valores teóricos obtidos pela extrapolação da curva.

FIGURA I

Efeito da GEN 1mM (A), 2mM (B) e 5mM (C), sobre o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ de ilhotas isoladas e perfundidas durante 70 min. Os experimentos foram realizados na ausência de glicose e na presença de 1mM de Ca^{+2} . A GEN esteve presente entre o 30º e 50º min. de perfusão, como indicado pelas linhas verticais pontilhadas. São indicadas as médias ($\pm$ erro padrão da média) sendo $n=2$ para a condição experimental A e $n=4$ para B e C.

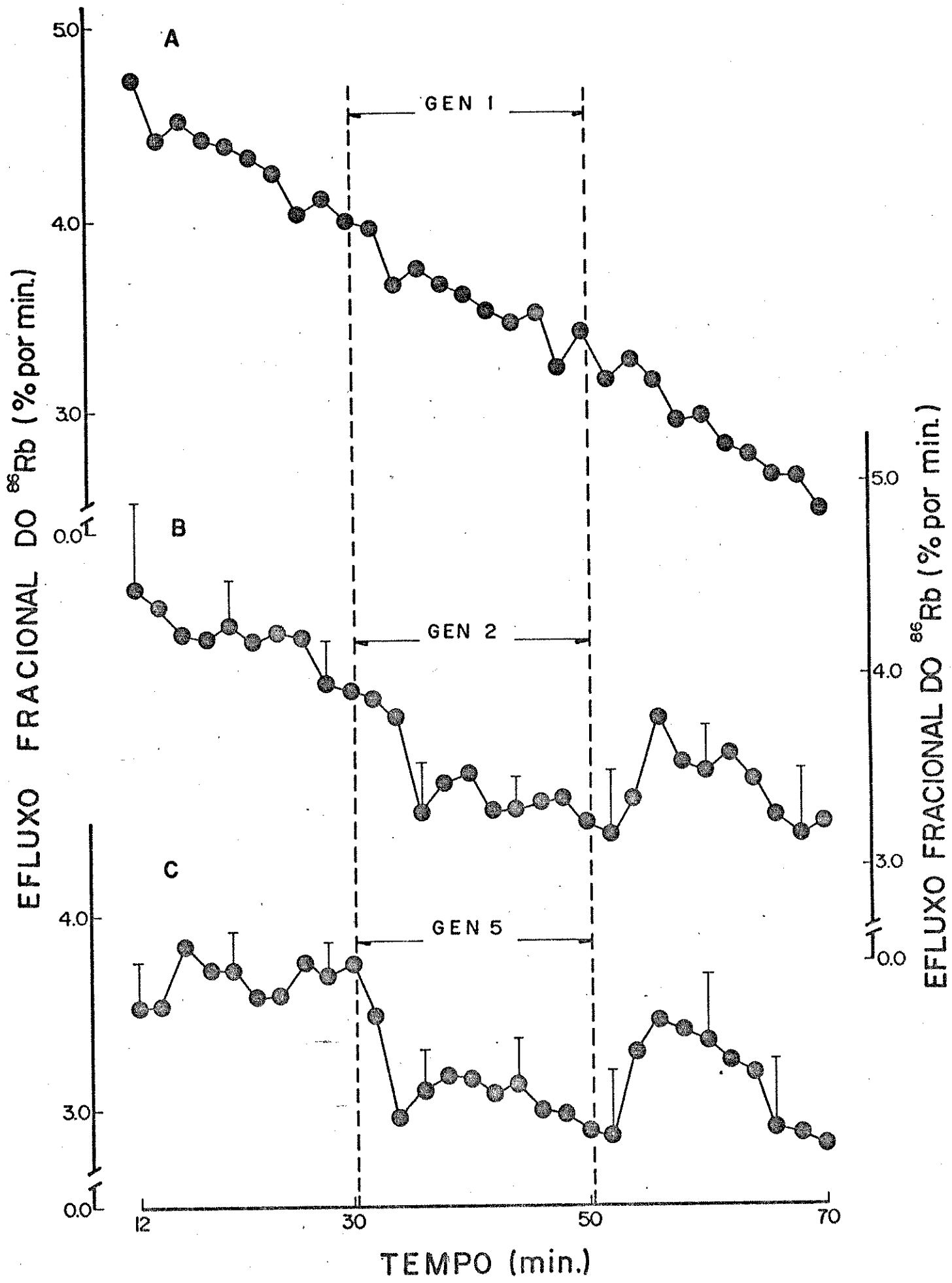


FIGURA II

Efeito da GEN 5mM sobre o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ de ilhotas isoladas. Os experimentos foram realizados em presença de 8.3mM de glicose e a GEN esteve presente entre o 30^o e 50^o min. de perfusão, como indicado pelas linhas verticais pontilhadas. São indicadas as médias ($\pm$ erro padrão da média) sendo n=4.

