

Este exemplar corresponde a dedução final da
Tese defendida pela candidata Silvana Auxiliadora
Bordin da Silva e aprovada pela comissão julgadora

SILVANA A. BORDIN SILVA

Campinas 21/02/91

Boscher

EFEITOS DA GLICOSE SOBRE A SECREÇÃO DE INSULINA,
EFLUXO DO ^{45}Ca E CONCENTRAÇÃO CITOPLASMÁTICA DO Ca^{2+}
EM ILHOTAS DE LANGERHANS DE RATOS ADULTOS,
RECÉM-ISOLADAS OU MANTIDAS EM CULTURA.

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero†

Si38e

15251/BC

Campinas - São Paulo

1991

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero, por seu intenso trabalho e dedicação à minha formação científica e ao meu preparo profissional.

Aos Profs. Drs. André Herchuelz e Phillippe Lebrun, que me permitiram realizar a parte experimental deste trabalho em seus laboratórios.

A Profa. Dra. Regina Célia Spadari, que primeiro despertou o meu interesse pela fisiologia.

Ao colega Pierre Olivier, pelo auxílio prestado para a execução dos experimentos.

Ao Sr. M. Herman, pela realização das dosagens radioimunológicas de insulina.

Ao Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, UNICAMP, pelas condições oferecidas para a minha formação profissional.

Aos colegas da Pós-Graduação, em especial aos dos Laboratórios de Pâncreas Endócrino e de Adrenoceptores, pelo apoio e amizade.

Aos colegas Angelina Zanesco e Everardo Magalhães Carneiro, pela presença e estímulos constantes.

Aos funcionários do Departamento, em especial ao Lécio pela colaboração no dia-a-dia.

A Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro proporcionado.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para esta luta e que foram, involuntariamente, omitidos aqui.

A minha mãe Doralice, e minha irmã Maria, pelo incentivo e dedicação constantes.

E, finalmente, ao Paulo e ao Aguielo Cunha, por todos estes anos de paciência e compreensão.

Obrigado.

" Les larmes de tous les peuples sont de vraies larmes; les rêves de tous les sages renferment une part de vérité. Tout n'est ici-bas que symbole et que songe.

Les Dieux passent comme les hommes et il ne serait pas bon qu'ils fussent éternels.

La foi qu'on a eue ne doit jamais être une chaîne."

(ERNEST RENAN. Prière sur l'Acropole)

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJETIVOS	9
III. MATERIAL E MÉTODOS	10
IV. RESULTADOS	26
V. DISCUSSÃO	41
VI. RESUMO E CONCLUSÕES	50
VII. ABSTRACT	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

I. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a literatura científica tem acumulado uma grande quantidade de informações a respeito da secreção de insulina "in vitro", em resposta a vários nutrientes, agentes farmacológicos, drogas e hormônios. Neste contexto, a técnica da cultura de tecido aparece como uma potente ferramenta para o estudo, a longo prazo, dos processos funcionais do pâncreas endócrino.

Enquanto que o cultivo de ilhotas de Langerhans provenientes de fetos e recém-nascidos fornece condições para o conhecimento dos processos de maturação do órgão (SWENNE et al., 1980; SORENSON et al., 1987; CREPALDI et al., 1990; BOSCHERO et al., 1990a; BOSCHERO et al., 1991), a manutenção de ilhotas adultas em cultura significa, no mínimo, a possibilidade do estudo da fisiologia e patologia do pâncreas endócrino. Além disso, independentemente de seu estado de maturação, a cultura favorece ainda a obtenção de quantidade adequada de ilhotas destinadas a transplante.

Estas vantagens tornaram imperativo o acesso à cultura de pâncreas endócrino viável.

Embora atrativa, a manutenção de ilhotas adultas em cultura apresenta algumas dificuldades. Historicamente, a tentativa da conservação do tecido insular adulto "in vitro" remonta a algumas décadas. TROWELL (1959), referindo-se à cultura de diferentes tecidos, relatou as dificuldades apresentadas na tentativa de manutenção do pâncreas endócrino maduro em cultura. Assim, observou que pedaços de pâncreas de ratos jovens não sobreviviam em cultura. Após 24 hs, todas as células, inclusive o tecido conectivo e os vasos sanguíneos, desapareceram completamente, permanecendo apenas resquícios de uma estrutura reticular. O mesmo autor sugeriu que as células foram digeridas, provavelmente devido à ativação da tripsina.

Mais tarde, MOSKALEWSKI (1965), eliminando o efeito destrutivo das enzimas liberadas pelo parênquima exócrino (através de digestão pela colagenase), obteve os primeiros resultados positivos em termos de manutenção de ilhotas adultas por longos períodos em cultura. Estudos

posteriores, a respeito da preservação do tecido, indicaram que ilhotas cultivadas por um período de 12 dias não apresentavam sinais óbvios de degeneração ou necrose (ANDERSSON e HELLERSTRÖM, 1972). Sob o aspecto ultraestrutural, comprovou-se que a composição celular era idêntica ao pâncreas endócrino não-cultivado (ANDERSSON et al., 1973; ANDERSSON et al., 1974a), associada a uma boa preservação das organelas celulares, mesmo após 15 dias de cultivo (KOSTIANOVSKY et al., 1972). Tanto estes quanto outros estudos demonstraram que as células insulares, quando mantidas em cultura, são capazes de sintetizar e secretar insulina (ANDERSSON et al., 1976; RABINOVITCH et al., 1978).

Entretanto, sob o ponto de vista funcional, a cultura de tecido pancreático foi - e ainda é - alvo de um grande número de trabalhos. Assim, verificou-se que, a exemplo do pâncreas endócrino adulto normal, ilhotas mantidas em cultura responderam de forma dose-dependente a uma série de moduladores fisiológicos da secreção de insulina. Glucagon, arginina, glutamina, leucina e 2-cetoisocaproato promoveram um aumento na secreção de insulina (RABINOVITCH et

al., 1978; OSTENSON e GRILL, 1986; MALAISSE-LAGAE et al., 1987). Por sua vez, somatostatina e adrenalina inibiram a se creção promovida pela glicose, em células pancreáticas mantida s por 4 semanas em cultura (KAISER et al., 1988). Ilhotas cultivadas mostraram-se também responsivas a outros efetores que, conhecidamente, potencializam a secreção de insulina, tais como IBMX (RABINOVITCH et al., 1978; KAISER et al., 1988), teofilina (ANDERSSON et al., 1976; LACY et al., 1976; MALAISSE-LAGAE et al., 1987), forskolin, e a associação de TPA mais glicazida (MALAISSE-LAGAE et al., 1987). Estes dados indicam que tanto a atividade da adenilato ciclase quanto a produção de AMPc puderam ser estimuladas nas ilhotas mantidas "in vitro".

No que se refere aos efeitos de seu prin cipal secretagogo - i.e., D-glicose-, vários parâmetros meta bólicos estudados, como o coeficiente respiratório (ANDERSSON et al., 1976), taxa de utilização da glicose (MALAISSE-LAGAE et al., 1987), o conteúdo de AMPc (RABINOVITCH et al., 1978), e o estado redox dos sistemas NADPH-NADP e GSH-GSSG (VERSPOHL et al., 1988) mostraram-se

alterados com a cultura. Basicamente, estas alterações estão estreitamente relacionadas com a concentração de glicose no meio de cultura. Desta forma, a exposição por períodos superiores a 20 hs, em altas concentrações de glicose, provocaram, além de um possível efeito glicotóxico, uma acentuada elevação na atividade metabólica das células, resultando num processo de exaustão. Por sua vez, baixas concentrações de glicose diminuíram a sensibilidade da célula à hexose (para revisão, vide NIELSEN, 1985). Estudos eletrofisiológicos demonstraram que também os fenômenos elétricos parecem ser dependentes da concentração de glicose no meio de cultura. PACE et al. (1978) observaram que o cultivo, em concentração de glicose igual ou inferior a 4,2 mM, promoveu diminuição na magnitude do potencial de membrana de células beta pancreáticas. Nesta mesma condição, as células mostraram-se refratárias a despolarização pela glicose.

Apesar da manutenção da síntese de insulina, bem como da responsividade a diferentes estudos de secreção dinâmica indicaram alterações na magnitude da resposta secretória a vários secretagogos, em especial a

própria glicose (RABINOVITCH et al., 1978; VERSPOHL et al., 1988; BORDIN et al., 1990; BOSCHERO et al., 1990b). Devido a importância da manutenção de ilhotas em cultura, tem sido publicado um grande número de trabalhos com enfoque principal na tentativa de se eliminar os efeitos deletérios da mesma. Recentemente, alguns autores relataram uma melhoria (embora parcial) na resposta secretória, quando da utilização de inibidores do crescimento de fibroblastos (KAISER et al., 1988; AOKI et al., 1988).

A despeito do declínio na resposta secretória à glicose, ilhotas cultivadas têm servido como modelo experimental para uma série de pesquisas. Dentre estas, pode-se destacar o estudo dos efeitos de agentes diabetogênicos (EIZIRIK e SANDLER, 1988; EIZIRIK et al., 1988; ZUCKER e ARCHER, 1988), da resposta imunológica celular (SZOPA et al., 1986; DEBRAY-SACHS et al., 1988; RABINOVITCH et al., 1988), da biossíntese proteica (SANDLER e ANDERSSON, 1986; WELSH et al., 1986), e do metabolismo de fosfolípidos (DUNLOP et al., 1986; BIDEN et al., 1987).

Mais recentemente, o problema da

diminuição da secreção foi retomado por vários pesquisadores, não no sentido de reverter a redução da resposta, mas sim de entender qual ou quais etapas da secreção estariam alteradas; desta forma, esta anomalia pôde propiciar um modelo de estudo.

BOSCHERO et al. (1988) observaram que, apesar da resposta secretória à glicose se apresentar diminuída, ilhotas cultivadas durante uma semana preservaram a capacidade de reduzir o efluxo do ^{86}Rb , frente a estimulação pela glicose. Esta observação foi confirmada por VERSPOHL et al. (1988), em ilhotas mantidas por 14 dias em concentração fisiológica de glicose. Da mesma maneira, tolbutamida, que, na célula beta, bloqueia os canais de K^+ modulados pelo ATP, reduziu o efluxo do ^{86}Rb em ilhotas cultivadas com igual magnitude que em ilhotas recém-isoladas (BOSCHERO et al., 1990c). Por outro lado, VERSPOHL et al. (1988) constataram ainda uma significativa redução na incorporação do ^{45}Ca estimulada pelo açúcar, em ilhotas mantidas "in vitro" por 5 dias. Neste mesmo sentido, esta diminuição na incorporação do ^{45}Ca coincide com as observações de HOENIG et al.

(1989), que registraram uma redução na capacidade de ligação da ^3H -nitrendipina em células pancreáticas tumorais mantidas em cultura, em relação às células recém-isoladas. Segundo estes autores, a redução no "binding" refletiu uma diminuição no número e/ou sensibilidade dos canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem.

Considerando as evidências de alterações na incorporação do ^{45}Ca e no aspecto funcional dos canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem, parece-nos de grande importância investigar, em ilhotas pancreáticas cultivadas, as alterações no manuseio do Ca^{2+} induzido pela glicose.

II. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo comparar os efeitos da glicose sobre a secreção de insulina, o efluxo do ^{45}Ca e a concentração citoplasmática de Ca^{2+} , entre ilhotas de ratos recém-isoladas e mantidas em cultura por 5 a 7 dias.

III. MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foram utilizadas ilhotas de Langerhans de ratos, recém-isoladas ou cultivadas durante 5 a 7 dias, avaliando-se a secreção dinâmica de insulina, o efluxo do ^{45}Ca e a concentração citoplasmática do Ca^{2+} . Devido à multiplicidade das técnicas empregadas, optou-se pela descrição inicial das soluções, seguida da descrição dos métodos utilizados.

1. MATERIAL

1.1 - Animais

Foram utilizadas ratas* (Rattus norvegicus, var. albina) Wistar, de 2 a 3 meses de idade, pesando entre 180 a 250 gramas. Os animais foram mantidos em condições de fotoperíodo controlado (12 x 12 h) até sua utilização. Água e ração foram fornecidas "ad libitum".

* procedência: Proefdieren Centrum (Heverlee, Bélgica)

1.2 - Soluções

1.2.1 - Solução para isolamento de ilhotas.

Utilizou-se para o isolamento das ilhotas uma solução de Hanks contendo a seguinte composição iônica (em mM): Na^+ , 141,5; K^+ , 5,8; Ca^{2+} , 1,3; Mg^{2+} , 0,8; Cl^- , 143,6; HCO_3^- , 4,2; HPO_4^{2-} , 0,3; SO_4^{2-} , 0,8; H_2PO_4^- , 0,4. O pH da solução foi ajustado em 7,4 com carbogênio (95% O_2 : 5% CO_2 , v/v) (HANKS e WALLACE, 1949). No isolamento de ilhotas destinadas ao cultivo, utilizou-se solução de Hanks assepticamente preparada, acrescida de penicilina (100 UI / ml) e estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Gibco, Gent, Bélgica).

1.2.2 - Solução para lavagem, incubação e perfusão das ilhotas.

A solução utilizada para lavagem, incubação e perfusão das ilhotas de Langerhans consistiu basicamente de uma solução de Krebs composta de (em mM): Na^+ , 139,0; K^+ , 5,0; Ca^{2+} , 2,6; Mg^{2+} , 1,0; Cl^- , 123,6; HCO_3^- , 24,0 (KREBS e HENSELEIT, 1932). Para se aumentar a captação de

^{45}Ca durante o período de incubação, optou-se por uma solução de Krebs modificada, onde a adição de Ca^{2+} foi suprimida. Antes da sua utilização, esta solução foi enriquecida com albumina bovina dializada (Gibco, Gent, Bélgica), em concentração de 0,5 % (m/v), sendo em seguida equilibrada e mantida em pH 7,4 através de gaseamento com carbogênio.

1.2.3 - Solução para isolamento e recuperação das células.

No processo enzimático utilizado para a dissociação e o isolamento das células insulares foi empregada uma solução de Earle tamponada com HEPES-NaOH - denominada solução Earle-HEPES (PIPELLERS et al., 1985), composta de (em mM): Na^+ , 139,3; K^+ , 5,4; Mg^{2+} , 0,8; Cl^- , 129,4; SO_4^{2-} , 0,8; HCO_3^- , 14,3; HEPES, 10,0; glicose, 2,8, e equilibrada em pH 7,4 com NaOH e carbogênio. Ligeiras modificações nesta solução - utilizadas em determinadas etapas do isolamento - serão indicadas na descrição do método. Após o isolamento, as células foram recuperadas numa solução composta do meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Gent, Bélgica) com 0,5 % de albumina bovina dializada (m/v), 2,3 mM de

glutamina (Gibco, Gent, Bélgica) e 5,6 mM de glicose.

1.2.4 - Solução fluorimétrica.

A solução de incubação, ou solução fluorimétrica, consistiu de uma solução de Krebs-Ringer tamponada com HEPES-NaOH, composta de (em mM): Na^+ , 115,0; K^+ , 5,0; Mg^{2+} , 1,0; Ca^{2+} , 2,6; Cl^- , 123,6; HEPES, 25,0, acrescida de 0,5 % de albumina bovina dializada (m/v). O pH desta solução foi ajustado em 7,5 com NaOH, e sua composição gasosa equilibrada com ar ambiente.

1.2.5 - Meio de cultura.

Parte das ilhotas isoladas por digestão pela colagenase (vide métodos) foi cultivada em uma mistura dos meios de cultura BME* e DMEM** (Gibco, Gent, Bélgica), na razão volumétrica de 5:2, respectivamente, resultando na seguinte composição inorgânica (em mM): Na^+ , 146,7; K^+ , 5,4; Ca^{2+} , 1,8; Mg^{2+} , 1,3; Cl^- , 121,6; SO_4^{2-} , 1,3; HCO_3^- , 31,3; H_2PO_4^- , 1,0, e concentração final de glicose de 10,5 mM. Este meio foi suplementado com soro de boi recém

* Basal Medium Eagle

**Dulbecco's Modified Eagle Medium

nascido (10 %, v/v) (Gibco Gent, Bélgica), penicilina (100 UI/ml) e estreptomicina (100µg/ml).

Todos os sais utilizados para a preparação dos tampões foram de grau analítico.

2. MÉTODOS

2.1 - Isolamento das ilhotas

O isolamento das ilhotas consistiu na destruição seletiva do parênquima exócrino de pâncreas, através da técnica de digestão por colagenase, descrita por LACY e KOSTIANOVSKY (1967).

Os animais foram sacrificados por decapitação e, após incisão abdominal, ocluiu-se a extremidade duodenal do ducto biliar comum, seguida da inserção de um cateter através de uma pequena incisão na parte proximal (hepática) deste ducto. Através de uma seringa conectada ao cateter, injetou-se solução de Hanks no pâncreas, até que este se

encontrasse suficientemente intumescido, sendo então excisado e transferido para uma placa de Petri contendo solução de Hanks. Nesta placa, o pâncreas foi dissecado de gorduras, da maioria do tecido vascular e dos gânglios linfáticos. Para cada experimento foram usados, em média, 4 pâncreas.

A seguir, os pâncreas foram cortados em pedaços de aproximadamente $0,5 \text{ mm}^3$, lavados com solução de Hanks e transferidos para um tubo de ensaio contendo 8 mg de colagenase/pâncreas (Boehinger, Mannheim, GmbH, Alemanha) . Este tubo permaneceu por 20 min em banho-maria a 37°C , com seu conteúdo agitado continuamente pelo borbulhamento de carbogênio. Após este período, o tubo foi agitado manualmente por aproximadamente 1,5 min, e a interrupção do procedimento foi feita por controle visual da viscosidade. Ao final do tratamento, o conteúdo do tubo foi transferido para um béquer e diluído com solução de Hanks. As ilhotas foram lavadas várias vezes, separadas por sedimentações sucessivas e, em seguida, coletadas individualmente sob lupa, com auxílio de uma pipeta Pasteur estirada e previamente siliconizada.

2.2 - Cultura das ilhotas

Após o isolamento, parte das ilhotas foi transferida para placas de Petri plásticas, de 100 mm de diâmetro (Nunc, Dinamarca), contendo 6 ml do meio de cultura (descrito previamente). Estas placas foram mantidas em uma incubadora de tecido a 37°C, em atmosfera umidificada e sob gaseamento contínuo, com mistura ar:CO₂ (5%), pH 7,4. O meio de cultura foi renovado a intervalos regulares de 48 hs; os antibióticos foram retirados do meio pelo menos 24 h antes do experimento.

2.3 - Efluxo de ⁴⁵Ca e secreção de insulina de ilhotas perfundidas

2.3.1 - Aparelhagem.

O sistema de perfusão consistiu de (i) 2 banhos-maria, mantidos à temperatura constante através de termostato (Braun, Helsinguer, Alemanha); (ii) uma bomba peristáltica de 4 canais (Minipuls 2, Gilson Medical Electronics, França); e (iii) um coletor de frações (TDC 220 ,

Gilson Electronics, França). Os banhos-maria, dispostos anterior e posteriormente à bomba peristáltica, foram mantidos em temperaturas de 39 e 37°C, respectivamente. O banho que precedia a bomba continha os recipientes com as soluções de perfusão. Estas, por sua vez, foram continuamente gaseadas com carbogênio. O pH das soluções de perfusão, medido antes e após cada experimento, foi mantido em 7,4. Uma válvula de 4 vias (Hamilton, Bonaduz, Suíça) permitiu introduzir nas câmaras solução de perfusão proveniente dos diferentes recipientes (i.e., soluções de diferentes composições). O segundo banho-maria, posposto à bomba e precedendo o coletor de frações, acondicionou as 4 câmaras de perfusão (Swinnex SX 000/300, Millipore, França). No interior destas câmaras foram colocados filtros de acetato de celulose (SCWP 01300, 8 μm , Millipore, França), sobre os quais as ilhotas foram depositadas. Às 2 extremidades das câmaras conectaram-se tubos de "tygon" em dimensões-padrão, calibrados para taxa de fluxo de 1,2 ml/min (Technicon Instrument Corporation, NY, EUA). O efluente foi coletado, minuto a minuto, em tubos de ensaio.

Este sistema de perfusão permitiu a manutenção da temperatura e pressão constantes no sistema (LEBRUN, 1987). O espaço morto entre a válvula e a extremidade das câmaras foi devidamente computado na elaboração dos gráficos.

2.3.2 - Protocolo experimental.

Para cada experimento, foram coletados 4 grupos de 100 ilhotas em frascos de 1,5 ml. Após a remoção do sobrenadante, acrescentou-se a cada frasco 125 μ l do meio de incubação (solução 1.2.2) contendo 200 μ Ci/ml de $^{45}\text{CaCl}_2$ (Radiochemical Center, Amersham, Grã-Bretanha), correspondendo a aproximadamente 50 a 70 μ M de ^{45}Ca). Os frascos contendo as ilhotas foram incubados na presença do radioisótopo durante 90 min em banho-maria a 37°C, e gaseados com carbogênio. Finda a incubação, as ilhotas foram lavadas 4 vezes com solução de incubação não-radioativa, sendo a seguir transferidas para as respectivas câmaras de perfusão. Após a retirada de bolhas de ar do interior das câmaras, estas foram conectadas ao sistema, quando teve início a perfusão.

Um período inicial de 30 min, denominado período de equilíbrio, precedeu a coleta do efluente das câmaras. O meio provindo do primeiro reservatório perfundiu as ilhotas até o 44º min, e o do segundo até o 90º min, quando a perfusão foi interrompida. A coleta das amostras teve início no 31º min, encerrando com o final da perfusão. Mudanças na composição das soluções de perfusão serão indicadas no capítulo Resultados.

Os tubos de coleta contendo o perfusato foram rapidamente resfriados, por imersão em um banho de água e gelo. De cada tubo de coleta transferiu-se 0,6 ml para frascos de contagem contendo 5 ml de líquido de cintilação (Aquasol 2, Lumac, Holanda). A avaliação da radioatividade dos frascos foi realizada em um contador de cintilação líquida (TRICARB 460C, Packard Instrument Co. Inc., EUA). O restante das amostras foi conservado a -20°C, para posterior dosagem de insulina.

A dosagem de insulina foi realizada segundo o método radioimunológico descrito por HERBERT et al. (1965).

2.4 - Avaliação da concentração citosólica de Ca^{2+} através do fura 2/AM*

2.4.1 - Isolamento das células.

