

SECREÇÃO DE INSULINA: ESTÍMULO E CINÉTICA

EDSON DELATTRE*

RESUMO

Na revisão, objetivou-se abordar o processo secretório de insulina, no que toca ao seu desencadeamento e padrão de resposta. São apresentadas as hipóteses metabólica e do glicorreceptor para o reconhecimento da glicose. O padrão bifásico da secreção de insulina é discutido em termos das hipóteses explicativas.

1. INTRODUÇÃO

O crescente ritmo de estudo e compreensão dos processos envolvidos na síntese e secreção de insulina, ocorrido nas duas últimas décadas, deve-se, em grande parte, a dois avanços técnicos desenvolvidos, aprimorados e difundidos a partir do final dos anos 50. O primeiro deles, o radioimunoensaio, cujos fundamentos foram simultaneamente estabelecidos por YALOW & BERSÖN⁽⁷²⁾, nos EUA, e por EKINS⁽¹²⁾, na Inglaterra, permitiu a dosagem rotineira de hormônios e outras substâncias, com praticidade, exatidão, precisão, sensibilidade e especificidade muito superiores às apresentadas pelas técnicas de mensuração até então praticadas. O segundo avanço se iniciou com o emprego de preparações *in vitro* ou *in situ*, de tecido pancreático total ou parcial, estendendo-se até nossos dias, com o desenvolvimento de um elevado número de técnicas e variações.

O principal objetivo deste relato é abordar o mecanismo pelo qual as células beta-pancreáticas reconhecem o estímulo para a secreção de insulina, bem como enfatizar o padrão com que esta se processa.

2. TÉCNICAS DE ESTUDO DA SECREÇÃO DE INSULINA

A par dos estudos que envolvem

seres humanos, bem como animais, em condições bastante próximas das fisiológicas, outros empregam preparações especiais, que vão desde o pâncreas ainda conectado ao seu portador, até membranas e grânulos de células insulares. Assim, utilizam-se: (a) perfusão de pâncreas *in situ* (KUZUYA, KAJINUMA & IDE⁽³³⁾); (b) perfusão de pâncreas *in vitro* (GRODSKY et alii⁽¹⁷⁾; SUSSMAN, VAUGHAN & TIMMER⁽⁶⁷⁾; CURRY, BENNETT & GRODSKY^(7,9); IVERSEN⁽²⁷⁾; LENZEN⁽⁴¹⁾); (c) perfusão de fragmentos de pâncreas (KIKUCHI et alii⁽³⁰⁾); (d) incubação de fragmentos de pâncreas fetal (LAMBERT et alii, apud HEDESKOV⁽¹⁸⁾) ou adulto (COORE & RANDLE⁽⁶⁾; MALAISSE, MALAISSE-LAGAE & MAYHEW⁽⁴⁵⁾; MALAISSE, MALAISSE-LAGAE & WRIGHT⁽⁴⁶⁾; FELDMAN, QUICKEL Jr. & LEBOVITZ⁽¹⁴⁾); (e) cultura de tecido pancreático fetal (VECCHIO & GONET⁽⁶⁹⁾) ou neonatal (HOLLANDE et alii⁽²¹⁾); (f) ilhotas isoladas por microdissecção (HELLERSTROM⁽¹⁹⁾) ou por collagenase (MOSKALEWSKI⁽⁵⁹⁾; LACY & KOSTIANOVSKY⁽³⁵⁾), incubadas em condições estáticas (KEEN, SELLS & JARRETT⁽²⁹⁾; HOWELL & TAYLOR⁽²²⁾; MALAISSE, MALAISSE-LAGAE & KING⁽⁴⁷⁾; VANCE et alii⁽⁶⁸⁾; COLLGARCIA & GILL⁽⁵⁾; ATKINS & MATTY⁽³⁾; LERNMARK⁽⁴²⁾; HELLMAN et alii⁽²⁰⁾) ou dinâmicas (IDAH⁽²³⁾; LACY,