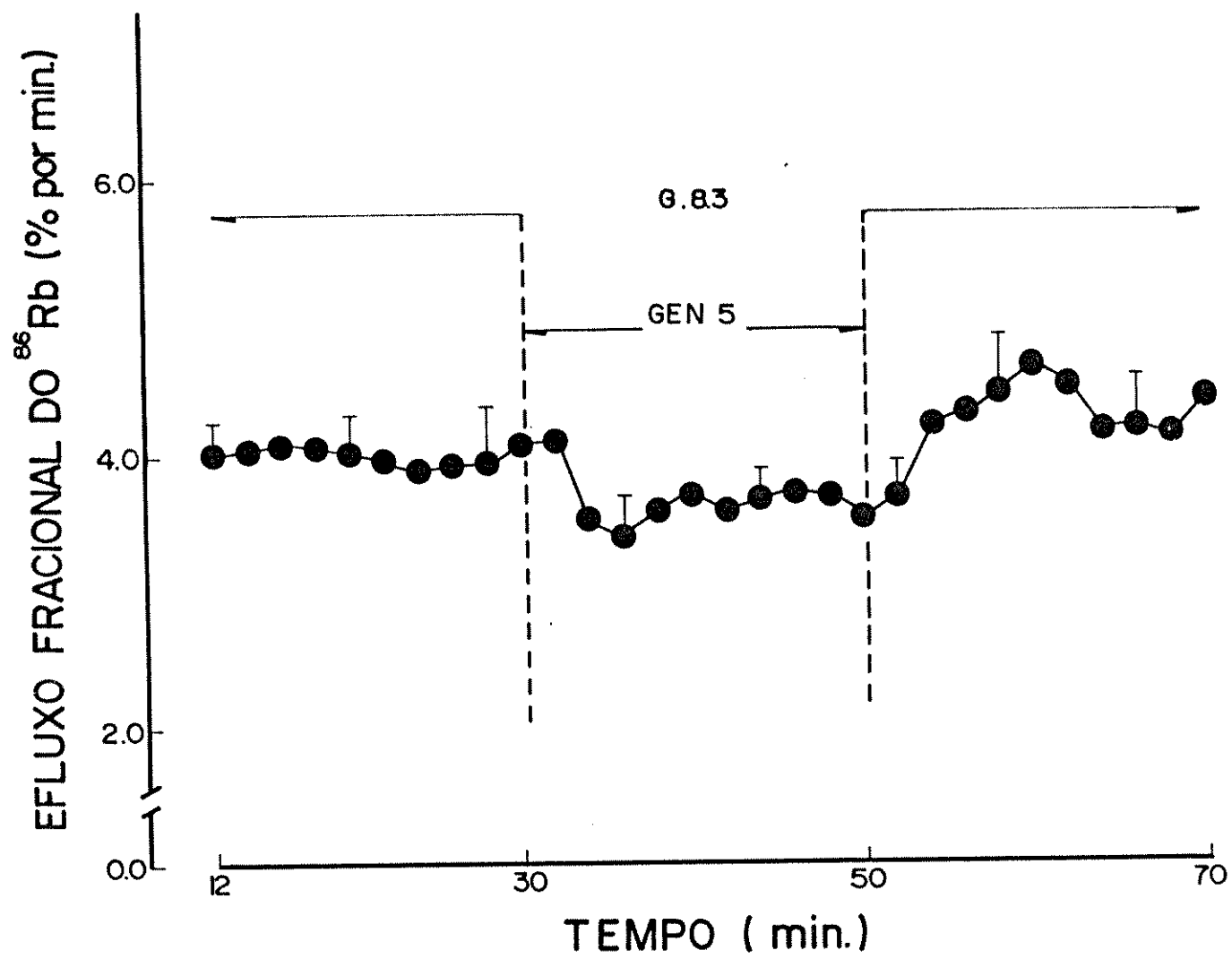


FIGURA III

Efeito da GEN 2mM (A) e 5mM (B) sobre o efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ de ilhotas perfundidas na ausência de glicose e em presença de Ca^{+2} 10mM. A GEN esteve presente no meio entre o 30º e o 50º min. de perfusão, como indicado pelas linhas verticais pontilhadas. São indicadas médias ($\pm$ erro padrão da média) sendo $n=3$ para a condição experimental (A) e $n=4$ para (B).

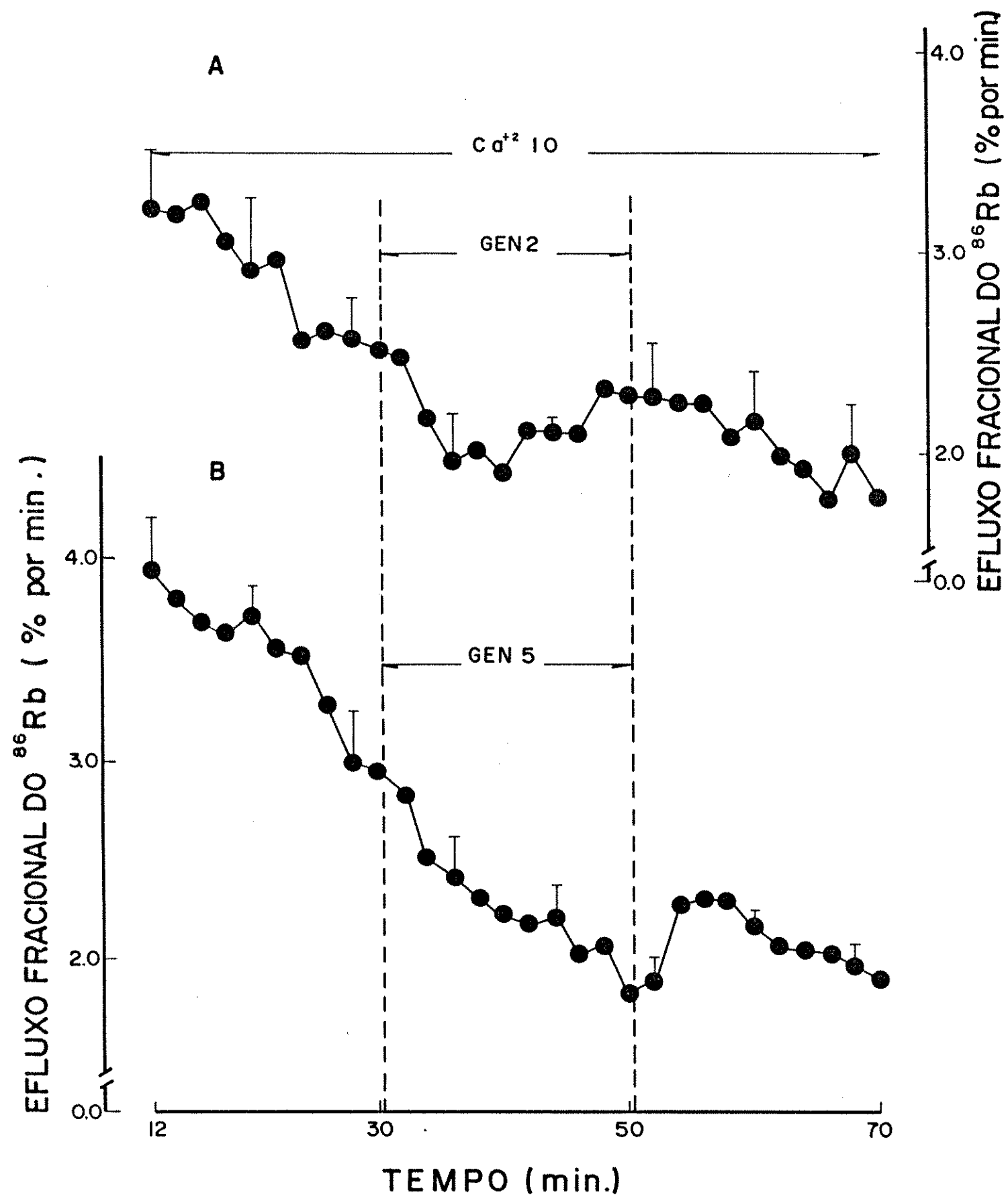


FIGURA IV

Efeito da GEN 1mM (A) e 5mM (B) sobre o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ de ilhotas perfundidas na ausência de glicose e na presença de EGTA 0.5mM. A GEN esteve presente no intervalo de perfusão compreendido entre o 30^o e o 50^o min., como indicado pelas linhas verticais pontilhadas. São indicadas as médias ($\pm$ erro padrão da média), sendo n=2 para a condição experimental (A) e n=4 para a situação (B).