Ao final do isolamento das ilhotas (descrito anteriormente), prosseguiu-se a digestão enzimática do tecido, até a obtenção de células isoladas. Para isso, grupos de 800 a 1200 ilhotas foram lavados com solução Earle-HEPES. Em seguida, as ilhotas foram re-suspensas e incubadas em 0,8 ml desta solução contendo 1mM de EGTA, durante um período de 30 min, a temperatura ambiente. Após este período, as ilhotas foram re-suspensas por aproximadamente 20 vezes, com o auxílio de uma pipeta semi-automática (Gilson Medical Electronics, França). A seguir, as ilhotas foram transferidas para um tubo de ensaio contendo 1 ml da mesma solução, acrescida de 18 mg de dispase (grau II, Sigma Chem. Co., St. Louis, EUA). Nesta solução, re-suspendeu-se novamente as ilhotas, agora mais rapidamente, durante 1,5 min.

O grau de dissociação das ilhotas foi conferido pela observação, ao microscópio, de amostras da

*fura 2-acetoximetilester

suspensão, coradas com vermelho neutro (Sigma Chem. Co., EUA). Caso as células não se encontrassem completamente separadas, repetia-se o processo de re-suspensão em solução contendo dispase por mais alguns segundos. Em seguida, as células foram lavadas por centrifugação (500 x g) em solução Earle-HEPES, enriquecida com 4% de albumina dializada (m/v). A viabilidade das células, avaliada por exclusão com "trypan blue" (Sigma Chem. Co., EUA), foi de mais de 90%, tanto para células de ilhotas recém-isoladas, quanto para as cultivadas. Após o isolamento, as células foram incubadas durante 1h em 0,5 ml do meio de recuperação (solução 1.2.3), a 37°C, em uma câmara de incubação. Antes da marcação com o corante, mediu-se a fluorescência basal (BG) das células, a qual foi descontada dos valores de fluorescência obtidos durante o experimento.

2.4.2 - Protocolo experimental.

Após a medição do BG, as células foram incubadas durante 45 min em 1,5 ml do meio de recuperação,

ao qual foi adicionado fura 2/AM (Molecular Probes, EUA) suficiente para se atingir uma concentração final de 4 μM . O tubo de incubação foi revestido com papel alumínio, a fim de se evitar a degradação do corante pela incidência de luz. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com solução fluorimétrica (solução 1.2.4), e transferidas para uma cubeta de quartzo contendo 0,75 ml da mesma solução. A fluorescência do fura 2 contido nas células foi medida usando-se um espectrofluorímetro (LS5, Perkin-Elmer, EUA). Durante o experimento, o suporte da cubeta foi mantido a 37°C, e as células permaneceram em suspensão contínua através de um agitador magnético. Os comprimentos de onda de excitação foram de 340 e 380 nm, e o de emissão de 510 nm.

A medição fluorimétrica teve início após 10 a 15 min de um período de equilíbrio, tempo esse necessário para a obtenção de uma linha de base estável no registro. Após o período de equilíbrio, a fluorescência do fura 2 extracelular foi estimada através da adição de 50 μM de MnCl_2 (McDONOGH e BUTTON, 1989). A redução na fluorescência causada pela ligação do Mn^{2+} ao fura 2 foi utilizada para

calcular a contribuição do fura 2 extracelular na fluorescência total, a qual foi subtraída da fluorescência obtida durante o experimento. Em seguida, o Mn^{2+} adicionado foi quelado pela adição de $100 \mu M$ de DTPA*.

A calibração da fluorescência do fura 2 foi realizada ao final de cada experimento, como descrito previamente (WOLLHEIM e BIDEN, 1986). Para isto, adicionou-se sucessivamente a cubeta, Triton X (0,1%) que permitiu a saturação do fura 2 pelo Ca^{2+} extracelular (para a obtenção do R_{max}), e 20 mM de EGTA tamponado em pH 8,3 com Tris, a fim de se remover o Ca^{2+} do complexo Ca^{2+} -fura 2 (para a obtenção do R_{min}).

Embora cada volume adicionado a cubeta não tenha ultrapassado 5% de seu volume total, o efeito da diluição das substâncias testadas foi medido em cada experimento.

Para o cálculo da concentração de Ca^{2+} , assumiu-se um Kd para o complexo Ca^{2+} -fura 2 de 224nM a 37°C (GRYNKIEWCZ et al., 1985). A concentração citosólica de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) foi calculada segundo GRYNKIEWCZ et al. (1985),

* ácido dietilenotriaminopentaacético

considerando os valores obtidos em 340 (λ_1) e 380 (λ_2) nm ,
através da equação:

$$|Ca^{2+}| = Kd \cdot \frac{R - Rmin}{Rmax - R} \cdot \frac{Sf2}{Sb2} , \text{ onde:}$$

- $|Ca^{2+}|$ = concentração registrada de Ca^{2+} citosólico livre;
- Kd = constante de dissociação efetiva do complexo Ca^{2+} -
fura 2;
- R = razão entre as intensidades de fluorescência F_1 e
 F_2 , que equivalem às intensidades de fluorescência
obtidas em λ_1 e λ_2 , respectivamente.
- Rmin = valor limite que R pode ter quando Ca^{2+} é igual a
zero, equivalendo, assim, ao valor obtido na pre-
sença de Tris-EGTA;
- Rmax = valor de R na saturação do Ca^{2+} , i.e., na presen-
ça de Triton X; e,
- $\frac{Sf2}{Sb2}$ = razão entre os coeficientes de proporcionalidade
para a medição do corante livre e ligado ao Ca^{2+} ,
respectivamente, em λ_2 .

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos pelos valores médios e seus respectivos erros padrões das médias. A análise estatística foi realizada empregando-se o teste "t" de Student para amostras não pareadas.

Para cada grupo experimental, os valores basais da secreção de insulina e dos efluxos do ^{45}Ca foram calculados a partir da média encontrada dos 5 pontos que antecederam a estimulação (i.e., min 40^o-44^o). Os valores médios da secreção e do efluxo do ^{45}Ca foram obtidos a partir da média dos pontos após a estimulação, previamente subtraídos de seus respectivos valores basais.

IV. RESULTADOS

EFEITO DA GLICOSE SOBRE O EFLUXO DE ^{45}Ca E SECREÇÃO DE INSULINA DE ILHOTAS PANCREÁTICAS RECÉM-ISOLADAS OU CULTIVADAS POR 5 A 7 DIAS.

A figura 1 ilustra o efeito do aumento da concentração de glicose no meio perfusor, de zero para 16,7mM, sobre o efluxo do ^{45}Ca (fig. 1-A) e a secreção de insulina (fig. 1-B) de ilhotas recém-isoladas (círculos vazios) e ilhotas mantidas em cultura (círculos cheios). Na ausência de glicose, a secreção basal de insulina (min 40°-44°) foi estável nos dois tipos de preparação, apresentando valores médios de $0,41 \pm 0,05$ (média \pm SEM, n=5) e $0,29 \pm 0,04$ U/ilhota por min (n=6) para ilhotas frescas e cultivadas, respectivamente ($p > 0,05$).

Nas ilhotas controle (recém-isoladas), o aumento na concentração de glicose provocou uma resposta secretória de aspecto bifásico, caracterizada por um pico

inicial transitório (min 45^o-51^o), seguido de um aumento progressivo e duradouro da secreção (min 51^o-90^o). O acréscimo na secreção, relativo ao primeiro pico, isto é, 4 a 5 min após a adição de glicose, correspondeu a uma variação (acima do basal) de $1,77 \pm 0,33 \mu\text{U/ilhota por min}$ (n=5). Por sua vez, a secreção média de insulina, após correção do correspondente à secreção basal (min 40^o-44^o), foi de $2,07 \pm 0,20 \text{ U/ilhota por min}$ (n=5).

Por outro lado, ilhotas cultivadas, quando submetidas a estimulação pela glicose (16,7 mM), secretaram menor quantidade de insulina em ambas as fases, comparadas aos níveis apresentados pelas ilhotas controle. O primeiro pico, registrado também no 5^o min de estimulação, alcançou valores de $0,63 \pm 0,14 \mu\text{U/ilhota por min}$ (n=6), diferindo estatisticamente daquele apresentado pelas ilhotas controle ($p < 0,001$). A exemplo da primeira, a segunda fase da secreção também se apresentou severamente reduzida nas ilhotas cultivadas. Os valores médios obtidos de secreção de insulina foram de $0,70 \pm 0,05 \text{ U / ilhota por min}$, diferentes daqueles observados para

ilhas controle ($p < 0,001$).

A glicose provocou igualmente modificações importantes no efluxo do ^{45}Ca de ilhotas perfundidas. A figura 1-A ilustra as alterações no efluxo do ^{45}Ca , induzidas pela glicose, registradas concomitantemente à secreção de insulina. Nota-se que, nas ilhotas controle, a glicose provocou 3 modificações no efluxo do ^{45}Ca , padrão este classicamente descrito na literatura (HERCHUELZ e MALAISE, 1978).

Durante o período basal - compreendido entre os min 40° e 44° -, nenhuma diferença foi observada no efluxo do ^{45}Ca entre os 2 grupos ($p > 0,95$). Estes valores foram de $0,97 \pm 0,08$ (n=5) e $0,98 \pm 0,06$ (n=5) % por min, respectivamente para ilhotas recém-isoladas e cultivadas.

A adição de glicose ao meio perfusor (min 44°) induziu uma rápida redução no efluxo do isótopo. Os valores registrados no nadir, observados simultaneamente nos 2 grupos (min 46° da perfusão), atingiram $0,36 \pm 0,03$ (n=5) e $0,25 \pm 0,04$ (n=5) % por min, para ilhotas frescas

e cultivadas, respectivamente ($p < 0,05$).

Após esta rápida redução, o efluxo do ^{45}Ca elevou-se significativamente nos 2 tipos de ilhotas. Os valores registrados no zênite, após subtração do efluxo basal, foram semelhantes entre si, atingindo $0,68 \pm 0,13$ % por min ($n=5$) nas ilhotas controle (min 50°) e $0,62 \pm 0,05$ % por min ($n=5$) nas ilhotas cultivadas (min 51°) ($p > 0,6$).

Da mesma forma, nenhuma diferença estatística foi verificada nas variações máximas do efluxo do ^{45}Ca , ou seja, nas diferenças entre zênite e nadir. Estes valores atingiram $1,04 \pm 0,11$ ($n=5$) e $0,87 \pm 0,06$ % por min ($n=5$), respectivamente em ilhotas controle e cultivadas ($p > 0,2$).

Entretanto, nas ilhotas cultivadas observou-se diferenças quanto a fase subsequente do efluxo do ^{45}Ca . Neste tipo de preparação, a bifasicidade habitual do efluxo, em resposta à glicose, foi perdida. Assim, o decaimento normal na taxa de efluxo do ^{45}Ca , apresentado por estas ilhotas, apareceu precocemente em relação ao grupo controle. O efluxo médio de ^{45}Ca , observado durante a exposição à

glicose (após correção do basal), variou de $0,24 \pm 0,04$ % por min (n=5) nas ilhotas controle e $0,07 \pm 0,03$ % por min (n=5) nas ilhotas cultivadas ($p < 0,02$).

Para melhor avaliar a influência da cultura de tecido na ação inibitória inicial da glicose sobre o efluxo do ^{45}Ca , os experimentos ilustrados na figura 1 foram repetidos utilizando-se meio perfusor sem a adição de Ca^{2+} , contendo 0,5 mM de EGTA (fig. 2). Esta condição experimental é utilizada para evidenciar o efeito inibitório da glicose sobre o efluxo do referido isótopo, já que suprime o aumento secundário no efluxo do ^{45}Ca .