WALKER & FINK⁽³⁶⁾; LAMBERT, HENQUIN & MALVAUX⁽³⁸⁾) ou, ainda, mantidas em cultura (LAMBERT et alii⁽³⁹⁾); (g) cultura de células insulares (KOSTIANOVSKY et alii⁽³²⁾; HOLLANDE et alii⁽²¹⁾); (h) perfusão de células insulares (IDAH⁽²⁵⁾) e (i) incubação de membranas e grânulos de células insulares (DAVIS & LAZARUS⁽¹⁰⁾; LAZARUS, DAVIS & O'CONNOR⁽⁴⁰⁾; DAVIS & LAZARUS⁽¹¹⁾). Considerações sobre as vantagens e limitações apresentadas pelas técnicas *in vitro*, para estudo da secreção de insulina, foram feitas por FELDMAN⁽¹³⁾ e HEDESKOV⁽¹⁸⁾.

3. ESTÍMULO SECRETÓRIO

Os agentes capazes de desencadear a secreção de insulina são denominados **iniciadores ou estímulos primários**, enquanto aqueles que aumentam uma resposta secretória primária, mas são, por si só, incapazes de eliciar uma resposta secretória, são referidos como **potencializadores ou estímulos secundários**. Dentre os agentes primários, tais como, carboidratos (v.g. glicose, manose, N-acetilglicosamina, inosina, gliceraldeído, diidroxiacetona, glicosamina); aminoácidos (v.g. arginina, leucina, lisina, fenilalanina); ácidos graxos e outros, a α -D-glicose é, reconhecidamente, o maior estímulo fisiológico da secreção de insulina.

* Mestre em Biologia na área de Fisiologia e Biofísica.

O processo de secreção insulínica estimulado por glicose é aceito, atualmente, como uma seqüência encadeada de etapas. Estas se iniciam com o reconhecimento (metabolismo, possivelmente) do secretagogo pelas células beta, passando pelo aumento da concentração (atividade) citosólica de Ca^{2+} e ativação do sistema de microtúbulos e microfilamentos, indo até a ocorrência da migração das vesículas armazenadoras de insulina, em direção à membrana plasmática, e subsequente extrusão do conteúdo granular para o líquido intersticial.

3.1. Reconhecimento do estímulo

A idéia de que o processo de secreção de insulina envolveria o metabolismo da glicose remonta a décadas passadas. Já em 1958, POZZA et alii⁽⁶³⁾, testando o efeito de vários carboidratos, injetados na artéria pancreática de cães, levantaram a hipótese de que a secreção de insulina seria estimulada por açúcares metabolizáveis. Resultados de KILO et alii⁽³¹⁾, KARAM et alii⁽²⁸⁾, IDAHL⁽²⁴⁾, MALAISSE⁽⁴³⁾ e KUZUYA, KAJINUMA & IDE⁽³³⁾ sugerem que a glicose precisa penetrar na célula beta e ser metabolizada, para provocar a secreção de insulina. Por sua vez, GAGLIARDINO & MARTIN⁽¹⁵⁾ consideram que o efeito estimulatório da glicose depende do seu metabolismo, provavelmente, no Ciclo de Krebs. Um papel deste Ciclo, como promotor do sinal e energia requeridos para o processo de secreção de insulina, foi sugerido por MALAISSE & MALAISSE-LAGAE⁽⁴⁴⁾ para explicar o efeito estimulatório provocado por ácidos graxos e aminoácidos. MALAISSE et alii⁽⁴⁹⁾ verificaram que a glicólise representa a maior via de metabolismo da glicose nas ilhotas pancreáticas, estando intimamente envolvida no processo de identificação da glicose pela células beta, como um estímulo para a secreção de insulina. Sugerem que, no processo de secreção da insulina por glicose, a glicólise pode regular os processos fisiológicos dentro da célula beta. MALAISSE et alii⁽⁵⁴⁾ consideram que o metabolismo da glicose na célula beta, especialmente no segmento metabólico localizado além do nível de triose-fosfato, representa o componente-chave do dispositivo glicosensor daquela célula. Consideram, também, que o potencial insulínico dos carboidratos está em paralelo

com sua capacidade de sofrer glicólise. Opiniões concordantes com esta são, igualmente, expressas por MALAISSE et alii⁽⁴⁸⁾ e ZAWALICH et alii⁽⁷³⁾. Outrossim, tem-se constatado que as curvas relacionando as taxas de secreção de insulina e a utilização de glicose pela célula beta, com a concentração extracelular de glicose, são similares (ASHCROFT et alii²; ASHCROFT, WEERASINGHE & RANDLE¹).