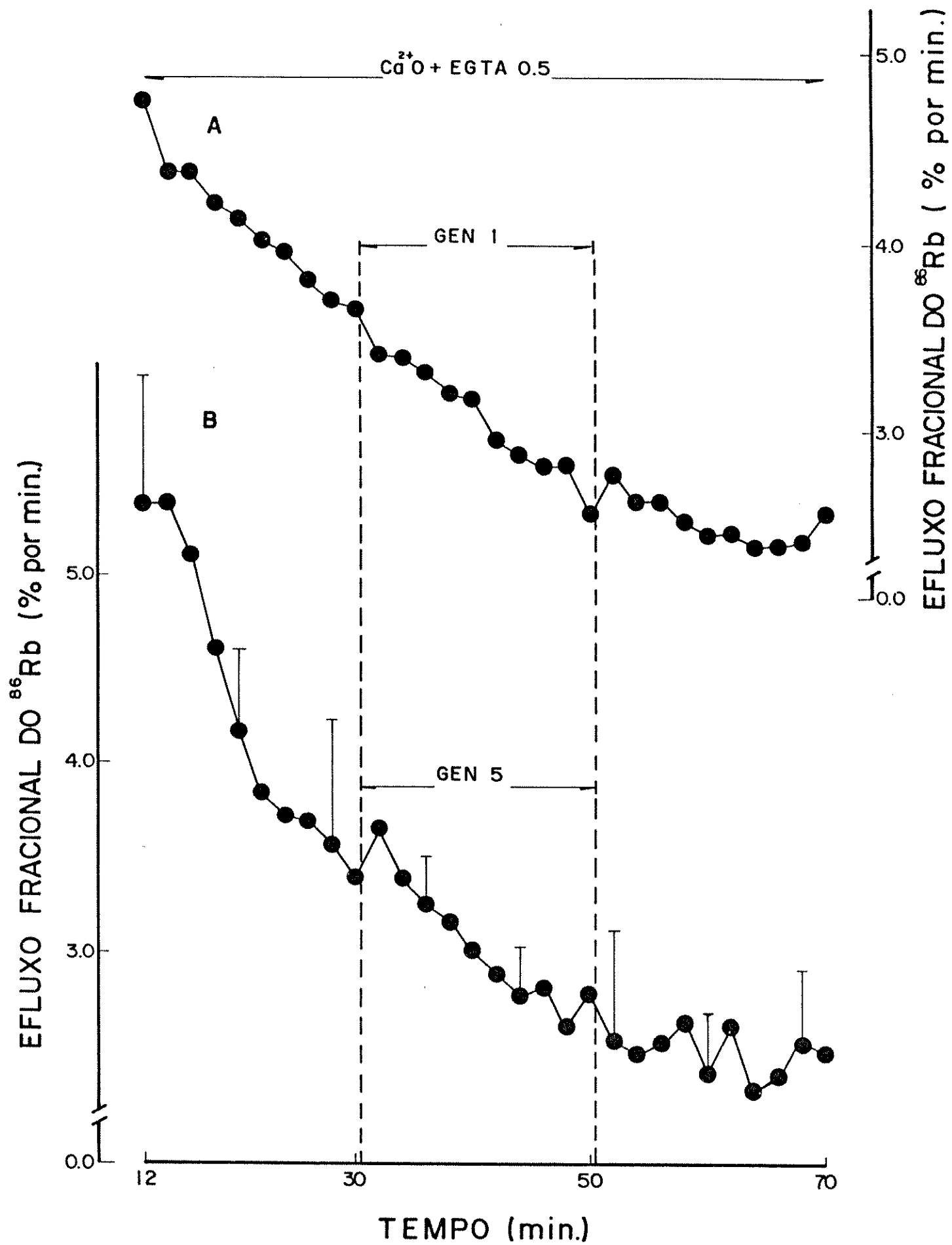


FIGURA V

Efeito da redução da concentração de Ca^{+2} sobre o efluxo do $^{86}\text{Rb}^{+}$ em ilhotas perfundidas na ausência de glicose. Entre o 30º e o 50º min. de perfusão, como indicado pelas linhas verticais pontilhadas, a concentração de Ca^{+2} 1mM foi reduzida para 0.1mM. São indicadas as médias ($\pm$ erro padrão da média) sendo $n=3$.

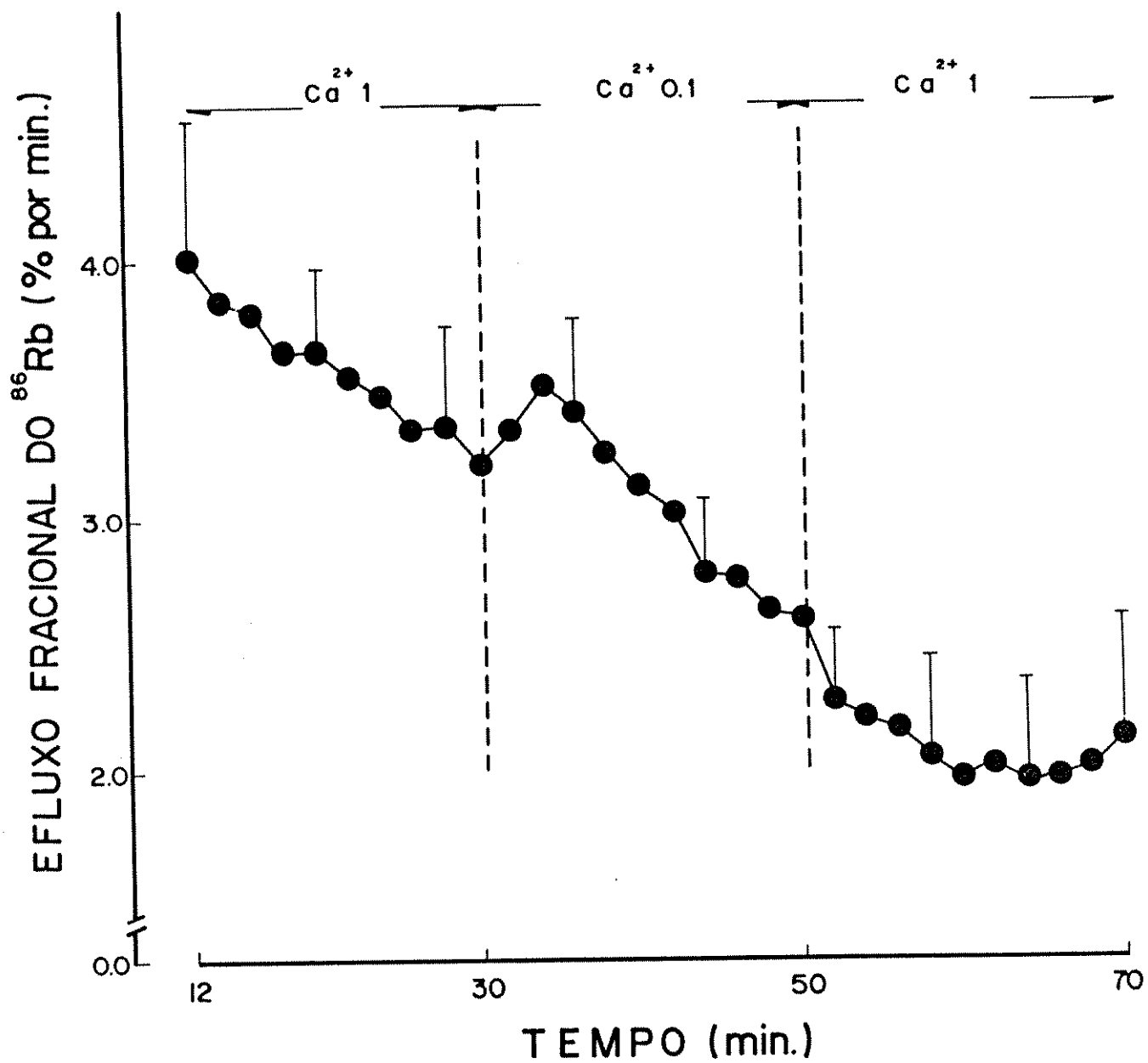


FIGURA VI

Efeito da teofilina 5mM sobre o efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ de ilhotas pefundidas na ausência em (A) e na presença em (B) de GEN 5mM. Os experimentos foram executados na presença de 8.3mM de glicose e 1mM de Ca^{+2} . A coleta das amostras foi iniciada no 26º min. a intervalos regulares de 60 seg. até o 30º min., e de 30 seg. até o final do experimento. A linha tracejada vertical indica o momento da introdução da TEO. Nos experimentos indicados em (B) a GEN esteve presente desde o início da perfusão. São indicadas as médias ($\pm$ erro padrão da média), sendo $n=4$ tanto para a condição (A) como para (B).