Antes da administração da glicose (min 40-44), a taxa basal de efluxo do ^{45}Ca foi similar nos 2 grupos experimentais, ou seja, $1,01 \pm 0,08$ % por min (n=6) nas ilhotas frescas e $1,10 \pm 0,06$ % por min (n=4) nas ilhotas cultivadas ($p > 0,4$).

Em ambos os grupos de ilhotas, 16,7 mM de glicose provocou uma rápida e significativa redução no efluxo do ^{45}Ca , que se manteve por todo o período de perfusão. A magnitude da redução foi idêntica nas 2 preparações, atingin

do valores de $0,57 \pm 0,04\%$ por min (n=6) em ilhotas controle e $0,64 \pm 0,06\%$ por min (n=4) em ilhotas cultivadas ($p > 0,3$).

Da mesma forma, o efluxo médio encontrado entre os min 12° e 21° - após o início da estimulação - atingiu valores similares, ou seja, $0,44 \pm 0,04\%$ por min (n=6) nas ilhotas controle e $0,46 \pm 0,03\%$ por min (n = 4) nas cultivadas ($p > 0,4$).

EFEITO DA CARBAMILCOLINA SOBRE O EFLUXO DO ^{45}Ca DE ILHOTAS RECÉM-ISOLADAS OU CULTIVADAS.

Os efeitos de $200\ \mu\text{M}$ de carbamilcolina sobre o efluxo do ^{45}Ca de ilhotas frescas ou ilhotas mantidas em cultura, perfundidas na presença de $5,6\ \text{mM}$ de glicose, estão ilustrados na figura 3.

Na ausência de carbamilcolina (min 40° - 44°), o efluxo de ^{45}Ca apresentou médias de $0,64 \pm 0,02$ e $0,86 \pm 0,03\%$ por min (n=6, em ambos os grupos) para ilhotas controle e cultivadas, respectivamente ($p < 0,001$).

Observa-se que o efeito da carbamilcolina foi máximo no 1º minuto da estimulação, seguido da retomada dos valores basais de efluxo nos 3 ou 4 minutos seguintes. O incremento no efluxo foi semelhante nos 2 tipos de preparação, medindo $1,53 \pm 0,07$ % por min para ilhotas frescas e $1,52 \pm 0,14$ % por min para ilhotas cultivadas (n=6, para cada grupo; $p > 0,9$); porém, foram significativamente diferentes dos seus respectivos valores basais ($p < 0,001$, em ambos os casos).

EFEITOS DA GLICOSE E DO KCl NA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DO FURA 2 DE CÉLULAS OBTIDAS DE ILHOTAS RECENTEMENTE ISOLADAS OU CULTIVADAS.

As figuras 4 e 5 ilustram, respectivamente, os efeitos de 50 mM de KCl e 16,7 mM de glicose sobre a fluorescência registrada em células obtidas de ilhotas cultivadas (figs. 5-A e 4-A) e recém-isoladas (figs. 5-B e 4-B), previamente incubadas com o corante bioluminescente fura 2.

Nos 2 tipos de preparação, 50 mM de KCl induziu um aumento imediato na fluorescência (fig. 5). As variações percentuais foram de $99,3 \pm 4,4 \%$ (n=3) e $31,5 \pm 2,5 \%$ (n=3), respectivamente para células provenientes de ilhotas recém-isoladas e de ilhotas cultivadas ($p < 0,002$).

Por sua vez, o aumento na concentração de glicose de 2,8 para 16,7 mM, provocou uma lenta elevação na fluorescência, a qual atingiu valores máximos, em ambas as preparações, 3 a 4 minutos após a adição de glicose (fig. 4). Células de ilhotas controle apresentaram variações de $76,8 \pm 3,7 \%$ (n=3), enquanto que nas células cultivadas estes valores foram de $33,3 \pm 5,6 \%$ (n=3; $p < 0,01$).

A partir dos registros de fluorescência, as $|\text{Ca}^{2+}|_i$ dos 2 grupos experimentais foram calculadas segundo GRINKIEWSK et al. (1985) (descrito anteriormente). A tabela I resume os valores nominais das $|\text{Ca}^{2+}|_i$, antes e durante a estimulação. Observa-se que os valores basais, tanto das células controle quanto das cultivadas, foram semelhantes entre si, seja na ausência ou presença de 2,8 mM de glicose. Desta forma, nas células provenientes de ilhotas

controle os valores de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ atingiram 112 ± 3 nM (n=3) e 122 ± 15 nM (n=3), na ausência e na presença de 2,8 mM de glicose, respectivamente ($p > 0,5$). Por outro lado, células de ilhotas cultivadas apresentaram médias de 138 ± 38 nM (n=3) e 144 ± 15 nM (n=3), respectivamente na ausência e na presença de 2,8 mM de glicose ($p > 0,8$).

Após a estimulação pela glicose, as concentrações de Ca^{2+} atingiram 215 ± 22 nM (n=3) nas células controle e 191 ± 12 nM (n=3) nas células cultivadas ($p < 0,01$). A despolarização pelo K^+ induziu um aumento de 112 ± 3 nM para 223 ± 10 nM (n=3) nas células recém-isoladas e de 138 ± 38 nM para 181 ± 47 nM (n=3) nas células cultivadas ($p < 0,002$).

Em ambos os tipos de preparação, os aumentos na $[\text{Ca}^{2+}]_i$, induzidos pelo KCl ou pela glicose, foram abolidos pela adição de 50 μM de D600 (figs. 4 e 5).

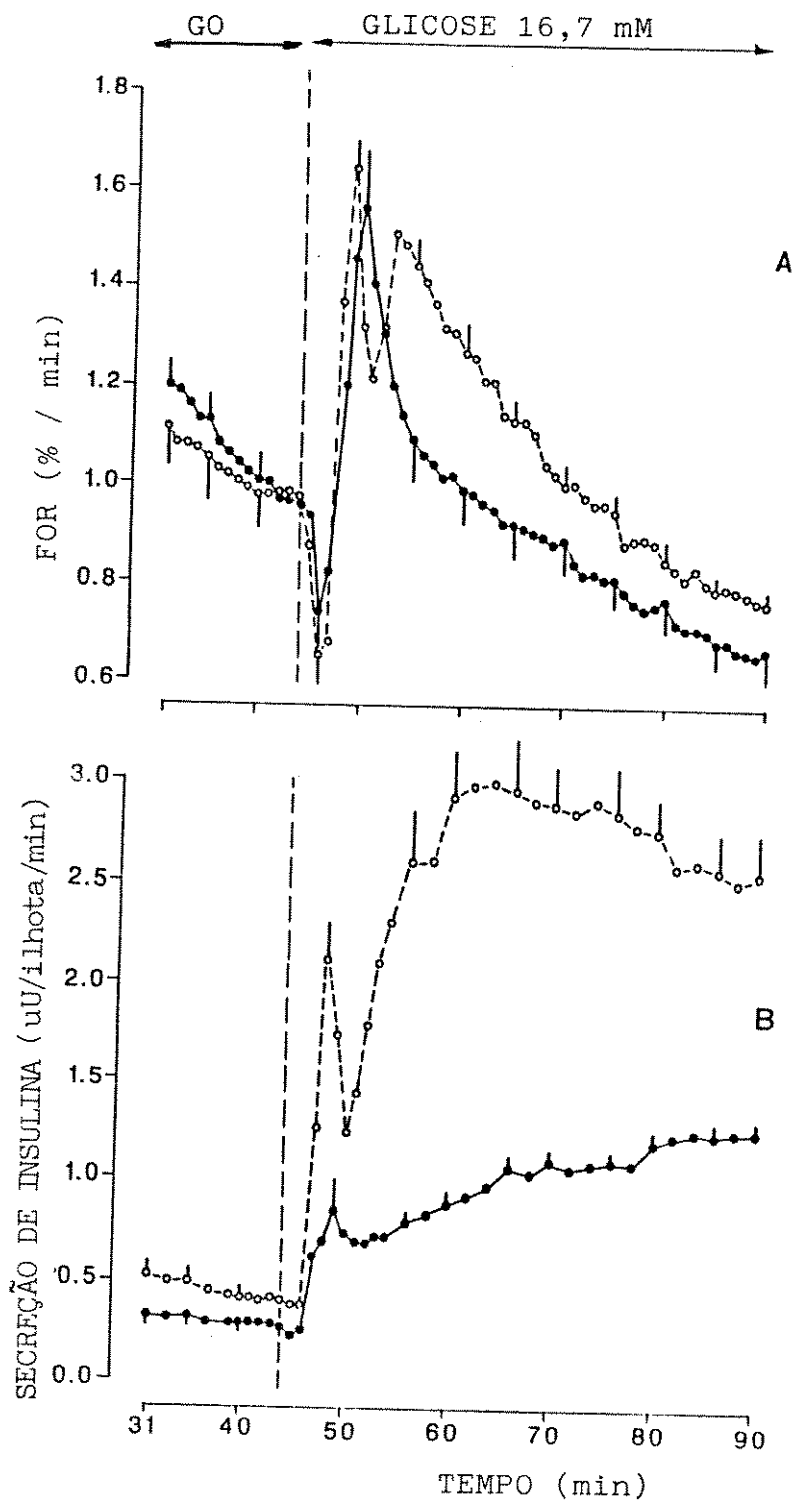


Figura 1. Efeito de 16,7 mM de glicose sobre a taxa de efluxo fracional (FOR) (gráfico superior) e a secreção de insulina (gráfico inferior) de ilhotas recém-isoladas (o--o) e cultivadas (●--●), com o meio de perfusão contendo 2,56mM de Ca^{2+} . Os valores médios (\pm SEM) se referem a 5 experimentos.

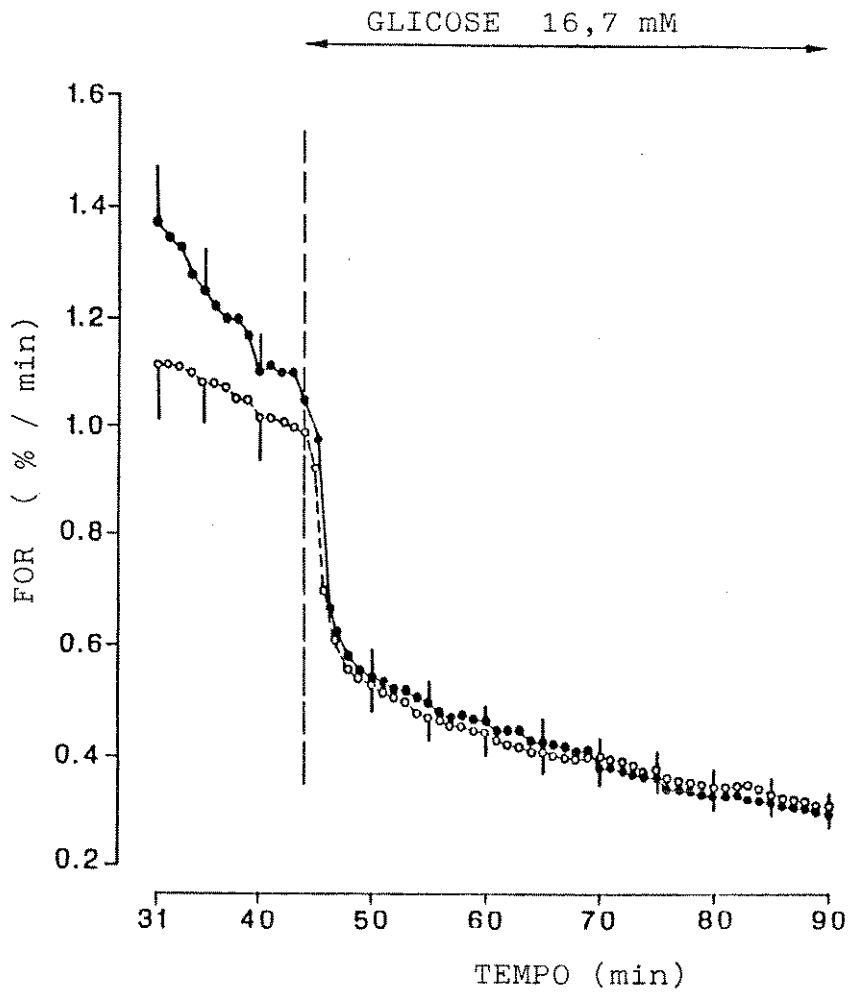


Figura 2. Efeito de 16,7 mM de glicose sobre a taxa de efluxo fracional (FOR) de ilhotas recém-isoladas (o--o) e cultivadas (●--●). O meio de perfusão foi suprimido em Ca^{2+} e enriquecido com 0,5 mM de EGTA. Os valores médios (\pm SEM) se referem a 6 experimentos.