Resultados obtidos por MALAISSE-LAGAE & MALAISSE⁽⁵⁶⁾ sugerem que o estímulo para a captação de Ca^{2+} depende do metabolismo da glicose pela célula beta. Segundo SENER, LEVY & MALAISSE⁽⁶⁵⁾ e ISHIBASHI et alii⁽²⁶⁾, a glicólise exerce, na célula beta, um estreito controle sobre a mobilização de Ca^{2+} , levando à secreção de insulina.

Recentemente, foi proposto que a conexão entre os eventos metabólicos e o rearranjo dos fluxos catiônicos da célula beta é feita por intermédio da geração intracelular de $NAD(P)H^+$ e H^+ , em paralelo com uma produção aumentada de ATP, que pode ser essencial para preencher a necessidade de energia daquela célula (MALAISSE et alii⁵⁵; MALAISSE et alii a⁵⁰, b⁵², c⁵³). Assim, a capacidade insulínica de um secretagogo dependeria do grau de elevação de nucleotídeos piridínicos reduzidos por ele provocada, nucleotídeos estes que afetariam a afinidade, por cátions, dos sistemas ionoforéticos da célula beta (MALAISSE et alii c⁵³).

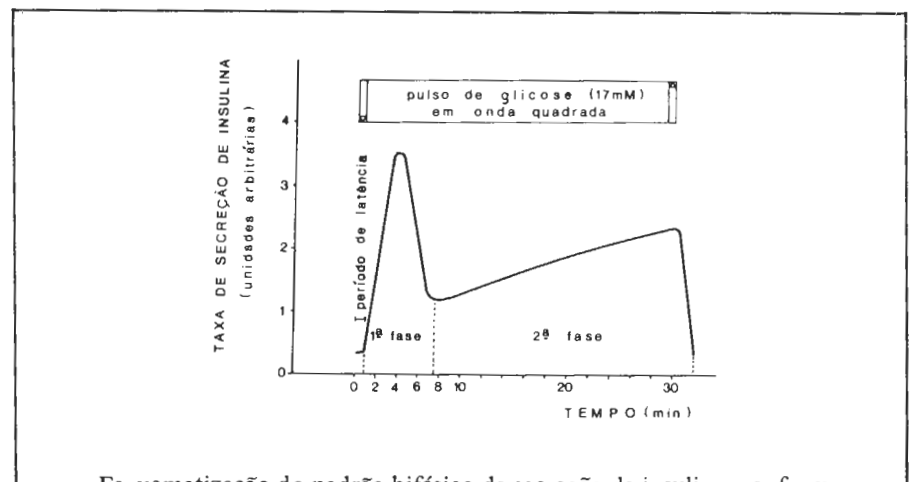
Os resultados experimentais que correlacionam o metabolismo de substratos e a secreção de insulina, pelas células beta, constituem evidências favoráveis ao *modelo do sítio-substrato*, como um hipótese explicativa para a ação insulínica dos estímulos primários da secreção. Esta hipótese foi,

recentemente, discutida em revisão publicada por MALAISSE et alii⁽⁵⁰⁾.

Em oposição, evidências favoráveis ao *modelo do sítio-regulador* (glicorreceptor) têm sido obtidas por outros pesquisadores. Segundo este modelo, a glicose pode desempenhar um papel duplo nas células beta, ao agir como estimulante químico, em adição ao seu papel de substrato metabólico (MATSCHINSKY et alii⁵⁷). Dessa forma, a glicose, por si mesma, desencadearia a secreção de insulina, ao agir em um glicorreceptor membranar. Dados indicadores de que a glicólise não é um evento necessário para a secreção de insulina foram obtidos por PACE & MATSCHINSKY⁽⁶¹⁾, ao verificarem que a citocalasina B provoca inibição da utilização de glicose, em condições que aumentam a secreção de insulina. Entretanto, HEDESKOV⁽¹⁸⁾, revisando as evidências favoráveis ou contrárias a uma e outra das hipóteses, considera fragmentários e contraditórios os argumentos em favor do *modelo do sítio-regulador*, tendo reunido um maior volume de evidências favoráveis ao *modelo do sítio-substrato*.