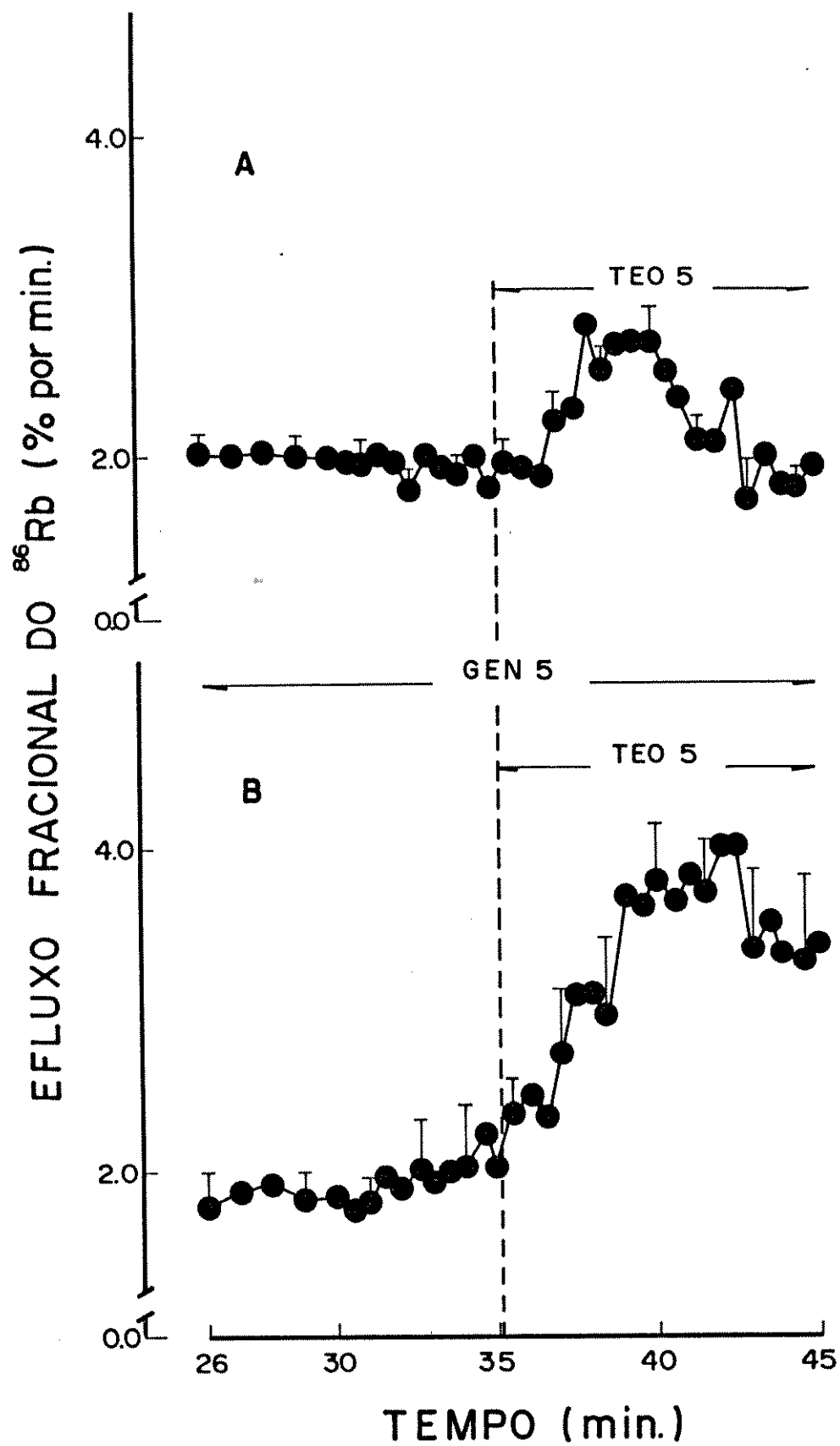
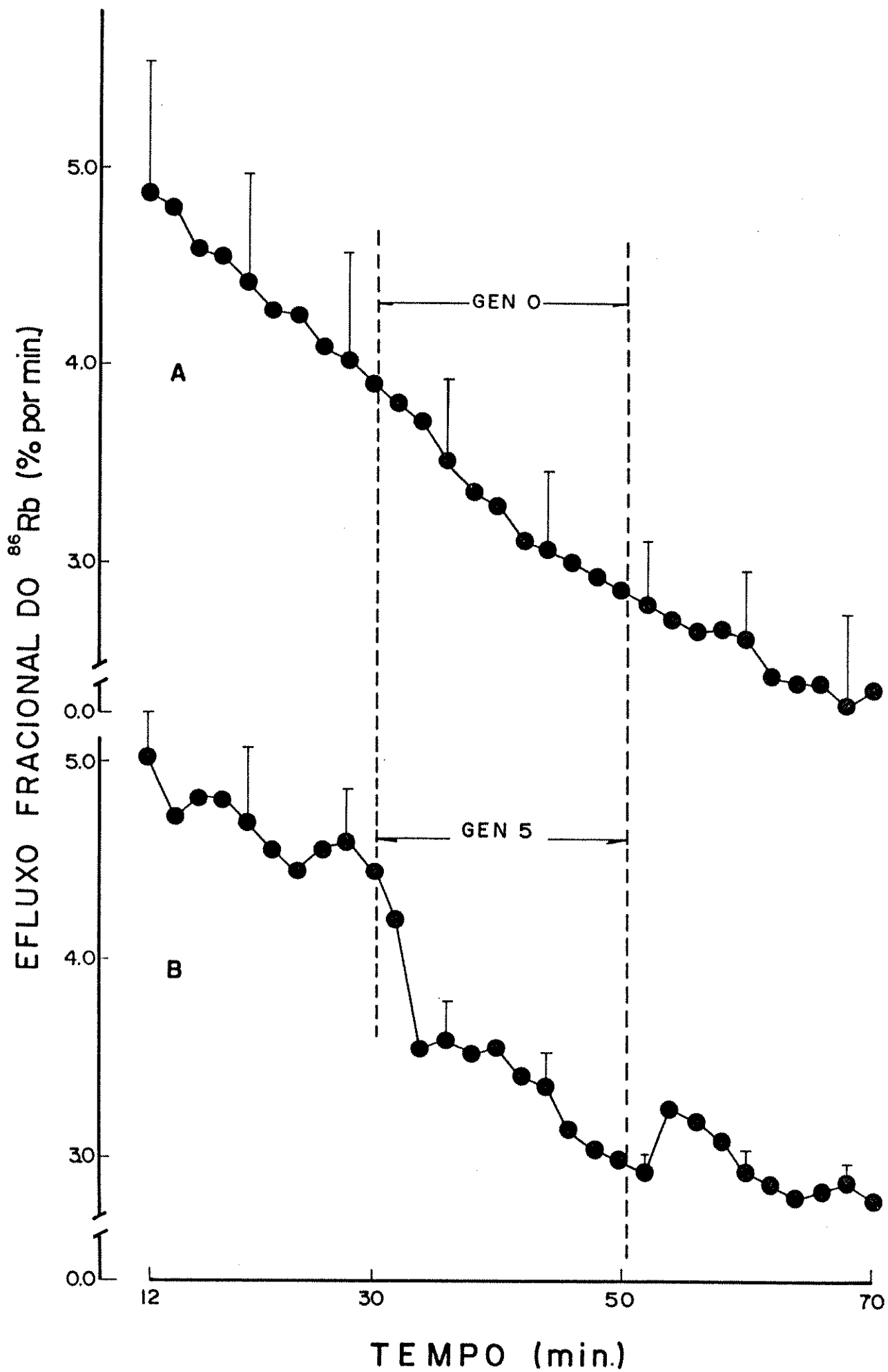


FIGURA VII

Efeito da GEN 5mM sobre o efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ de ilhotas pré-incubadas durante 90 min. com neuroaminidase 2.5U/ml (B). Em (A) o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ de ilhotas submetidas ao mesmo tratamento com neuroaminidase foram perfundidas na ausência de GEN. Em (B) a GEN foi introduzida aos 30 min. e retirada aos 50 min., como indicado pelas linhas verticais. São indicadas as médias ($\pm$ erro padrão da média) sendo $n=4$ para cada situação.



EFEITOS DE DIFERENTES AGENTES SOBRE O EFLUXO DE $^{86}\text{Rb}^+$

TABELA I.

