

Laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona
(Prof. F. Ponz)

Presencia de glucagón en los extractos insulínicos del albacora, *Germo alalunga*, Gml.

M. Lluch Trull y J. Planas Mestres

(Recibido para publicar el 3 de febrero de 1956)

La presencia de glucagón en el páncreas de los animales parece ser un hecho cierto (5, 6, 8, 10, 12, 14). Igualmente, se ha probado su existencia en muestras de insulinas comerciales (1, 2, 13) y en extractos de nódulos pancreáticos endocrinos de distintos peces (1, 3, 7). Por este motivo hemos creído conveniente estudiar la presencia de glucagón en los extractos insulínicos de nódulos pancreáticos endocrinos del *Germo alalunga*, Gml. MIALHE (7) había citado en *Thunnus germo*, Lacep. (primitiva denominación del *Germo alalunga*) la presencia de actividad hiperglucemiante en los extractos de los islotes endocrinos, aunque el escaso material disponible no le permitió más que esta referencia cualitativa

Material y métodos

Se han utilizado los nódulos pancreáticos endocrinos del albacora o bonito del Norte (*Germo alalunga*, Gml.), recogidos en el puerto de Vigo. La extracción de la insulina se ha hecho según el método de DUDLEY (4). El glucagón ha sido valorado por su acción hiperglucemiante en conejos, en ayuno de 24 horas, determinando el azúcar sanguíneo cada 5 minutos después de la inyección, durante los 15 minutos primeros. Los extractos se administraban siempre por inyección endovenosa de 0'05 c. c. por 2 Kg. de peso. Se han comparado los resulta-

dos con una muestra de glucagón amorfo Lilly, lote número 208-158B-197 (*). Las glucemias se determinan según modificación del método de Somogy (11). Los resultados se expresan en gramos de glucosa por litro de sangre o por los porcentajes de aumento respecto de las normogluceurias.

Resultados

1.º ACCIÓN HIPERGLUCEMIANTE INICIAL DE LOS EXTRACTOS INSULÍNICOS

En un lote de tres conejos se ha administrado el extracto insulínico de nódulos pancreáticos endocrinos por vía endovenosa a razón de 0'7 U. I. de insulina por cada 2 kg. de peso corporal. Se ha procurado inyectar la insulina en volúmenes aproximadamente iguales en todos los animales, efectuando las diluciones con agua bidestilada.

En la tabla I se expresan los resultados obtenidos. En los tres conejos ensayados se observa un efecto hiperglucemiante inicial, que es máximo a los cinco minutos después de la inyección para luego ir decreciendo y aparecer el efecto hipoglucemiante de la insulina.

TABLA I

Efecto hiperglucemiante inicial de los extractos insulínicos de nódulos pancreáticos endocrinos del Germe alalunga, Gml. Glucemias durante los 75 minutos siguientes a la inyección

Conejo	Peso Kg.	Azúcar sanguíneo (g./l.)						
		0'	5'	10'	15'	30'	45'	75'
1	2'04	0'95	1'13	1'13	0'55	0'65	0'67	0'93
2	2'00	1'04	1'32	1'12	1'09	0'95	0'93	0'98
3	1'90	1'00	1'15	1'13	0'64	0'70	0'78	0'93

Los extractos habían sido previamente valorados para ver su riqueza en insulina (9), que fué de unas 150-160 U. I. por gramo de tejido pancreático endocrino.

* Expresamos nuestro agradecimiento al Dr. W. R. Kirtley, de la Eli Lilly and Company de Indianápolis (Estados Unidos) por el envío de dicha muestra.

2.º ACCIÓN HIPERGLUCEMIANTE DE LOS EXTRACTOS DESPUÉS DE SU INACTIVACIÓN ALCALINA

Al objeto de ver si el efecto hiperglucemiante de los extractos de nódulos endocrinos del albacora se debía a la propia insulina o era debido a la existencia de una nueva substancia, se han efectuado un grupo de ensayos en que se destruye la insulina de los extractos por incubación alcalina con KOH 0'08 N, según la técnica de SUTHERLAND y col. (15, 16), ensayando luego su efecto sobre la glucemia del conejo.

Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla II. En todos los ensayos se observa que la incubación alcalina ha destruído por completo la actividad insulínica de los extractos, persistiendo, sin embargo, el efecto hiperglucemiante. Este efecto se mantiene casi constante durante los 75 minutos en que se ha ensayado el extracto.

TABLA II

Efecto hiperglucemiante de los extractos insulínicos de nódulos pancreáticos endocrinos del albacora, previa incubación alcalina. Glucemias durante los 75 minutos siguientes a la inyección

Conejo	Peso Kgs.	Glucemias (g. l.)						
		0'	5'	10'	15'	30'	45'	75'
1	1'88	1'23	1'45	1'35	1'36	1'26	1'23	1'43
2	1'84	0'95	1'13	1'11	1'23	1'05	1'08	1'24
3	1'80	1'07	1'33	1'33	1'28	1'30	1'32	1'33
4	2'00	1'00	1'20	1'26	1'1	1'27	1'27	1'33
1	1'88	1'02	1'19	1'09	1'16	1'11	1'04	1'17

3.º DESTRUCCIÓN DEL FACTOR HIPERGLUCEMIANTE POR EL ÁCIDO TRICLOROACÉTICO O POR HIDRÓLISIS ALCALINA

Según SUTHERLAND (16), la adición de ácido tricloroacético hasta concentración de 1'5 % a un extracto insulínico sometido previamente a incubación alcalina a 37° para suprimir la actividad hipoglucemiante, elimina también buena parte del efecto hiperglucemiante residual. En la Tabla III, el conejo número 2, que ha sido inyectado con extracto tratado de esta forma, muestra tan sólo una ligera hipergluceemia a diferencia del mismo animal sometido a inyección de extracto incubado sin adición posterior de tricloroacético (Tabla II).

En otra parte del extracto se ha seguido la técnica de Su-

THERLAND y col. (15) de destrucción total del factor hiperglucemiante por hidrólisis alcalina a 100° C., con KOH 0'08 N durante 40 minutos.

En la Tabla III se dan los resultados obtenidos, observándose la desaparición, tanto de la actividad insulínica, como de toda acción hiperglucemiante.

TABLA III

Inactivación del factor hiperglucemiante de extractos insulínicos de nodulos endocrinos del albacora, por el ácido tricloroacético (1'5 %) y por hidrólisis alcalina a 10°. Glucemias durante los 75 minutos siguientes a la inyección

Conejo	Peso Kg.	Inactivación	Glucemias (g./l.)						
			0'	5'	10'	15'	30'	45'	75'
2	2'00	Tricloroacético	1'06	1'14	1'13	1'08	1'13	1'12	1'08
4	1'70	KOH, 100°	1'00	1'04	1'03	1'00	1'02	0'97	—
5	1'71	"	0'98	1'00	0'99	1'03	1'06	0'98	1'00
6	2'00	"	1'09	1'10	1'12	1'06	1'10	1'07	—
7	2'10	"	1'00	0'95	1'00	1'07	1'03	1'07	1'03

4.º VALORACIÓN APROXIMADA DEL PODER HIPERGLUCEMIANTE DE LOS EXTRACTOS

La actividad hiperglucemiante ha sido comparada con el efecto obtenido con una muestra de glucagón amorfo Lilly (lote número 208-158B-197)

Al objeto de descartar cualquier efecto hiperglucemiante que los productos de la hidrólisis alcalina parcial pudieran presentar sobre la glucemia hemos comparado el efecto del glucagón amorfo con el producido por los extractos sin ningún tratamiento previo. El efecto hiperglucemiante de los extractos en estas condiciones persiste únicamente durante los diez primeros minutos siguientes a la inyección, con lo cual hemos tomado en los ensayos con el standard las glucemias correspondientes a estos diez primeros minutos, al objeto de hacer comparables los resultados.

Después de un ensayo previo para saber el orden de actividad de los extractos, adoptamos para el standard una dosis de 7γ de glucagón por dos Kg. de peso corporal, para efectuar la valoración.

Siendo G_n la normoglucemia y G_m la media aritmética de

ios valores de glucemias a los cinco y diez minutos después de la administración del standard o del problema, el porcentaje de aumento es : $R = \frac{G_m - G_n}{G_a} \times 100$.

Para el cálculo aproximado de la actividad del problema se ha supuesto proporcionalidad entre las concentraciones del factor hiperglucemiante y los porcentajes de aumento de las glucemias.