4. CINÉTICA DA SECREÇÃO

A secreção de insulina, evocada por glicose em concentração supralimiar (estímulo em *onda quadrada*), apresenta um característico padrão bifásico. Assim, após um período de 50 a 100s de latência, ocorre um rápido aumento da taxa de secreção de insulina, que cai a níveis intermediários (entre os níveis basal e máximo) dentro de 5 a 10 min. Essa fase inicial é seguida de um segundo e prolongado período, que apresenta um aumento mais gradual da secreção (GRODSKY et alii, apud HEDESKOV¹⁸) (Figura).



Esquematização do padrão bifásico da secreção de insulina, conforme HEDESKOV (1980¹⁸).

Esse padrão de resposta foi, inicialmente, constatado em pâncreas isolado e perfundido (CURRY, BENNETT & GRODSKY a⁷, b⁸), sendo, posteriormente, observado em outros sistemas isolados, tais como: (a) fragmentos isolados de pâncreas (KIKUCHI et alii³⁰); (b) ilhotas isoladas (IDAHL²³; IDAHL²⁴; LACY, WALKER & FINK³⁶; LACY, KLEIN & FINK³⁷; LAMBERT, HENQUIN & MALVAUX³⁸; SIEGEL et alii⁶⁶) e (c) suspensão de células insulares (IDAHL et alii²⁵).

É possível que tal padrão tenha uma importância fisiológica, uma vez que tem sido constatado em seres humanos, tanto a nível do sangue periférico, quanto no sangue portal (CERASI, LUFT & EFENDIC; ELAHI et alii; BLACKARD & NELSON; LUND, SCHMIDT & DECKERT, apud WOLLHEIM & SHARP⁷⁰). Por outro lado, em certos tipos de diabetes, nota-se a falta da resposta inicial à glicose, com preservação da segunda fase (CERASI, LUFT & EFENDIC, apud WOLLHEIM & SHARP⁷⁰).

Diversas hipóteses têm sido aventadas para explicar a forma bifásica de secreção. Nesse sentido, GRODSKY et alii, apud RANDLE & HALES⁽⁶⁴⁾, propõem um modelo de dois compartimentos para a insulina estocada na célula beta. Um, localizado próximo à membrana, teria dimensões reduzidas e seria rapidamente mobilizado, enquanto o outro, mais interno, apresentaria grandes dimensões e lenta mobilização. Por outro lado, LACY⁽³⁴⁾ sugere que

os grânulos de insulina alinhados ao longo dos microtúbulos poderiam ser responsáveis pela primeira fase da secreção, enquanto a fase posterior decorreria da secreção dos grânulos inicialmente livres no citoplasma, e que se ligariam aos microtúbulos. GRODSKY et alii, apud GRODSKY⁽¹⁶⁾ consideram a possibilidade daquele padrão decorrer de um mecanismo de inibição, por *feedback*, da secreção. Esta hipótese é apoiada por evidências eletrofisiológicas sugestivas de uma auto-regulação secretória da célula beta, pela própria insulina (PACE et alii⁶²).

MALASSE et alii⁽⁵¹⁾ propõem que os grânulos localizados na rede microfilamentar seriam os responsáveis pela primeira fase, enquanto a segunda corresponderia a uma mobilização dos grânulos secretórios localizados ao longo dos microtúbulos. ORCI & UNGER⁽⁶⁰⁾ atribuem o padrão bifásico a uma especial disposição histológico-funcional das células insulares. Esta hipótese, entretanto, tornou-se insustentável, após a verificação de um padrão bifásico da secreção de insulina em suspensão de células insulares (IDAHL et alii²⁵). Por sua vez, MEISSNER & ATWATER⁽⁵⁸⁾ consideram que o referido padrão seria um fenômeno dependente, ao menos parcialmente, do potencial de membrana. Segundo ATWATER & BEIGELMAN⁽⁴⁾, a resposta secretória bifásica seria explicável pela existência de um sistema regulatório na membrana da célula beta, possivelmente

um canal de K⁺ dependente de Ca²⁺ intracelular. De acordo com DAVIS & LAZARUS⁽¹⁰⁾ e LAZARUS, DAVIS & O'CONNOR⁽⁴⁰⁾, a atuação da glicose a nível de um hipotético receptor membranar produziria a primeira fase, enquanto a sua simultânea entrada e metabolismo na célula beta iniciaria e manteria a segunda fase da secreção de insulina. Finalmente, WOLLHEIM et alii⁽⁷¹⁾ reúnem evidências de que aquele padrão seria reflexo de uma alteração bifásica na concentração citosólica do Ca²⁺.