Nº DA FIGURA	CONDIÇÃO	CONDIÇÃO DE ALTERAÇÃO	32°	34°	36°	38°	40°
I _b	KREBS	GEN 2 mM	0,05	0,05	*	0,025	0,01
I _c	KREBS	GEN 5 mM	*	0,05	0,025	0,025	0,025
II	KREBS + GLICOSE 8,3 mM	GEN 5 mM	0,025	*	0,05	0,025	*
III _a	KREBS + Ca^{++} 10 mM	GEN 2 mM	*	0,025	0,05	0,05	0,025
III _b	KREBS + Ca^{++} 10 mM	GEN 5 mM	*	0,005	*	0,05	0,05
IV	KREBS	Ca^{++} 0,1 mM	*	*	*	*	*
VII _b	KREBS + NEURO 2,5 U/ml	GEN 5 mM	*	0,01	0,01	0,005	0,01

TABELA I_b

Nº DA FIGURA	CONDIÇÃO	CONDIÇÃO DE ALTERAÇÃO	37°	37,5°	38°	38,5°	39°	39,5°
VI _a	KREBS + GLICOSE 8,3 mM	TEO 5 mM	0,05	0,01	0,025	0,005	0,025	0,01
VI _b	KREBS + GEN 5 mM + GLICOSE 8,3 mM	TEO 5 mM	*	*	*	0,05	0,05	0,05

* Não significativo

EFEITOS DE DIFERENTES AGENTES SOBRE O EFLUXO DE $^{86}\text{Rb}^{+}$

TABELA II

Nº DA FIGURA	C O N D I Ç Ã O	CONDIÇÃO DE ALTERAÇÃO	TEMPO (MIN) - VALORES DE P				
			52°	54°	56°	58°	60°
I _b	KREBS	GEN 2mM	*	*	0,05	*	0,05
I _c	KREBS	GEN 5mM	*	0,025	0,025	0,025	0,025
II	KREBS+GLICOSE 8,3mM	GEN 5mM	*	0,005	0,005	0,005	0,005
III _a	KREBS + Ca ⁺⁺ 10mM	GEN 2 mM	*	*	*	*	*
III _b	KREBS + Ca ⁺⁺ 10mM	GEN 5 mM	*	0,025	0,005	0,005	0,005
V	KREBS	Ca ⁺⁺ 0,1mM	*	*	*	*	*
VII _b	KREBS + NEURO 25U/ml	GEN 5mM	*	0,005	0,005	0,005	0,005

* Não significativo

4 - DISCUSSÃO

Ficou claro na introdução do presente trabalho que as células beta possuem duas permeabilidades distintas para o K^+ , uma passível de ser modulada pelo ATP e outra regulada pela concentração citoplasmática de Ca^{+2} e pelo potencial de membrana. É lógico deduzir que substâncias que interferem com a concentração de Ca^{+2} citoplasmático, indiretamente podem influenciar na permeabilidade (K^+ -dependente de Ca^{+2}).

Alguns trabalhos têm demonstrado que antagonistas de Ca^{+2} , tais como Co^{+2} e verapamil, atuam também como inibidores da permeabilidade ao K^+ em células de ilhotas de ratos (Lebrum, Malaisse e Herchuelz, 1981; Boscherio e Malaisse, 1979), em fibras de Purkinje (Posner, Miller e Lambert, 1975) e axônios de lula (Begenisick e Lynck, 1974).

Em ilhotas pancreáticas, Lebrum, Malaisse e Herchuelz (1981) demonstraram claramente que a ação dos bloqueadores de Ca^{+2} acima citados age diretamente na permeabilidade ao K^+ , pois em soluções sem Ca^{+2} , tanto o verapamil quanto o Co^{+2} conseguiram reduzir significativamente o efluxo do $^{86}Rb^+$. Assim, considerando o papel fundamental do K^+ no mecanismo de

secreção de insulina, estudamos os efeitos da GEN, a qual inibe a secreção de insulina através de um bloqueio da captação de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ (Boschero e Delattre, 1985), sobre a permeabilidade ao K^+ em ilhotas pancreáticas.

As figuras IA e IB mostram que a GEN nas concentrações de 2 e 5 mM, inibiu o efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ de ilhotas perfundidas na ausência de glicose em meio contendo 1mM de Ca^{+2} . Esse efeito foi rapidamente revertido com a retirada da droga do líquido perfusor. Mesmo em presença de 8.3mM de glicose, figura II, quando o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ está diminuído (Malaisse e Boschero, 1978), a GEN 5mM reduziu ligeira mas significativamente o efluxo do referido isótopo. O efeito da GEN sobre o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ foi comparável àquele observado por Lebrum, Malaisse e Merchuelz (1981), usando verapamil ou Co^{+2} . Contudo, ao contrário do verificado por esses autores, o efeito inibitório da GEN sobre o efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ foi revertido quase que totalmente através de um aumento da concentração de Ca^{+2} no meio. (figuras IIIA e IIIB). Essa reversão no efeito inibitório da GEN visto na figura III sugere que a GEN estaria agindo indiretamente na permeabilidade ao K^+ através de sua ação sobre o acúmulo de Ca^{+2} nessas células.

Armstrong e Barnel (1987), estudando canais de K^+ voltagem-dependentes, mostraram que esses canais

apresentavam-se inativados quando a concentração do Ca^{+2} foi diminuída de 10 para 1 mM. Isso sugere que, em axônios de lula, o Ca^{+2} é um cofator essencial na abertura desses canais. Estes dados vêm comprovar tanto os nossos achados como os de Henquin (1979), o qual sugeriu que a elevação do Ca^{+2} intracelular aumenta a permeabilidade da membrana ao K^+ em células da ilhota.

Duas alternativas não exclusivas poderiam explicar o efeito inibitório da GEN sobre o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$. Um efeito direto sobre os canais de K^+ nas células beta como descrito para o verapamil e o Co_2 (Lebrum, Malaisse e Herchuelz, 1981), e/ou um efeito indireto, através da redução da concentração citoplasmática do Ca^{+2} , aliás efeito este já registrado não só em ilhotas (Boschero e Delattre, 1985), bem como em outros tecidos (Lullmann e Schwarz, 1985).

Esta segunda alternativa encontra suporte na figura III, onde o aumento da concentração extracelular de Ca^{+2} reduziu o efeito inibitório da GEN sobre o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$. Corroborando esta hipótese, podemos ver na figura IV, que a retirada do Ca^{+2} do meio perfusor contendo EGTA inibiu completamente o efeito da GEN sobre o efluxo do referido isótopo.

Como hipótese alternativa, existe a possibilidade da GEN agir como um quelante de Ca^{+2} e assim, reduzir a concentração deste íon no líquido

extracelular, tendo como consequência a redução da entrada de Ca^{+2} nas células em estudo. A figura V mostra que a redução da concentração do Ca^{+2} de 1 para 0.1 mM no meio perfusor, ao invés de reduzir, aumentou ligeiramente o efluxo de $^{86}\text{Rb}^{+}$, contrariando portanto a hipótese de quelação do Ca^{+2} como um fator importante na possível redução do efluxo do isótopo. A propósito, Kohlhepp, Plant, McCecarron e Gilbert (1982), não constatarem alteração importante nas concentrações de Ca^{+2} livre em soluções contendo quantidades crescentes de GEN, afastando assim de vez a possibilidade de um efeito quelante desse antibiótico.

Neste contexto, os resultados obtidos (figuras III, IV e V) indicam que o efeito inibitório da GEN sobre o efluxo do $^{86}\text{Rb}^{+}$, parece manifestar-se através da redução da entrada de Ca^{+2} nas células secretoras de insulina. Isto nos leva a sugerir que a permeabilidade ao K^{+} , afetada pela GEN, está relacionada com a $\mu\text{K (Ca)}$ -dependente (Blatz e Magleby, 1984; Findlay, Dunne e Petersen, 1985; Valesco e Petersen, 1987). É necessário lembrar que os antibióticos aminoglicosídeos são substâncias polibásicas e altamente hidrofílicas e que, portanto, não penetram facilmente nas membranas biológicas. Mesmo assim, resta ainda a possibilidade da GEN interferir com a concentração citoplasmática do Ca^{+2} , bloqueando a permeabilidade ao Ca^{+2} do retículo, como verificado por

Fairhust e Macri (1975), em vesículas recompostas de retículo sarcoplasmático de músculo.

A figura VI mostra que a GEN não inibiu o efluxo de $^{86}\text{Rb}^+$ induzido pela TE0, o que invalida a hipótese de um efeito inibitório em termos da mobilização de Ca^{+2} de organelas intracelulares.