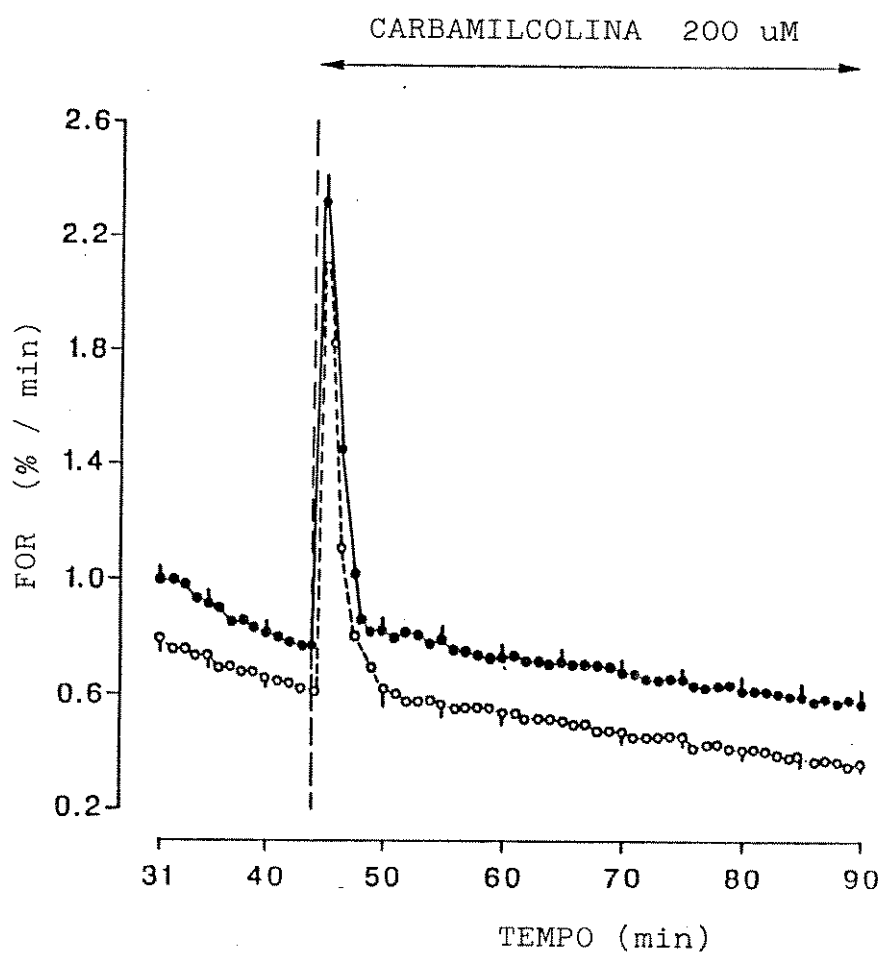


Figura 3. Efeito de 200 uM de carbamilcolina sobre a taxa de efluxo fracional (FOR) de ilhotas recém-isoladas (o--o) e cultivadas (●--●), com o meio de perfusão contendo 2,56 mM de Ca^{2+} e 5,6 mM de glicose. Os valores médios (\pm SEM) se referem a 4 e 6 experimentos, respectivamente.

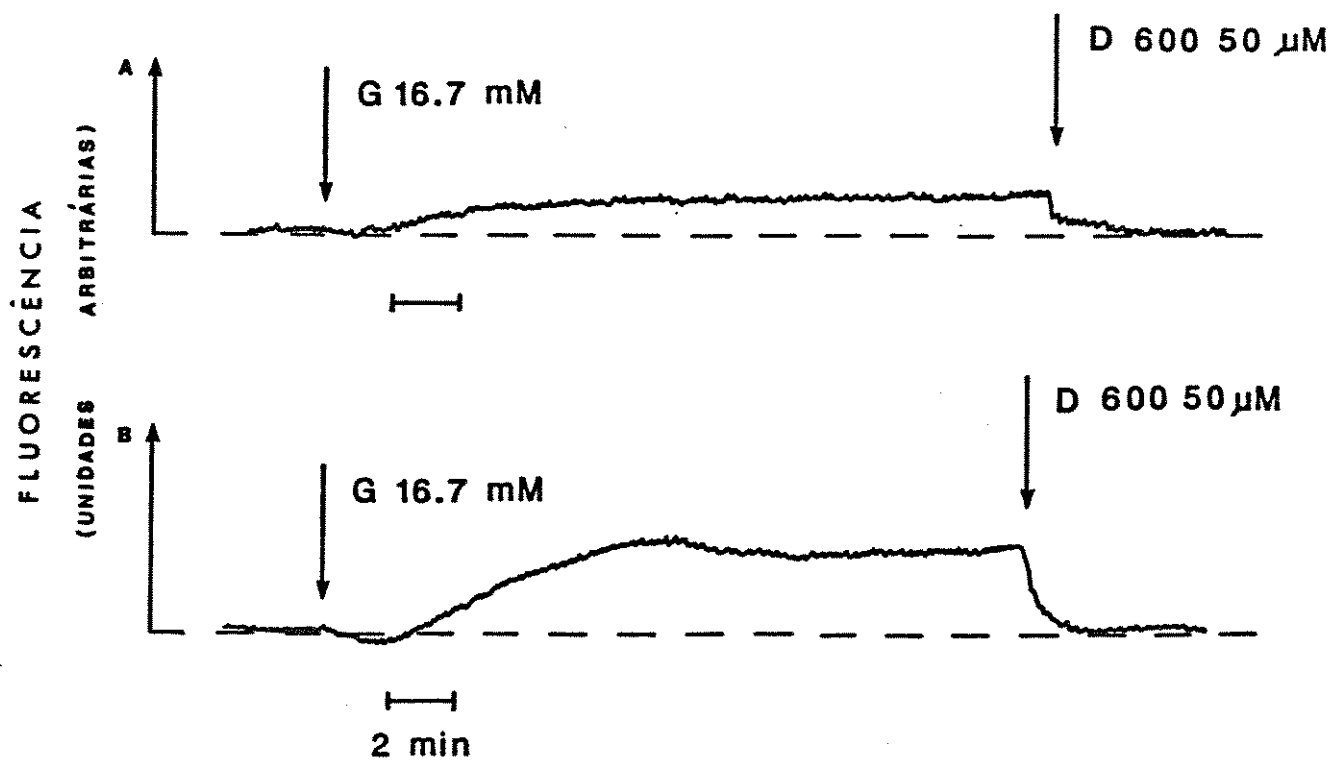


Figura 4. Efeito de 16,7 mM de glicose e 50 μ M de D600 sobre a fluorescência do Fura 2, registrada em 340 nm, de células insulares obtidas de ilhotas cultivadas (A) ou recém-isoladas (B). O meio extracelular continha 2,6 mM de Ca^{2+} .

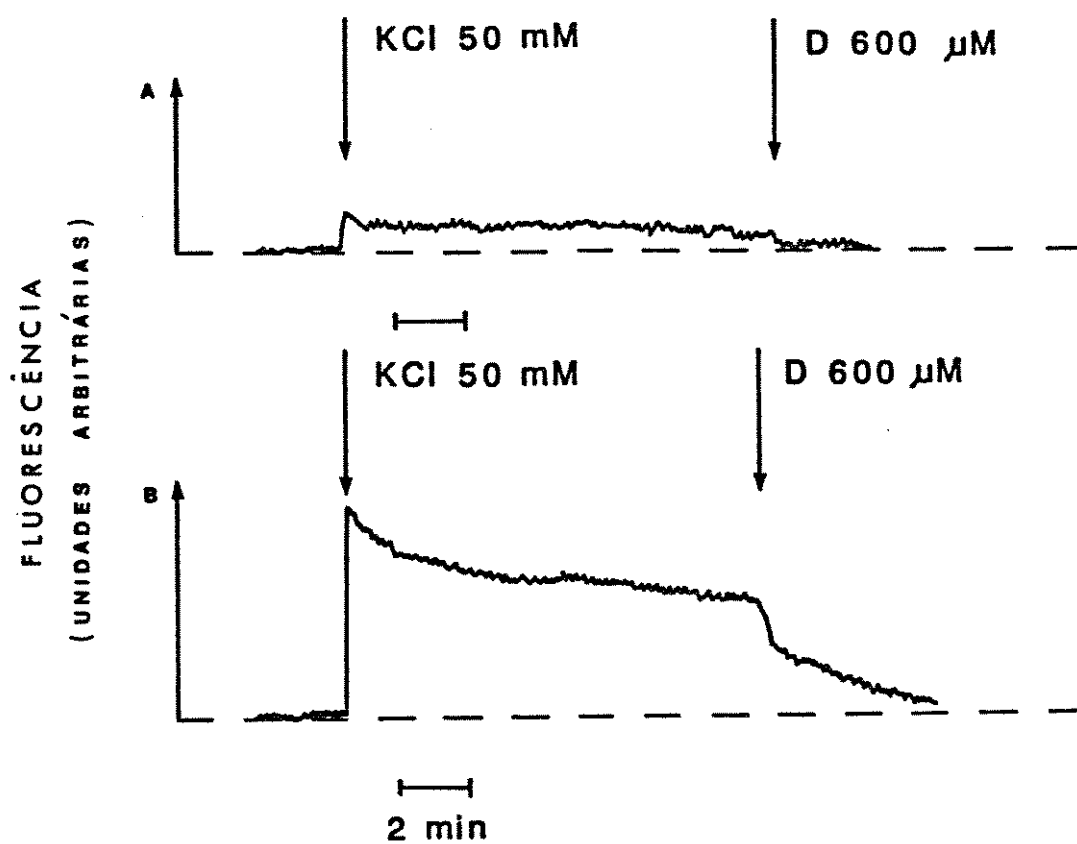


Figura 5. Efeito de 50 mM de KCl e 50 μM de D600 sobre a fluorescência do Fura 2, registrada em 340 nm, de células insulares obtidas de ilhotas cultivadas (A) ou recém-isoladas (B). O meio extracelular continha 2,6 mM de Ca^{2+} .