5. CONCLUSÃO

Uma grande variedade de técnicas tem sido empregada para o estudo dos processos envolvidos com a secreção de insulina.

Existem duas hipóteses (modelos) que procuram explicar o mecanismo de reconhecimento da glicose pela célula beta, a saber: (a) *o modelo do sítio regulador*; (b) *o modelo do sítio substrato*. O conjunto de dados reunidos até o presente parece favorecer, em maior grau, o segundo modelo.

O padrão de resposta secretória a concentrações eficazes de glicose apresenta uma forma bifásica. Inúmeras hipóteses têm sido propostas na tentativa de explicar esse fenômeno; o qual não seria simplesmente uma particularidade acadêmica, mas teria significado em condições fisiológicas, como também em algumas situações patológicas (e. g. certos tipos de diabetes).

ABSTRACT

This review purposed to explain insulin release regarding its unchain and response pattern. The metabolic and glucoreceptor hypothesis are described for glucose recognition. The biphasic pattern of insulin secretion is discussed within limits of a large number of explicative hypothesis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ASHCROFT, S.J.H.; WEERASINGHE, L.C.C. & RANDLE, P.J. Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release. *Biochem. J.*, 132:223-31, 1973.
02. ---; ---; BASSETT, J.M. & RANDLE, P.J. The pentose cycle and insulin release in mouse pancreatic islets. *Biochem. J.*, 126:525-32, 1972.
03. ATKINS, T. & MATTY, A.J. Metabolic viability of freehand microdissected and collagenase-isolated islets of Langerhans. *J. Endocrin.*, 46:XVII-XVIII, 1970.
04. ATWATER, I. & BEIGELMAN, P.M. Dynamic characteristics of electrical activity in pancreatic B-cells I. Effects of calcium and magnesium removal. *J. Physiol.*, Paris, 72:769-86, 1976.
05. COLL-GARCIA, E. & GILL, J.R. Insulin release by isolated pancreatic islets of the mouse incubated *in vitro*. *Diabetologia*, 5:61-6, 1969.
06. COORE, H.G. & RANDLE, P.J. Regulation of insulin secretion studied with pieces of rabbit pancreas incubated *in vitro*. *Biochem. J.*, 93:66-78, 1964.