Lullmann e Schawrz (1985) relataram em seu trabalho que os grupos ácidos dos fosfolipídeos pertencentes à membrana plasmática e os grupos ácidos das glicoproteínas que forma o glicocálice, representam o sítio de ligação para o Ca^{+2} . Essa afirmação pode reforçar nossos resultados explicando assim a competitividade entre Ca^{+2} e GEN por estes sítios carregados negativamente na membrana. Sabemos também que a GEN é uma substância policatiónica e possivelmente com grande afinidade por estes sítios, o que fortalece ainda mais a hipótese de competição.

Mais recentemente, Catterral (1988), estudando a estrutura e a função dos canais iônicos voltagem-sensíveis, em músculo esquelético de coelho e em cérebro de rato, veio reforçar a idéia de competitividade. Na caracterização desses canais, este autor afirma que os mesmos são compostos basicamente de 5 subunidades polipeptídicas. Uma das subunidades alfa não é glicosilada ocupando posição central no canal de Ca^{+2} , diferindo assim dos canais de Na^+ que são fortemente glicosilados na mesma porção, contendo assim

grandes quantidades de resíduos de ácido siálico. Foi sugerido ainda por esse autor que a carga negativa existente na superfície externa dos canais de Na^+ esteja ligada à presença dos radicais. Essa negatividade pode servir para aumentar a condutância desses canais.

Ao contrário, nos canais de Ca^{+2} , os resíduos de ácido siálico estão mais distantes da porção central do canal. Esses dados poderiam reforçar a idéia de que a GEN reduziria a entrada de Ca^{+2} na célula por uma competição por estes sítios fortemente glicosilados. Esta competição reduziria a oferta de Ca^{+2} para a posição central do canal, diminuindo assim a concentração citoplasmática do mesmo (Lullman e Schwarz, 1985).

Desta forma poderíamos observar uma redução no efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$, como mostram as figuras IB e IC, por uma ação indireta, através da redução dos níveis citoplasmáticos do Ca^{+2} pela GEN. Fica claro, então, que a GEN poderia estar agindo na permeabilidade ao K^+ , (Ca)-dependente, por interferir na captação de Ca^{+2} , diferentemente de outros antagonistas que atuam tanto na permeabilidade ao referido íon como na permeabilidade ao K^+ .

Também poderíamos explicar a atenuação do efeito da GEN sobre o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ quando elevamos a concentração de Ca^{+2} externo de 1 para 10 mM pelo

aumento da competição por esses sítios da membrana (fig. III).

A participação dos resíduos de ácido siálico nos canais de Na^+ tem sido examinada pela remoção desses resíduos em tecido nervoso pelo tratamento com neuroaminidase (Scheuer, Mchugh, Tejedor e Catterall, 1988), e, como consequência da retirada desses resíduos, ocorre uma subcondutividade nesses canais.

Para poder testar a influência dos resíduos de ácido siálico na competitividade do Ca^{++} e GEN por sítios negativos na membrana da célula beta, utilizamos a neuroaminidase, que remove tais resíduos da membrana (Uchigata, Spitalnik, Tachiwaki, Salata e Notkins, 1987).

A figura VII mostra que a pré-incubação por 90 minutos com neuroaminidase induziu aumento na inclinação da curva que representa o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ quando comparado com os demais experimentos (figuras I a VI).

A figura VII ilustra que, mesmo com a possível remoção do ácido siálico da membrana, 5mM de GEN, reduziu significativamente o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$. Porém esse efeito parece ser menor quando comparado com aquele obtido na ausência de neuroaminidase, figura IC.

Finalmente, resta ainda especular uma possível ação da GEN sobre o metabolismo dos fosfoinositídeos da membrana, como efeito primário

deste antibiótico, a exemplo do sugerido por Marche, Oliver, Girard e Morin (1985) em células de epitélio renal.

5 - RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho visou estudar a permeabilidade ao K^+ , $(Ca)^i$ -dependente em ilhotas de Langerhans de rato. Para isso utilizamos o antibiótico aminoglicosídeo gentamicina, que possui propriedades de antagonista de Ca^{+2} .

Ilhotas isoladas de rato, pela collagenase, foram previamente marcadas com $^{86}RbCl$ (usado como substituto de K^+) e perfundidas em solução de Krebs-bicarbonato contendo diferentes concentrações de glicose, Ca^{+2} , teofilina, neuroaminidase e gentamicina.

Os resultados indicam que:

1-Em soluções sem glicose, gentamicina, 2 a 5 mM inibiu de maneira dose-depedente o efluxo do $^{86}Rb^+$.

2-Em presença de 8.3mM de glicose, gentamicina ainda induziu ligeira redução no efluxo do $^{86}Rb^+$.

3-O efeito da gentamicina sobre o efluxo do $^{86}Rb^+$ foi praticamente suprimido pelo aumento da concentração extracelular de Ca^{+2} .

4-O efeito da gentamicina sobre o efluxo do $^{86}Rb^+$ foi suprimido com a retirada do Ca^+ do meio extracelular.

5-A GEN não inbiu o aumento do efluxo do $^{86}Rb^+$ induzido pela TEO.

6-0 tratamento prévio das ilhotas com neuroaminidase atenuou o efeito da gentamicina sobre o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$.

Concluindo, esses resultados indicam que a ação da gentamicina em reduzir o efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ de ilhotas de Langerhans isoladas deve-se a um efeito do antibiótico sobre a captação de Ca^{+2} e consequente redução de sua concentração citoplasmática. A gentamicina é uma base policatiónica de difícil penetração celular; isso, aliado à sua incapacidade de alterar o aumento de efluxo do $^{86}\text{Rb}^+$ produzido pela teofilina, sugere que sua ação manifesta-se essencialmente no lado externo da membrana, provavelmente envolvendo participação dos resíduos de ácido siálico.

[Ca²⁺] - DEPENDENT K⁺ PERMEABILITY IN BETA-CELLS: EFFECT OF GENTAMICIN

It has been reported that the Ca²⁺-antagonists verapamil and CO²⁺ also interfere with K⁺-permeability in many tissues. As Ca²⁺ and K⁺ are important ions for the mechanism of insulin secretion, we investigated the effects of gentamicin on the Ca²⁺-dependent K⁺-permeability in beta cells. For this purpose, isolated rat islets, previously labeled with ⁸⁶Rb (used as a substitute for K⁺), were perfused under different experimental conditions for 70 min with the effluent collected at 2 min intervals. The radioactivity of each sample was measured with a scintillation counter using the Cerenkov effect. Gentamicin (1.0 to 5.0 mM) inhibited the ⁸⁶Rb efflux rate from isolated rat islets in a dose-dependent manner. The inhibition was abolished when the islets were perfused in the absence of Ca²⁺ and in the presence of EGTA, or when the extracellular Ca²⁺ concentration was increased from 1.0 to 10.0 mM. Gentamicin (5.0 mM) failed to affect the increase in the ⁸⁶Rb efflux rate provoked by theophylline, which mobilises Ca²⁺ from intracellular stores. Pre-incubation of the islets with 2.5 U/ml of neuroaminidase, an enzyme that removes sialic acid from membranes, reduced but not abolished the effect of

gentamicin on the ^{86}Rb efflux rate. In conclusion, the present data clearly indicate that gentamicin reduced the ^{86}Rb efflux rate by blocking the entry of Ca^{+2} into the beta-cells instead of having a direct effect on K^{+} -permeability at the level of the cell plasma membrane. The experiments with neuroaminidase and theophylline also indicated that gentamicin acts as a Ca^{+2} antagonist only at the level of the outer membrane.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMSTRONG, C.M. and BARNEO, J.L. External calcium ions are required for potassium channel gating in squid neuron. Science, 236 712-714, 1987.