Tabela I. Efeitos de 50 mM de KCl ou 16,7 mM de glicose sobre a $|\text{Ca}^{2+}|_i$ de células obtidas de ilhotas de Langerhans cultivadas ou recém-isoladas

PREPARAÇÃO	$ \text{Ca}^{2+} _i \pm \text{SEM}$	(nM)*	INCREMENTO	n
	KCl 5mM	KCl 50mM		
Ilhotas recém-isoladas	112 ± 3	223 ± 10	111 ± 7	3
Ilhotas cultivadas	138 ± 38	181 ± 47	43 ± 9	3
	GLICOSE 2,8mM	GLICOSE 16,7mM		
Ilhotas recém-isoladas	122 ± 15	215 ± 22	93 ± 7	3
Ilhotas cultivadas	144 ± 15	191 ± 12	47 ± 3	3

* $|\text{Ca}^{2+}|_i$ calculada pela razão entre as fluorescências registradas em 340 e 380 nm.

V. DISCUSSÃO

O desenvolvimento das técnicas de cultura de pâncreas endócrino viável - seja de fetos, recém-nascidos ou adultos -, é de fundamental importância para o estudo da fisiologia deste tecido, bem como para a obtenção de quantidade adequada de ilhotas de Langerhans, destinadas a transplante em animais ou pacientes diabéticos.

A manutenção de ilhotas de roedores adultos em cultura foi primeiramente descrita por MOSKALEVSKI (1965). A esta, seguiu-se uma série de importantes publicações, enfocando a preservação de características morfológicas (JÖNSSON et al., 1966; WESTMAN et al., 1970; KOSTIANOVSKI et al., 1972; ANDERSSON et al., 1974a) e funcionais das ilhotas (ANDERSSON e HELLERSTRÖM, 1972; ANDERSSON, 1974; ANDERSSON et al., 1976; LACY et al., 1976).

Sob este último aspecto, entretanto, observou-se que, à medida em que se prolonga o período de cultivo, as ilhotas apresentam um declínio na resposta

secretória frente à glicose (BUITRAGO et al., 1975; LACY et al., 1976; RABINOVITCH et al., 1978; VERSPOHL et al., 1988). Embora torne o órgão inadequado, quer para o estudo de suas funções normais, como para sua utilização em transplante, este problema passou a ser muito interessante, na medida em que permite a utilização de ilhotas cultivadas como um modelo para o estudo das alterações no processo secretório. Além disso, a manutenção do tecido "in vitro" oferece a possibilidade de intervenções diretas sobre o órgão, no intuito de prevenir ou corrigir anomalias.

Considerando a potencialidade deste modelo experimental, e tentando contribuir para um melhor entendimento do processo secretório, nosso objetivo nesse trabalho foi comparar a secreção de insulina e as alterações dos fluxos de Ca^{2+} provocadas pela glicose, em ilhotas de ratos recém-isoladas ou cultivadas por 5 a 7 dias.

Nossos resultados mostram claramente que tanto a primeira quanto a segunda fase da secreção de insulina, induzida pela glicose, foram drasticamente reduzidas em ilhotas cultivadas (fig. 1-B), confirmando assim dados

anteriores da literatura (RABINOVITCH et al., 1978; VERSPOHL et al., 1988). Esta redução na resposta secretória poderia ser consequência de alteração em qualquer das etapas do mecanismo de secreção: (a) no metabolismo da glicose para formação de ATP e nucleotídeos de piridina reduzidos; (b) no bloqueio dos canais de K^+ metabolicamente regulados; (c) na ativação da permeabilidade ao Ca^{2+} dependente da voltagem; (d) no aumento do "turnover" e da concentração citosólica do Ca^{2+} ; (e) na ativação do sistema efetor e, finalmente; (f) na extrusão dos grânulos de insulina (para revisão, vide WOLLHEIM e SHARP, 1981; MALAISSE, 1984; PRENTKI e MATSCHINSKY, 1987).

Desta sequência de eventos, um dos passos fundamentais diz respeito às alterações dos fluxos de Ca^{2+} . Neste sentido, os resultados revelam que, apesar de uma primeira fase aparentemente normal, o aumento secundário no efluxo do ^{45}Ca apresenta-se também significativamente reduzido na ilhotas cultivadas (fig. 1-A). Neste ponto, se faz necessária uma análise mais detalhada do significado dos fluxos de ^{45}Ca durante a estimulação pela glicose. Aceita-se

que os aumentos no efluxo do ^{45}Ca refletem a estimulação da entrada de Ca^{2+} , e correspondem a um processo de troca ^{45}Ca - ^{40}Ca . Assim, o influxo do ^{40}Ca na célula, em consequência da despolarização da membrana plasmática, desloca o ^{45}Ca dos sítios ligantes intracelulares, aumentando o efluxo deste isótopo (HERCHUELZ et al., 1980a; ABRAHAMSSON et al., 1981). Desta forma, fica claro que um menor valor da taxa fracional de efluxo do ^{45}Ca é, na verdade, reflexo de uma menor entrada de ^{40}Ca nas células.

Portanto, numa primeira análise, a reduzida secreção de insulina, registrada em ilhotas cultivadas, pode ser imputada a uma menor entrada de Ca^{2+} nas células beta. Suporte para esta proposição pode ser encontrada tanto na menor captação de ^{45}Ca (VERSPOHL et al., 1988), como também nos experimentos onde as concentrações citosólicas do Ca^{2+} ($|\text{Ca}^{2+}|_i$) foram avaliadas pelo corante fura 2 (fig. 4-Tab. I). Nas células provenientes de ilhotas cultivadas, a glicose provocou um aumento menos acentuado na $|\text{Ca}^{2+}|_i$, comparado àquele apresentado por células insulares recém-isoladas. É interessante ressaltar que os valores basais da $|\text{Ca}^{2+}|_i$,

em ambos os tipos de preparação, são semelhantes àqueles descritos na literatura (WOLLHEIM e POZZAN, 1984; PRENTKY e WOLLHEIM, 1984; DELLERS et al., 1985; SUSSMAN et al., 1987; ARKHAMMAR et al., 1987; GRAPENGIESSER et al., 1988; GOBBE e HERCHUELZ, 1989).

A fim de melhor estudar a resposta inicial no efluxo do ^{45}Ca frente à glicose (fig.1-A, min 45-50), ilhotas foram perfundidas em meio deficiente em Ca^{2+} e enriquecido com EGTA (fig. 2). Os resultados demonstram que ilhotas cultivadas preservaram a capacidade de reduzir o efluxo do ^{45}Ca na presença da hexose. Isto indica que a manutenção do tecido em cultura aparentemente não alterou a distribuição intracelular do Ca^{2+} , e nem mesmo os processos intracelulares responsáveis pelos fluxos transmembrânicos do íon regulados pela glicose, como aqueles descritos em ilhotas recém-isoladas (HERCHUELZ et al., 1980b; SIEGEL et al., 1980; HELLMAN, 1985). Nossos resultados demonstram ainda que o efeito estimulatório da carbamilcolina sobre o efluxo do ^{45}Ca foi similar em ambos os tipos de preparação (fig. 3), sugerindo que a cultura do órgão não afeta as propriedades dos

receptores muscarínicos, conhecidamente presentes na membrana plasmática da célula beta (MATHIAS et al., 1985). Os efeitos da glicose sobre o efluxo do ^{45}Ca em meio deficiente em Ca^{2+} e os experimentos com a carbamilcolina indicam que o manuseio intracelular do Ca^{2+} permaneceu íntegro após o cultivo das ilhotas. Além disso, como o aumento no efluxo do ^{45}Ca induzido pela carbamilcolina reflete, "a priori", uma mobilização dos estoques intracelulares de Ca^{2+} mediada pelo inositol 1,4,5-trifosfato (BERRIDGE, 1983; BEST et al., 1984; MALAISSE et al., 1985; ZAWALICH, 1988), é lícito sugerir que a hidrólise de polifosfoinositídeos permanece inalterada em ilhotas cultivadas.

Supondo que o declínio na resposta secretória estimulada pela glicose se deva à inabilidade do açú-car em provocar um influxo suficiente de Ca^{2+} nas células beta, ainda não está claro qual é a causa desta anomalia. Uma das possibilidades seria a de que a glicose, nas ilhotas cultivadas, não consiga reduzir adequadamente a permeabilidade ao K^+ para induzir a despolarização celular que, em última análise, é responsável pela ativação da permeabilidade ao

Ca^{2+} -voltage dependente (ATWATER et al., 1978; BOSCHERO e MALAISSE, 1979). Entretanto, não parece ser este o problema, uma vez que trabalhos recentes comprovam a eficácia da glicose em reduzir convenientemente a permeabilidade do ^{86}Rb (utilizado como substituto do K^+) em ilhotas cultivadas (VERSPOHL et al., 1988; BOSCHERO et al., 1988; BOSCHERO et al., 1990b).

Outro aspecto importante a ser considerado diz respeito ao metabolismo da glicose em ilhotas cultivadas. Embora apresente taxa aparentemente normal de geração de ATP (ANDERSSON et al., 1974b; VERSPOHL et al., 1988), demonstrou-se recentemente que o nível de NADPH, assim como a razão NADPH/NADP se apresentam diminuídos em ilhotas mantidas em cultura (VERSPOHL et al., 1988). Como o potencial redox parece desempenhar papel importante na regulação dos movimentos catiônicos na célula beta (HENQUIN e MEISSNER, 1984; MALAISSE et al., 1984), e considerando as observações recentes de que a glicose pode modular a abertura de canais de Ca^{2+} por fosforilação de proteínas (LEBRUN et al., 1983; MALAISSE et al., 1985; SMITH et al., 1989; ROJAS et al.,

1990), alterações no metabolismo da glicose - à nível da geração de nucleotídeos de piridina reduzidos - poderiam explicar a redução na secreção de insulina em ilhotas mantidas "in vitro". Contudo, os experimentos realizados em meio deficiente em Ca^{2+} (fig. 2), e os dados da literatura que comprovam a eficiência da glicose em reduzir adequadamente o efluxo do ^{86}Rb em ilhotas cultivadas, contrariam a hipótese de que as alterações metabólicas, "per se", seriam responsáveis pela menor secreção de insulina apresentada por este tipo de preparação. Além disso, o metabolismo alterado não explica o menor aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provocado por altas concentrações de KCl, obtido em células de ilhotas cultivadas (fig.5, Tab.I).

Sob este aspecto, a reduzida resposta cálcica, frente a despolarização por K^+ , poderia ser atribuída tanto as alterações no número e/ou na sensibilidade dos canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem, quanto as modificações na dependência da voltagem para a ativação destes canais. Foi demonstrado recentemente uma redução no número de sítios ligantes para a ^3H -nitrendipina - uma dihidropiridina que age como potente antagonista de Ca^{2+} - em membranas de

insulinoma exposto à cultura (HOENIG et al., 1989). Apesar de se tratar de modelos diferentes pode-se inferir, pelas evidências, que a redução no número de canais de Ca^{2+} -voltagem sensíveis representa uma redução nos canais de Ca^{2+} funcionais, isto é, naqueles associados ao influxo de Ca^{2+} na célula beta e subsequente secreção de insulina.