07. CURRY, D.L.; BENNETT, L.L. & GRODSKY, G.M. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology*, 83:572-84, 1968a.
08. ---, ---, & ---. Multiphasic insulin secretion by the isolated perfused rat pancreas. *Fed. Proc.*, 27:496, 1968b. (Abstract).
09. ---, ---, & ---. Requirement for calcium ion in insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Amer. J. Physiol.*, 214:174-8, 1968c.
10. DAVIS, B. & LAZARUS, N.R. An *in vitro* system for studying insulin release caused by secretory granules - plasma membrane interaction: definition of the system. *J. Physiol.*, 256:709-29, 1976.
11. ---, & ---. An *in vitro* system for studying insulin release: effects of glucose and glucose-6-phosphate. *J. Physiol.*, 271:273-88, 1977.
12. EKINS, R.P. The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. *Clin. Chim. Acta*, 5:453-9, 1960.
13. FELDMAN, J.M. Species variation in the islets of Langerhans. *Diabetologia*, 16:1-4, 1979.
14. ---, QUICKEL Jr., K.E. & LEBOVITZ, H.E. Potentiation of insulin secretion *in vitro* by serotonin antagonists. *Diabetes*, 21:779-88, 1972.
15. GAGLIARDINO, J.J. & MARTIN, J.M. Studies on the mechanism of insulin release. *Metabolism*, 15:1068-75, 1966.
16. GRODSKY, G.M. Insulin and the pancreas. *Vitam. & Horm. - Advanc. Res. Appi.*, 28:36-101, 1970.
17. ---, BATTIS, A.A.; BENNETT, L.L. VCELLA, C.; McWILLIAMS, N.B.; & SMITH, D.F. Effects of carbohydrates on secretion of insulin from isolated rat pancreas. *Amer. J. Physiol.*, 205:638-44, 1963.
18. HEDESKOV, C.J. Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiol. Rev.*, 60:442-509, 1980.
19. HELLERSTROM, C. A method for the microdissection of intact pancreatic islets of mammals. *Acta endocr. Copenhagen*, 45:122-32, 1964. *Invest.*, 41:1372-3, 1962.
20. HELLMAN, B.; LERNMARK, A.; SEHLIN, J. & TALJEDAL, I.B. The pancreatic B-cell recognition of insulin secretagogues. V. Binding and stimulatory action of phlorizin. *Molec. Pharmacol.*, 8:759-69, 1972.
21. HOLLANDE, E.; GIRON, B.J.; REYT, F. & DUTRILLAUX, M.C. Insulin secretion by human pancreas cultured for one year. *J. Physiol.*, Paris, 72:815-32, 1976.
22. HOWELL, S.L. & TAYLOR, K.W. Potassium ions and the secretion of insulin by islets of Langerhans incubated *in vitro*. *Biochem. J.* 108:17-24, 1968.
23. IDAHL, L.A. A micro perfusion device for pancreatic islets allowing concomitant recordings of intermediate metabolites and insulin release. *Analyt. Biochem.*, 50:386-98, 1972.
24. ---. Dynamics of pancreatic B-cell responses to glucose. *Diabetologia*, 9:403-12, 1973.
25. ---, LERNMARK, A.; SEHLIN, J. & TALJEDAL, I.B. The dynamics of insulin release from mouse pancreatic islet cells in suspension. *Pflug. Arch.*, 366:185-8, 1976.
26. ISHIBASHI, F.; SATO, T.; ONARI, K.; TSUBOTA, M. & KAWATE, R. Close interrelationships among glucose oxidation, glucose-induced ⁴⁵Ca uptake and insulin release of presumed pancreatic B-cell mass. *Horm. metabol. Res.*, 12:89-94, 1980.