ASHCROFT, F.M.; HARRISON, D.E. and ASHCROFT, S.J.H. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta cells. Nature, 312: 446-448 1984.

ASHFORD, M.L.J.; HALES, C.N. and STURGESS, N.C. A calcium activated non selective cation channel in a rat insulinomic cell line (abstr.). J.Physiol., 380: 23p, 1986.

ASHFORD, M.L.J.; HALES, C.N. and STURGESS, N.C. Adenine triphosphate inhibits the activity of the calcium-activated non selective cation channel in a rat insulinomic cell line (abstr.). J.Physiol., 381: 116p-1986.

ATWATER I.; FRANKEL, B.J.; ROJAS, E. and GRODSKY, G.M.

Beta cell membrane potencial and insulin release; role of calcium and calcium/magnesium ratio. Q.J. Physiol. 68: 233-245, 1983.

BARRETT, J.N.; MAGLEBY, K.L. and FALLOTTA Properties of single calcium-activated potassium channels in culture rat muscle. J. Physiol. 331: 211-230, 1982.

BEGELNISICH, T. and LYNCHI, C. Effects on voltage-clamped squid axons. J. Gen. Physiol. 63: 675, 1974.

BLATZ, A.L. and MAGLEBY, K.L. Ion condutance and selectivity of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. J.Gen.Physiol. 84: 1-23, 1984.

BOSCHERO, A.C.; DELATTRE, E. The mechanism of gentamicin inhibited insulin release by isolated islets. Arch Int. Phamacodin.Ther. 273: 167-177, 1985.

BOSCHERO, A.C. and MALAISSE, W.J. The stimulus secretion coupling of glucose-induced insulin release. The regulation of $^{86}\text{Rb}^+$ efflux from perfused islets. Am. J. Physiol. 236: E 139-146, 1979.

BOSCHERO, A.C. and MALAISSE, W.J. Effects of glucose, theophylline, Ca^{+2} and Ba^{+2} upon $^{86}\text{Rb}^+$ efflux from pancreatic islets. Proc. Intern. Union Physiol. Sci. 13: 89, 1971.

CATTERALL, W.A. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. Science. 242: 50-60, 1988.

COLQUHOUN, D., NEHER, E., REUTER, H. and STEVENS, C.F. Inward current channels activated by intracellular Ca^{+2} in cultured cardiac cells. Nature. 294: 752-754, 1982.

COOK, D.L. and HALES, C.N. Intracellular ATP directly blocks K^+ channel in pancreatic beta cells. Nature. 311: 271-273, 1984.

COOK, D.L.; IKEUCHI, M. and FUJIMOTO, W.Y. Lowering of pH inhibits Ca^{+2} -activated K^{+} channels in pancreatic beta cells. Nature. 311: 269-271, 1984.

CORRADO, A.P.; PRADO, W.A. and PIMENTA DE MORAES, I. Competitive antagonism between calcium and aminoglycoside antibiotics in skeletal and smooth muscles. In: Rocha e Silva, M. and Soares Kurtas, 6th Eds. Concepts of membranes in regulation and excitation, pp. 201-215, Raven Press, New York, 1975.

COSTA NETO, P.L.O. Estatística, 1st ed. São Paulo, Edgard Blücher, pg. 191-204, 1977.

CUATRECASAS, P. and ILLIANO, G. Membrane sialic acid and the mechanism of insulin action in adipose tissue cells. Effects of digestion with neuraminidase. J. Biological Chemistry. 246: 4938-4946, 1971

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

DEAN, P.M.; MATTHEWS, E.K. and SAKAMOTO, Y. Pancreatic islet cells: Effect of monosaccharides, glycolytic intermediates and metabolic inhibitors on membrane potential and electrical activity. J. Physiol. 246: 459-478, 1975.

DEVIS, G.; SOMERS, G. and MALAISSE, W.J. Stimulation of insulin release by calcium. Biochem. biophys. Res. Commun. 67: 525-539, 1975.

DEVIS, G.; SOMERS, G.; OBBERGHEN, E. and MALAISSE, W.J. Calcium antagonists and islet function I. Inhibition of insulin release by verapamil. Diabetes. 24: 547-551, 1975.

DUNNE, M.J.; FINDLAY, I.; PETERSEN, O.H. and WOLLHEIM. ATP-sensitive K^+ channel in an insuline-secreting cell line are inhibited by D-glyceraldehyde and activated by membrane permeabilisation. J. Membr. Biol. 93: 271-279, 1986.

DUNNE, M.J. and PETERSEN, O.H. Intracellular ADP activate K^+ channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line. Febs. Letters. 200: 59-62, 1986.

FAIRHURST, A.S. and MACRI, J. Aminoglycoside- Ca^{++} interactions in skeletal muscle preparations. Life Sci. 14: 1321-1330, 1975.

FINDLEY, I.; DUNNE, M.J. and PETERSEN, O.H. ATP sensitive inward rectifier and voltage and calcium-activated K^+ channel in cultured pancreatic islets cells. J. Membr. Biol. 88: 165-172, 1985.

GOTTSCHALK, A. In: The amino sugars, Jeanloz, R.W. and Balazs, A. Eds. Academic Press, New York, 1966), vol: 2b pp. 337-359.

GRODSKY, E. and BENNETT, L.L. Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas. J. Physiol. 194: 725-743, 1968.

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.

HATTORI, Y.; HAZAMA, S.; KANO, M. and NAKAO, Y. Inotropic effects of Ca^{+2} channel agonists and antagonists in neuroaminidase-treated left atria of rats. Br. J. Pharmac. 87: 299-305, 1986.

HELLMAN, B.; SEHLIN, J. and TALJEDAL, I.B. Effects of glucose on $^{45}\text{Ca}^{+2}$ uptake by pancreatic islet as studied with the lanthanum method. J. Physiol. 245: 639-656, 1976.

HELLMAN, B.; SEHLIN, J. and TALJEDAL, I.B. Calcium and secretion: distinction between two pools of glucose-sensitive calcium in pancreatic islets. Science. 194: 1421-1423, 1976.

HENQUIN, J.C. D-glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islets cells. Nature. 271: 271-273, 1978.

HENQUIN, J.C. Opposite effects of intracellular Ca^{+2} and glucose on K^{+} permeability of pancreatic islet cells. Nature. 280: 66-68, 1979.

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

HENQUIN, J.C. The effect of pH on Rubidium efflux from pancreatic islet cells. Molec. Cell. Endocr. 21: 119-128, 1981.

HENQUIN, J.C. and LAMBERT, A.E. Cobalt inhibition of insulin secretion and calcium uptake by isolated rat islet. Am. J. Physiol. 228: 1669-1677. 1971.

HENQUIN, J.C., MEISSNER, H.P. and Preissler, M. 9-aminoacridine and tetraethylammonium induced reduction of the potassium permeability in pancreatic beta cells. Effects on insulin release and electrical properties. Biochem. Biophys. acta. 587: 579-592, 1979.

HENQUIN, J.C. and MEISSNER, H.P. Effects of amino acids on membrane potential and $^{86}\text{Rb}^+$ fluxes in pancreatic beta cells. Am. J. Physiol. 240: E 245-252, 1981.

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

HUNTER, M.; LOPES, A.G.; BOULPAEP, E.L. and GIEBISCH, H.G.

Single channel recordings of calcium-activated potassium channels in the apical membrane of rabbit cortical collecting tubules. Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 4237-4238, 1984.

IWATSUKI, N. and PETERSEN, O.H. Action of tetraethylammonium on calcium-activated potassium channels in pig pancreatic acinar cells studied by patch-clamp single-channel whole-cell current recording. J. Membr. Biol. 86: 139-144, 1985.

KAKEI, M.; KELLY, R.P.; ASHCROFT, S.J.H.; ASHCROFT, F.M. The ATP-sensitivity of K^+ channels in rat pancreatic beta-cells is modulated by ADP. Febs Letters. 208: 63-66, 1986.