Concluindo, nossos resultados indicam que o efeito deletério da cultura sobre a secreção de insulina, estimulada pela glicose, está relacionado com uma menor entrada de Ca^{2+} pelas células insulares. Este efeito provavelmente se deve a uma diminuição funcional do número e/ou sensibilidade dos canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem.

Resta ainda investigar a importância, neste processo, da geração dos nucleotídeos de piridina reduzidos, principalmente no que se refere a participação destes agentes na ativação de canais de Ca^{2+} independentes da voltagem (LEBRUN et al., 1982; HOENIG et al., 1989; ROJAS et al., 1990).

VI. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo comparar os efeitos da glicose sobre a secreção de insulina e os fluxos de Ca^{2+} , em ilhotas de ratos recém-isoladas ou mantidas em cultura.

Para isto, ilhotas de ratos Wistar adultas foram isoladas por digestão com colagenase. Parte destas ilhotas foi mantida em cultura por 5 a 7 dias, numa mistura dos meios BME e DMEM, na proporção de 5/2 (v/v), acrescida de 10% (v/v) de soro de boi recém-nascido, com concentração final de glicose de 10,5 mM. As ilhotas foram mantidas a 37°C, em atmosfera com 5% de CO_2 . O meio de cultura foi renovado a cada 48 horas. Imediatamente após o isolamento ou o cultivo, as ilhotas foram lavadas 2 vezes com tampão bicarbonato. Para a execução dos protocolos, dois métodos foram utilizados:

(a) Perfusão de ilhotas recém-isoladas ou cultivadas, para análise da dinâmica do efluxo do ^{45}Ca e da secreção de

insulina;

- (b) Incubação de células isoladas, provenientes de ilhotas frescas ou cultivadas, para medida da concentração citoplasmática de Ca^{2+} , utilizando-se o Fura 2 como marcador do Ca^{2+} .

Os resultados mostraram que:

1. A capacidade da glicose em promover a secreção de insulina foi severamente reduzida nas ilhotas cultivadas.
2. Na ausência do Ca^{2+} extracelular, a glicose provocou uma marcante redução no efluxo do ^{45}Ca , tanto em ilhotas recém-isoladas quanto em ilhotas cultivadas.
3. Na presença de Ca^{2+} extracelular, o incremento no efluxo do ^{45}Ca , induzido pela glicose, foi reduzido durante a segunda fase da secreção de insulina.
4. O aumento na concentração citosólica de cálcio, provocado pela glicose, foi significativamente menor em células oriundas de ilhotas cultivadas, comparado àquele observado em células obtidas de ilhotas recém-isoladas.
5. A cultura não alterou a capacidade da carbamilcolina em aumentar o efluxo do ^{45}Ca .

6. Nas células provenientes de ilhotas cultivadas, o incremento na concentração citosólica de cálcio provocado pela despolarização com K^+ , foi de apenas 50% daquele obtido em células de ilhotas recém-isoladas.

Concluindo, os resultados indicam que o declínio na secreção de insulina de ilhotas cultivadas, quando estimuladas pela glicose, provavelmente se deve à incapacidade da hexose em aumentar adequadamente o influxo do Ca^{2+} nas células beta.

VII. ABSTRACT

The present study aimed at comparing the effects of glucose on ionic and secretory events in freshly isolated and cultured rat pancreatic islets.

For this purpose islets from female adult fed Wistar rats were isolated by collagenase digestion. Part of these islets were cultured for 5 to 7 days in a mixture of BME basal medium and Dulbecco's modified medium used in a 5/2 volumetric ratio, and supplemented with 10% newborn calf serum to yield a final concentration of glucose close to 10.5 mM. The culture medium was renewed every 48 hours. The islets were maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Immediately before the experiments, the freshly isolated or cultured islets were washed twice with a bicarbonate-buffered solution. The methods used were:

- (a) Perifusion of freshly isolated or cultured islets to measure the ⁴⁵Ca outflow and insulin release;
- (b) Incubation of isolated cells, obtained from freshly or

cultured islets, to measure the cytosolic Ca^{2+} concentration, using the Fura 2 as an intracellular Ca^{2+} -indicator.

The results show that:

1. The capacity of glucose to provoke insulin release was severely reduced in islets maintained in culture.
2. Whether in freshly isolated or cultured islets, glucose provoked a marked and sustained decrease in ^{45}Ca outflow from islets deprived of extracellular Ca^{2+} .
3. In the presence of extracellular Ca^{2+} throughout, the magnitude of the glucose-induced secondary rise in ^{45}Ca outflow was reduced in cultured islets.
4. Glucose induced a weaker increase in cytosolic calcium concentration in islets cells obtained from cultured islets than in islets cells dissociated from freshly isolated pancreatic islets.
5. The stimulatory effect of carbamylcholine on ^{45}Ca outflow was unaffected by tissue culture.
6. In islets cells obtained from cultured islets, the increase in cytosolic calcium concentration evoked by K^+

depolarization average only half of that observed in con
trol experiments.

In conclusion, these results indicate that the reduced secretory potential of glucose in cultured pancreatic islets can be ascribed to the inability of the nutrient secretagogue to provoke a suitable increase in Ca^{2+} influx.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAMSSON, H.; GYLFE, E. & HELLMAN, B. Influence of external calcium ions on labelled calcium efflux from pancreatic B-cell and insulin granules in mice. J. Physiol., 311: 541-50, 1981.
2. ANDERSSON, A. Long-term effects of glucose on insulin release and glucose oxidation by mouse pancreatic islets maintained in tissue culture. Biochem J., 140 : 337-82, 1974.
3. _____; BORGLUND, E. & BROLIN, S. Effects of glucose on the content of ATP and glicogen and the rate of glucose phosphorylation of isolated pancreatic islets maintained in tissue culture. Biochem. Biophys. Res. Comm., 56: 1045-51, 1974b.
4. _____; GUNNARSSON, R. & HELLERSTRÖM, C. Long-term effects of a low extracellular glucose concentration on glucose metabolism and insulin biosynthesis and release of mouse pancreatic islets maintained in tissue culture. Acta Endocr., 82: 318-29, 1976.
5. _____ & HELLERSTRÖM, C. Metabolic characteristics of isolated pancreatic islets in tissue culture. Diabetes, 21: 546-54, 1972.

6. ANDERSSON, A.; PETERSSON, B.; WESTMAN, J.; EDWARDS, J.; LUNQUIST, G. & HELLERSTRÖM, C. Tissue culture of A₂ cel-rich pancreatic islets isolated from guinea-pigs. J. Cell. Biol., 57: 241-47, 1973.
7. _____; WESTMAN, J. HELLERSTRÖM, C. Effects of glucose on the ultrastructure and insulin biosynthesis of isolated mouse pancreatic maintained in tissue culture. Diabetologia, 10: 743-53, 1974a.
8. AOKI, M.; KAGAWA, T.; YAMAMURA, T.; MATSUOKA, A. & UT-SUNOMIYA, J. Monolayer cultures of pancreatic islets cells from adult rats: effect of 2-deoxyglucose. J. Endocr., 118: 173-78, 1988.
9. ARKHAMMAR, P.; NILSSON, T.; RORSMAN, P. & BERGGREN, P-O. Inhibition of ATP-regulated K⁺ channels precedes depolarization-induced increase in cytoplasmic free Ca²⁺ concentration in pancreatic B cells. J. Biol. Chem., 262: 5448-54, 1987.
10. ATWATER, I.; RIBALET, B. & ROJAS, E. Cyclic changes in potential and resistance of the beta-cell membrane induced by glucose in islets of Langerhans from mouse. J. Physiol., 278: 117-39, 1978.
11. BERRIDGE, M. Rapid accumulation of inositol triphosphate reveal that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. Biochem. J. 212: 849-58, 1983.

12. BEST, L.; DUNLOP, M. & MALAISSE, W.J. Phospholipid metabolism in pancreatic islets. Experientia, 40:1058-91, 1984.
13. BIDEN, T.J.; PETER-RIESCH, B.; SCHLEGEL, W. & WOLLHEIM, C.B. Ca^{2+} -mediated generation of inositol 1,4,5-tri-phosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate in pancreatic islets. J. Biol. Chem., 262: 3567-71, 1987.
14. BORDIN, S.; LEBRUN, P.; HERCHUELZ, A. & BOSCHERO, A.C. Efeitos da glicose sobre a secreção de insulina, e-fluxo do ^{45}Ca e concentração citoplasmática do Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em ilhotas de Langerhans de ratos adultos, mantidas ou não em cultura. In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 5., Caxambú, 1990. Anais, p. 210.
15. BOSCHERO, A.C.; BORDIN, S.; OLIVIER, P. & HERCHUELZ, A. Effects of glucose, K and tolbutamide on cytosolic free Ca^{2+} concentrations ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in cultured neonatal islets cells. Horm. Metab. Res., 1991 (submetido à publicação).
16. _____; _____; SENER, A. & MALAISSE, W.J. D-glucose and L-leucine metabolism in neonatal and cultured rat pancreatic islets. Mol. Cell. Endocrinol., 1990a (no prelo).

17. BOSCHERO, A.C.; BORDIN, S.; HERCHUELZ, A. & LEBRUN, P. Effects of glucose on ^{45}Ca outflow, cytosolic Ca^{2+} concentration and insulin release from freshly isolated and cultures adult rat islets. Cell Calcium, 11: 603-9, 1990b.
18. _____ & MALAISSE, W.J. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXIX. Regulation of $^{86}\text{Rb}^+$ efflux from perifused islets. Am. J. Physiol., 236:E139-46, 1979.
19. _____; TOMBACCINI, D. & ATWATER, I. Effects of glucose on insulin release and ^{86}Rb permeability in cultured neonatal and adult rat islets. FEBS Lett., 236: 375-79, 1988.
20. _____; TOMBACCINI, D.; CARNEIRO, E.M. & ATWATER, I. Difference in K^+ -permeabilities between cultured adult and neonatal rat islets of Langerhans in response to glucose, tolbutamide, diazoxide and theophylline. Pancreas, 1990c (submetido à publicação).
21. BUITRAGO, A.; GYLFE, E.; HELMANN, B.; IDAHL, L-Å. & JOHANSSON, M. Function of microdissected pancreatic islets cultured in a chemically defined medium. I. Insulin content and release. Diabetologia, 11: 535-40, 1975.

22. CREPALDI, S.C.; DELATRE, E. & BOSCHERO, A.C. Efeito da prolactina (PRL) sobre a maturação da resposta à glicose em ilhotas de ratos recém-nascidos, mantidas em cultura. In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 5; Caxambú, 1990. Anais, p.209.
23. DEBRAY-SACHS, M.; SAI, P.; FEUTREN, G.; LARY, F.; MANGENDRE, D.; BOITARD, C.; HORS, J. & BACH, J.F. Inhibition of insulin by mononuclear cells from diabetic patients treated with cyclosporin A or placebo. Diabetes, 37:873-7, 1988.
24. DELEERS, M.; MAHY, M. & MALAISSE, W.J. Glucose increases cytosolic Ca²⁺ activity in pancreatic islets cells. Biochem. Int., 10:97-103, 1985.
25. DUNLOP, M.; WOODMAN, P.A. & LARKINS, R.G. Time-course of altered islets phospholipids and calcium binding and ionophoretic properties of islets lipids following glucose stimulation. Biochim. Biophys. Acta , 860: 376-82, 1986.
26. EIZIRIK, D.L. & SANDLER, S. Functional restoration of cultured mouse pancreatic islets after in vitro exposure to alloxan. Pharmacol. Toxicol., 63: 396 - 99 , 1988.
27. EIZIRIK, D.L.; STRANDELL, E. & SANDLER, S. Culture of mouse pancreatic islets in different glucose concentrations modifies B cell sensitivity to streptozotocin. Diabetologia, 31: 168-74, 1988.