27. IVERSEN, J. Secretion of glucagon from the isolated, perfused canine pancreas. *J. clin. Invest.*, 50:2123-36, 1971.
28. KARAM, J.H.; GRASSO, S.G.; WEGIENKA, L.C.; GRODSKY, G.M. & FORSHAM, P.H. Effect of selected hexoses, of epinephrine and of glucagon on insulin secretion in man. *Diabetes*, 15:571-8, 1966.
29. KEEN, H.; SELLS, R. & JARRETT, R.J. A method for the study of the metabolism of isolated mammalian islets of Langerhans and some preliminary results. *Diabetologia*, 1:28-32, 1965.
30. KIKUCHI, M.; RABINOVITCH, A.; BLACKARD, W.G. & RENOLD, A.E. Perfusion of pancreas fragments. A system for the study of dynamic aspects of insulin secretion. *Diabetes*, 23:550-9, 1974.
31. KILO, C.; LONG Jr., C.L.; BAILEY, R.M.; KOCH, M.B. & RECENT, L. Studies to determine whether glucose must be metabolized to induce insulin release. *J. clin. Invest.*, 41:1372, 1962.
32. KOSTIANOVSKY, M.; McDANIEL, M.L.; STILL, M.F.; CODILLA, R.C. & LACY, P.E. Monolayer cell culture of adult rat islets of Langerhans. *Diabetologia*, 10:337-44, 1974.
33. KUZUYA, T.; KAJINUMA, H. & IDE, T. Effect of intrapancreatic injection of potassium and calcium on insulin and glucagon secretion in dogs. *Diabetes*, 23:55-60, 1974.
34. LACY, P.E. Beta cell secretion - from the standpoint of a pathobiologist. *Diabetes*, 19:895-905, 1970.
35. ---, & KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, 16:35-9, 1967.
36. ---, WALKER, M.M. & FINK, C.J. Perfusion of isolated rat islets *in vitro* - Participation of the microtubular system in the biphasic release of insulin. *Diabetes*, 21:987-98, 1972.
37. ---, KLEIN, N.J. & FINK, C.J. Effect of cytochalasin B on the biphasic release of insulin in perfused rat islets. *Endocrinology*, 92:1458-68, 1973.
38. LAMBERT, A.E.; HENQUIN, J.-C. & MALVAUX, P. Cationic environment and dynamics of insulin secretion. I. Effect of low concentrations of sodium. *Endocrinology*, 95:1069-77, 1974.
39. ---, JUNOD, A.; STAUFFACHER, W.; JEANRENAUD, B. & RENOLD, A.E. Organ culture of fetal rat pancreas I. Insulin release induced by caffeine and by sugars and some derivatives. *Biochim. biophys. Acta (Amst)*, 184:529-39, 1969.
40. LAZARUS, N.R.; DAVIS, B. & O'CONNOR, K.J. An approach to a molecular understanding of exocytotic insulin release. *J. Physiol.*, Paris, 72:787-94, 1976.
41. LENZEN, S. Insulin secretion by isolated perfused rat and mouse pancreas. *Amer. J. Physiol.*, 236:E391-E400, 1979.
42. LERNMARK, A. Isolated mouse islets as a model for studying insulin release. *Acta diabet. lat.*, 8:649-79, 1971.
43. MALAISSE, W.J. Insulin secretion: multifactorial regulation for a single process of release. *Diabetologia*, 9:167-73, 1973.
44. ---, & MALAISSE-LAGAE, F. Stimulation of insulin secretion by noncarbohydrate metabolites. *J. Lab. clin. Med.*, 72:438-48, 1968.
45. ---, ---, & MAYHEW, D. A possible role for the adenylylase system in insulin secretion. *J. clin. Invest.*, 46:1724-34, 1967.
46. ---, ---, & WRIGHT, P.H. A new method for the measurement in