KAKEI, M. and NOMA, A. Adenosine 5'-triphosphate sensitive single potassium channel in the atrioventricular node cell of the rabbit heart. J. Physiol. 352: 265-285, 1984.

KOHLHEPP, S.J.; PLANT, S.B.; MCCARROM, D.A. and Gilbert, D.N. Gentamicin does not chelate calcium. Antimicrobial agents and chemotherapy. 21(4): 668-669, 1982.

LANGER, A. and FRANK, J.S. Lanthanum in heart cell culture. J. Cell. Biol. 54: 441, 1972.

LATORRE, R. and MILLER, C. Conduction and selectivity in potassium channels. J. Membr. Biol. 71: 11-30, 1983.

LEBRUN, P.; MALAISSE, W.J. and HERCHUELZ, A. Effects of calcium antagonists on potassium conductance in islet cells. Biochemical. Pharmacology. 30 (24): 3291-3294, 1981.

LEBRUN, P.; MALAISSE, W.J. and HERCHUELZ, A. A impairment by amino oxiacetate of ionic response to nutrients in pancreatic islets. Am. J. Physiol. 245 E 38-E 46, 1983.

LONG, C. and MOUAT, B. The binding of calcium ions by erythrocytes and "ghost" cell membranes. Biochem. J. 123: 829-836, 1971.

LULLMANN, H. and SCHWARZ, B. Effects of aminoglycoside antibiotics on bound calcium and contraction in guinea pig atria. Br. J Pharmac. 86: 799-803, 1985.

MALAISSE, W.J. and BOSCHERO, A.C. Calcium antagonists and islet function XI. Effect of nifedipine. Hormone Res. 8: 203-209, 1977.

MALAISSE, W.J. and HERCHUELZ, A. Nutritional regulation of K⁺ conductance: an unsettled aspect of pancreatic beta cell physiology. Biochem. Act. Herm. 2: 62-92, 1982.

MARCHE, P.; OLIVER, B.; GIRARD, A. and MORIN, J.P. Influence des aminoglycosides sur le metabolisme des phosphoinositides dans les tubules rénaux proximaux. Etudes "in vivo" et "in vitro". Path. Biol. 33: 373-376, 1985.

MARTY, A. Ca^{+2} -dependent K^{+} channel with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. Nature. 291: 497-500, 1981.

MARTY, A. TAN, Y.P. and TRAUTMANN, A. Three types of calcium-dependent channel in rat lacrimal glands. J. Physiol. 357: 293-325, 1984.

MARUYAMA, Y.; GALLACHER, D.V. and PETERSEN, O.H. Voltage and Ca^{+2} -activated K^{+} in basolateral acinar cell membranes of mammalian salivary glands. Nature. 302: 827-829, 1983.

MATTHEWS, E.K.; SAKAMOTO, Y. Electrical characteristics of pancreatic islet cells. J. Physiol. 246: 241-437, 1975.

MEISSNER, H.P. 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.

MEISSNER, H.P. and HENQUIN, J.C. Comparison of the effects of glucose, amino acids and sulphonamides on the membrane potential of pancreatic beta cells. In Diabetes 1982, pp 353-359. Ed. E.N. Mngola.

MEISSNER, H.P. and SCHMELZ, H. Membrane potential of beta cells in pancreatic islet. Pflüegers Arch. 351: 195-206, 1974.

NOMA, A. ATP-regulated K^+ channel in cardiac muscle. Nature. 305: 147-148, 1983.

FACE, C.S.; TARVIN, J.T. and SMITH, J.S. Stimulus secretion coupling in beta cells: Modulation by pH. Am. J. Physiol. 244: E3-E8, 1983.

PETERSEN, O.H. and MARUYAMA. Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. Nature. 307: 693-696, 1984.

PITTINGER, C. and ADAMSON, R. Antibiotic blockade of neuromuscular function. Anu. Rev. Pharmacol. 12: 169-181, 1972.

POSNER, P.; MILLER, B.L. and LAMBERT, C.R. Effects of verapamil on fluxes in canine cardiac Purkinje fibre. Eur. J. Pharmacol. 34: 369, 1975.

RORSMAN, P. and TRUBE, G. Glucose dependent K^+ channels in pancreatic beta cells are regulated by intracellular ATP. Pflügers Arch. 405: 305-309, 1985.

SCHEVER, T.; MCHUGH, L.; TEJEDOR, F. and CATTERALL, W. Functional properties of neuroaminidase treated rat brain sodium. J. Biophys. 53: 5 hb abst., 1988.

SEHLIN, J. and TALJEDAL, I.B. Transport of rubidium and sodium in pancreatic islets. J. Physiol. 242: 509-515, 1974.

SEHLIN, J. and TALJEDAL, I.B. Glucose-induced decrease in Rb^+ permeability in pancreatic beta cells. Nature. 253: 635-636, 1975.

SPRUCE, A.E.; STANDEN, N.B. and STANFIELD, P.R. Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. Nature. 316: 736-738, 1985.

STECK, T.L. The organization of protein in the human red blood cell membrane. A review. J. Cell. Biol. 62: 1, 1974.

STIEVE, H. and HARTUNG, K. Kinetics of $^{42}\text{K}^+$ and $^{86}\text{Rb}^+$ loss from the crayfish retina in the dark and the effects of light on the rate of isotope loss. Biochim. Biophys. Acta. 469: 643-649, 1977.

STURGESS, N.C.; ASHFORD, M.L.J.; CARRINGTON, C.A. and Hales, C.N. Single channel recordings of potassium currents in an insulin-secreting cell line. J. Endocr. 102: 201-207, 1986.

STURGESS, N.C.; HALES, C.N. and ASHFORD, L.J. Inhibition of a calcium-activated, non selective cation channel in a rat insulinoma cell line by adenine derivatives. Febs. Leth. 208: 397-400, 1986.

SWAIN, A.W.; KIPLINGER, G.F. and BRONDY, T.M. Actions of certain antibiotics on the isolated dog heart. J. Pharmacol. Exp. Ther. 117: 151-159, 1956.

TULKENS, P. and TROVET, A. The uptake and intracellular accumulation of aminoglycoside antibiotics in lisosomes of cultured rat fibroblast. Biochem. Pharmac. 22: 415-424, 1978.

TRAUTMAN, A. and MARTY, A. Activation of Ca^{+2} -dependent K^{+} channels by carbamoylcholine in rat lacrimal glands. Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 611-615, 1984.

TRUBE, G.; RORSMAN and SHOSAKU, O. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K^{+} channels in mouse pancreatic beta cells. Pflüegers Arch. 407: 493-499, 1986.

UCHIGATA, Y.; SPITALNIK, S.L.; TACHIWARI, O.; SALATA, K.F.
and NOTKINS, A.L. Pancreatic islet cell surface
glycoproteins containing Galb 1-4 Glcnac-R identified
by a cytotoxic mono clonal auto antibody. J. Exp. Med.
165: 124-139, 1987.

VALESCO, J.M. and PETERSEN, H.O. Voltage-activation of
high-conductance K^+ channel in the insulin-secreting
cell line Rinm5f is dependent on local extracellular
 Ca^{+2} concentration. Bioch. Bioph. Acta. 896: 305-310,
1987.

YAMAGUCHI, Y.F.; SATO, Y. and KATHURIA, S. Removal of
sialic acids from the purified insulin receptor
results in enhanced insulin-binding and kinase
activities. Bioch. and Bioph. Res. Com. 129: 3, 1985.

YELLEN, G. Single Ca^{+2} -activated non-selective cation
channel in neuroblastoma. Nature. 296: 357-359, 1982.

WINZLER, R. Carbohydrates in cell surfaces. Int. Rev.
Cytol. 29: 77-125, 1970.