28. GOBBE, P. & HERCHUELZ, A. Does glucose decrease cytosolic free calcium in normal pancreatic islets cells? Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol., 63: 231 - 47 , 1989.
29. GRAPENGIESSER, E.; GYLFE, E. & HELLMAN, B. Dual effect of glucose on cytoplasmic Ca^{2+} in single pancreatic B-cells. Biochem. Biophys. Res. Comm., 150:419-25, 1988.
30. GRYNKIEWCZ, G.; POENIE, M. & TSIEN, R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem., 260: 3440 - 50, 1985.
31. HANKS, J.H. & WALLACE, R.F. Relation of oxygen and temperature in preservation of tissues by refrigeration. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 71: 200-1, 1949.
APUD: HERCHUELZ, A. Regulation des flux calciques dans les ilots de Langerhans. Bruxelles, 1980. Tese (Professor Adjunto) Universite Libre de Bruxelles.
32. HELLMAN, B. B-cell cytoplasmic Ca^{2+} balance as a determinant for glucose-stimulated insulin release. Diabetologia, 28: 494-501, 1985.
33. HENQUIN, J.C. & MEISSNER, H.P. Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells. Experientia, 40: 1043-52, 1984.

HEBERT, V.; LAU, K.S.; GOTTLIEB, C.W. & BLEICHER, S.J.

Loaded-charcoal immunoassay of insulin. J. Clin. Endocr.,
25: 1375-84, 1965.

- 62 -

34. HERCHUELZ, A.; COUTURIER, E. & MALAISSE, W.J. Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: glucose induced calcium-calcium exchange. Am. J. Physiol., 238: E96-103, 1980a.
35. _____ & MALAISSE, W.J. Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: dissociation between calcium and insulin release. J. Physiol. (London), 283: 409-24, 1978.
36. _____; SENER, A. & MALAISSE, W.J. Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: calcium extrusion by sodium-calcium countertransport. J. Membr. Biol., 57: 1-12, 1980b.
37. HOENIG, M.; RUSSO, L.L. & FERGUSON, D.C. Characterization of calcium channels of a glucose-responsive rat insulinoma. Am. J. Physiol., 256: E488-93, 1989.
38. JÖNSSON, L-E.; PONTÉN, J. & THORELL, J. Long term production of insulin rat pancreas in vitro. Diabetologia, 2: 157-61, 1966.
39. KAISER, N.; CORCOS, A.P.; TUR-SINAI, A.; ARIAV, Y. & CERASI, E. Monolayer culture of adult rat pancreatic islets on extracellular matrix: long term maintenance of differentiated B-cell function. Endocrinology, 123: 834-40, 1988.

40. KOSTIANOVSKY, M.; LACY, P.E.; GREIDER, M.H. & STILL, M. F. Long term (15 days) incubation of islets of Langerhans isolated from adult rats and mice. Lab. Invest., 27: 53-61, 1972.
41. KREBS, H.A. & HENSELEIT, K. Untersuchungen über die Hanstoffbildung im Tierkörper. Hoppe-Seyler's Z. Physiol.-Chem., 210: 33-66, 1932. APUD: HERCHUELZ, A. Regulation des flux calciques dans les ilots de Langerhans. Bruxelles, 1980. Tese (Professor Adjunto) Universite Libre de Bruxelles.
42. LACY, P.E.; FINKE, E.H.; CONANT, S. & NABER, S. Long-term perfusion of isolated rat islets in vitro. Diabetes, 25: 485-93, 1976.
43. _____ & KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. Diabetes, 16: 35-9, 1967.
44. LEBRUN, P. Flux cationiques dans les cellules B des ilots pancreatiques. Bruxelles, 1987. Tese (Professor Adjunto) Universite Libre de Bruxelles.
45. _____; MALAISSE, W.J. & HERCHUELZ, A. Evidence for two distinct modalities of Ca^{2+} influx into pancreatic B cell. Am. J. Physiol., 242: E59-66, 1982.
46. _____; _____ & _____. Impairment by aminooxyacetate of ionic response to nutrient in pancreatic islets. Am. J. Physiol., 245: E38-46, 1983.

47. MALAISSE, W.J. Stimulus-secretion coupling in the pancreatic B-cell. Experientia, 40: 1025-135 (review article), 1984.
48. _____; LEBRUN, P. & HERCHUELZ, A. Calcium regulation of insulin release. In: MARMÉ, D., ed. Calcium and Cell Physiology, Berlin, Springer-Verlag, 1985 . p. 298-310.
49. _____; MALAISSE-LAGAE, F. & SENER, A. Coupling factors in nutrient-induced insulin release. Experientia, 40: 1035-43, 1984.
50. MALAISSE-LAGAE, F; SENER, A. & MALAISSE, W.J. Can desensitization of the B-cell to D-glucose be simulated in cultured pancreatic islets? Acta Diabetol. Lat., 24: 17-25, 1987.
51. MATHIAS, P.C.F.; CARPINELLI, A.R.; BILLAUDEL, B.; GARCIA-MORALES, P.; VALVARDE, I. & MALAISSE, W.J. Cholinergic stimulation of ion fluxes in pancreatic islets. Biochem. Pharmacol., 34: 3451-57, 1985.
52. McDONOUGH, P.M. & BUTTON, D.C. Measurement of cytoplasmic calcium concentration in cell suspensions: correction for extracellular Fura-2 through use of Mn^{2+} and probenecid. Cell Calcium, 10: 171-180, 1989.
53. MOSKALEWSKI, S. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. Gen. Comp. Endocrinol., 5: 342-53, 1965.

54. NIELSEN, J.H. Growth and function of the pancreatic B cell in vitro. Acta Endocrinol., 108 (suppl. 226): 1-39 (review article), 1985.
55. OSTENSON, C.-G. & GRILL, V. Differences in long term effects of L-glutamine and D-glucose on insulin release from rat pancreatic islets. Mol. Cell. Endocrinol., 45: 215-21, 1986.
56. PACE, C.S.; CONANT, S. & LACY, P.E. Electrical responses of rat islets maintained in culture with varying levels of glucose. Endocrinology, 102: 1350-55, 1978.
57. PIPELLERS, D.G.; IN'T VELD, P.A.; VAN DE WINKEL, M. ; MAES, E.; SCHUIT, F.C. & GEPTS, W. A new in vitro model for the study of pancreatic A and B cells. Endocrinology, 117: 806-16, 1985.
58. PRENTKI, M. & MATSCHINSKY, F.M. Ca^{2+} , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. Physiol. Rev., 67: 1185-248 , 1987.
59. _____ & WOLLHEIM, C.B. Cytosolic free Ca^{2+} in insulin secreting cells and its regulation by isolated organelles. Experientia, 40: 1054-60, 1984.
60. RABINOVITCH, A.; CUENDET, G.S.; SHARP, G.W.G.; RENOLD, A.E. & MINTZ, D.H. Relation of insulin release to cyclic AMP content in rat pancreatic islets maintained in tissue culture. Diabetes, 27: 766-73, 1978.

61. RABINOVITCH, A.; PUKEL, C. & BAQUERIZO, M. Interleukin-1 inhibits glucose-modulated insulin and glucagon secretion in rat islets monolayer cultures. Endocrinology, 122: 2393-8, 1988.
62. ROJAS, E.; HIDALGO, J.; CARROLL, P.B.; LI, M.X. & ATWATER, I. A new class of calcium channels activated by glucose in human pancreatic B-cells. FEBS Lett., 261: 265-70, 1990.
63. SANDLER, S. & ANDERSSON, A. Long-term effects of exposure of pancreatic islets to nicotinamide in vitro on DNA synthesis, metabolism and B-cell function. Diabetologia, 29: 199-202, 1986.
64. SIEGEL, E.G.; WOLLHEIM, C.B.; RENOLD, A.E. & SHARP, G.W.G. Evidence for the involvement of Na/Ca exchange in glucose-induced insulin release from rat pancreatic islets. J. Clin. Invest., 66: 996-1003, 1980.
65. SMITH, P.A.; RORSMAN, P. & ASHCROFT, F.M. Modulation of dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channels by glucose metabolism in mouse pancreatic B-cells. Nature, 342: 550-53, 1989.
66. SORENSON, R.L.; BRELJI, T.C.; HEGRE, O.D.; MARSHALL, S.; ANAYA, P. & SHERIDAN, J.D. Prolactin (in vitro) decreases the glucose stimulation threshold, enhances insulin secretion, and increases dye coupling among islets B cells. Endocrinology, 121: 1447-53, 1987.

67. SUSSMAN, K.E.; LEITNER, J.W. & DRAZNIN, B. Cytosolic free-calcium concentrations in normal pancreatic islets cells. Diabetes, 36: 571-77, 1987.
68. SWENNE, I.; BONE, A.J.; SIMON, L.H. & HELLERSTRÖM, C. Effects of glucose and amino acids on the biosynthesis of DNA and insulin in fetal rat islets maintained in tissue culture. Diabetes, 29: 686-92, 1980.
69. SZOPA, T.M.; GAMBLE, D.R. & TAYLOR, K.W. Cocksackie B4 virus induces short-term changes in the metabolic functions of mouse pancreatic islets in vitro. Cell. Biochem. Funct., 4: 181-7, 1986.
70. TROWELL, O.A. the culture of mature organs in a synthetic medium. Exp. Cell Res., 16: 118-47, 1959.
71. VERSPOHL, E.J.; KAISER, P.; WAHL, M. & AMMON, H. P. T. Decreased insulin secretory response of pancreatic islets during culture in the presence of low glucose is associated with diminished $^{45}\text{Ca}^{2+}$ net uptake, NADPH/NADP and GSH/GSSG ratios. Life Sci., 43: 209-19, 1988.
72. WELSH, N.; SANDLER, S.; WELSH, M. & HELLERSTRÖM, C. Regulation of RNA metabolism in relation to insulin production and oxidative metabolism in mouse pancreatic islets in vitro. Biochim. Biophys. Acta, 887: 58-68, 1986.

73. WESTMAN, J.; ANDERSSON, A.; PETERSSON, B.; HELLERS-TRÖM, C. Ultrastructure of monolayer cultures of pancreatic islets cells. Acta Diabetol. Lat., 7:557-89, 1970.
74. WOLLHEIM, C.B. & BIDEN, T.J. Second messenger function of inositol 1,4,5-Triphosphate. J. Biol. Chem., 261: 8314-19, 1986.
75. _____ & POZZAN, T. Correlation between cytosolic free Ca^{2+} and insulin release in an insulin - secreting cell line. J. Biol. Chem., 259: 2262-67, 1984.
76. _____ & SHARP, G.W.G. Regulation of insulin release by calcium. Physiol. Rev., 61: 914-73, 1981.
77. ZAWALICH, W.S. Modulation of insulin secretion from B-cells by phosphoinositide-derived second-messenger molecules. Diabetes, 37: 137-41, 1988.
78. ZUCKER, P.F. & ARCHER, M.C. Streptozotocin toxicity to cultured pancreatic islets of the syrian hamster. Cell. Biol. Toxicol., 4: 349-56, 1988.