- vitro* of pancreatic insulin secretion. *Endocrinology*, 80: 99-108, 1967.
47. ---, ---, & KING, S. Quantitative and qualitative aspects of islet function in the rat. *J. Lab. clin. Med.*, 71:56-64, 1968.
48. MALAISSE, W.J.; SENER, A.; KOSER, M. & HERCHUELZ, A. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release - Metabolism of α - and β -D-glucose in isolated islets. *J. Biol. Chem.*, 251:5936-43, 1976a.
49. ---, ---, LEVY, J. & HERCHUELZ, A. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXII. Qualitative and quantitative aspects of glycolysis in isolated islets. *Acta diabet. lat.*, 13:202-15, 1976b.
50. ---, ---, HERCHUELZ, A. & HUTTON, J.C. Insulin release: The fuel hypothesis. *Metabolism*, 28:373-86, 1979a.
51. ---, VAN OBBERGHEN, E.; DEVIS, G.; SOMERS, G. & RAVAZZOLA, M. Dynamics of insulin release and microtubular-microfilamentous system. V. A model for the phasic release of insulin. *Europ. J. clin. Invest.*, 4:313-8, 1974.
52. ---, HUTTON, J.C.; KAWAZU, S.; HERCHUELZ, A.; VALVERDE, I. & SENER, A. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release XXXV. The links between metabolic and cationic events. *Diabetologia*, 16:331-41, 1979b.
53. ---, KAWAZU, S.; HERCHUELZ, A.; HUTTON, J.C.; SOMERS, G.; DEVIS, G. & SENER, A. The stimulus secretion coupling of glucose-induced insulin release-Effect of lactate upon islet function. *Arch. Biochem. & Biophys.*, 194: 49-62, 1979c.
54. ---, SENER, A.; HERCHUELZ, A.; HUTTON, J.C.; DEVIS, G.; SOMERS, G.; BLONDEL, B.; MALAISSE-LAGAE, F. & ORCI, L. Sequential events in the process of glucose-induced insulin release. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 9., New Delhi, 1976. *Proceedings*. Amsterdam, Excerpta Médica, 1976c. p. 95-102 (Series 413, Diabetes).
55. ---, HERCHUELZ, A.; DEVIS, G.; SOMERS, G.; BOSCHERO, A.C.; HUTTON, J.C.; KAWAZU, S.; SENER, A.; ATWATER, I.J.; DUNCAN, G.; RIBALET, B. & ROJAS, E. Regulation of calcium fluxes and their regulatory roles in pancreatic islets. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 307:562-82, 1978.
56. MALAISSE-LAGAE, F. & MALAISSE, W.J. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release III. Uptake of 45 Calcium by isolated islets of Langerhans. *Endocrinology* 88:72-80, 1971.
57. MATSCHINSKY, F.M.; ELLERMAN, J.E.; KRZANOWSKI, J.; KOTLER-BRAJTBURG, J.; LANDGRAF, R. & FERTEL, R. The dual function of glucose in islets of Langerhans. *J. Biol. Chem.*, 246: 1007-11, 1971.
58. MEISSNER, H.P. & ATWATER, I.J. The kinetics of electrical activity of beta cells in response to a "square wave" stimulation with glucose or glibenclamide. *Horm. metabol. Res.*, 8:11-6, 1976.
59. MOSKALEWSKI, S. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen. Comparat. Endocrinol.*, 5:342-53, 1965.
60. ORCI, L. & UNGER, R.H. Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells. *Lancet*, 2:1243-4, 1975.
61. PACE, C.S. & MATSCHINSKY, F.M. Cytochalasin B: its action on glucose-induced electrical and metabolic responses in rat pancreatic islets. *Biochim. biophys. Acta*, 354: 188-93, 1974.
62. ---, ---, LACY, P.E.; CONANT, S. Electrophysiological evidence for the autoregulation of beta cell secretion by insulin. *Biochim. biophys. Acta*, 497:408-14, 1977.
63. POZZA, G.; GALANSINO, G.; HOFFELD, H. & FOA, P.P. Stimulation of insulin output by monosaccharides and monosaccharide derivatives. *Amer. J. Physiol.*, 192:497-500, 1958.
64. RANDLE, P.J. & HALES, C.N. Insulin release mechanisms. In: STEINER, D.F. & FREINKEL, N., eds. *Handbook of Physiology. Endocrinology*. Washington, D.C., Amer. Physiol. Soc., 1972. Sect. 7, v. 1, p. 219-35.
65. SENER, A.; LEVY, J. & MALAISSE, W.J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release-Does glycolysis control calcium transport in the B-cell? *Biochem. J.*, 156:521-5, 1976.
66. SIEGEL, E.G.; WOLLHEIM, C.B.; SHARP, G.W.G.; HERBERG, L. & RENOLD, A.E. Defective calcium handling and insulin release in islets from diabetic chinese hamsters. *Biochem. J.*, 180:233-6, 1979.
67. SUSSMAN, K.E.; VAUGHAN, G.D. & TIMMER, R.F. An *in vitro* method for studying insulin secretion in the perfused isolated rat pancreas. *Metabolism*, 15: 466-76, 1966.
68. VANCE, J.E.; BUCHANAN, K.D.; CHALLONER, D.R. & WILLIAMS, R.H. Effect of glucose concentration on insulin and glucagon release from isolated islets of Langerhans of the rat. *Diabetes*, 17:187-93, 1968.
69. VECCHIO, D. & GONET, A.F. Culture d'organe de pancreas foetal de rat: I. Effets du glucose, d'autres composants du milieu de culture, et d'un sulfamide hypoglycémiant. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 25:103-22, 1967.
70. WOLLHEIM, C.B. & SHARP, G.W.G. Regulation of insulin release by calcium. *Physiol. Rev.*, 61:914-73, 1981.
71. ---, KIKUCHI, M.; RENOLD, A. E. & SHARP, G.W.G. The roles of intracellular and extracellular Ca^{++} in glucose-stimulated biphasic insulin release by rat islets. *J. clin. Invest.*, 62:451-8, 1978.
72. YALOW, R.S. & BERSON, S.A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. clin. Invest.*, 39:1157-75, 1960.
73. ZAWALICH, W. S.; ROGNSTAD, R.; PAGLIARA, A.S. & MATSCHINSKY, F.M. A comparison of the utilization rates and hormone-releasing actions of glucose, mannose, and fructose in isolated pancreatic islets. *J. Biol. Chem.*, 252:8519-23, 1977.