En la Tabla IV se reúnen las glucemias y los porcentajes de aumento producidos por el extracto y por el standard, en tres conejos.

TABLA IV

Comparación del efecto hiperglucemiante de extractos insulínicos del albacora y del glucagón amorfo Lilly (7 γ/2 kg.)

Tiempos después de la inyección	Glucemias (g/l.)						Porcentajes de aumento (R.)	
	Extracto			Standard			Extracto	Standard
	0'	5'	10'	0'	5'	10'		
Conejo 1	0'95	1'13	1'13	1'00	1'10	1'07	18'9	8'5
Conejo 2	1'04	1'32	1'12	1'00	1'10	1'07	17'3	8'5
Conejo 3	1'00	1'15	1'13	1'03	1'13	1'08	14'0	7'2

De estos datos se calcula para los 0'05 c. c. del extracto inyectados un valor medio equivalente a 14'4 γ (media aritmética de los tres conejos). Como 10 c. c. de extracto correspondían a un gramo de nódulo fresco, la actividad hiperglucemiante puede evaluarse en 2'9 mg. de glucagón por gramo de peso fresco de nódulo endocrino.

El standard de glucagón amorfo Lilly tiene una actividad que corresponde al 50 % del glucagón cristalizado Lilly, de aquí que, en realidad, la riqueza en glucagón de los extractos de nódulos pancreáticos endocrinos del *Germo alalunga* corresponde a una riqueza aproximada de 1'45 mg. de glucagón cristalizado por gramo de nódulo endocrino. Teniendo en cuenta que un animal de peso medio presenta un nódulo pancreático endocrino de un peso aproximado de 70 mg. (9), el peso de glucagón por animal sería de unas 100 γ.

Discusión

Se ha confirmado la referencia de Mialhe (7) sobre la presencia de una acción hiperglucemiante en los extractos de nódulos pancreáticos de *Gergo alalunga*.

Su ensayo cualitativo en ratas ha sido desarrollado por nosotros en conejos.

El efecto hiperglucemiante de los extractos en los diez primeros minutos consecutivos a la inyección, es muy claro.

La inactivación de la insulina por incubación alcalina con KOH 0'08 N hace desaparecer el efecto hipoglucemiante insulínico, conservando los extractos la acción hiperglucemiante, que se mantiene ahora durante los 75 minutos de observación. Esto demuestra que el aumento de la glucemia se debe a una sustancia distinta de la insulina.

El tratamiento de estos extractos sin acción insulínica por incubación alcalina previa, por el ácido tricloroacético al 1'5 %, como recomienda SUTHERLAND (16), precipita una parte de las proteínas, con lo que se pierde casi toda la actividad hiperglucemiante.

Queda así bien de manifiesto la presencia en *Gergo alalunga*, Gml., de un factor de muy probable naturaleza proteica, de acción hiperglucemiante que acompaña también a los extractos insulínicos y que ofrece un comportamiento muy semejante al del glucagón de los mamíferos.

La valoración de la riqueza en glucagón de los extractos de nódulos de *Gergo alalunga*, aunque es solamente aproximada, ha permitido calcularse como equivalente a 1'45 mg. de glucagón cristalizado Lilly por gramo de nódulo endocrino.

Resumen

Se estudia la presencia de glucagón en los extractos insulínicos de nódulos pancreáticos endocrinos del albacora o bonito del Norte (*Gergo alalunga*, Gml.) por el efecto hiperglucemiante en conejos.

Se compara el efecto de los extractos con una muestra «standard» de glucagón amorfo Lilly. El contenido en glucagón de los extractos de nódulos pancreáticos del albacora es aproximadamente de unos 1,45 mgr. por gramo de nódulo pancreático endocrino.

Summary

GLUCAGON IN INSULIN EXTRACTS OF THE ALBACORA, *GERMO ALALUNGA*, Gml.

A study is made of the presence of glucagon in insulin extracts of endocrine pancreatic nodules of *Gergo alalunga*, Gml.

The endocrine pancreatic nodules have been collected in the port of Vigo (Spain). As a method of extraction we have employed the picric

acid technique of Dudley (4). The glucagon has been evaluated for its hyperglucemic action in rabbits fastings 24 hours, determining the blood sugar by the technique of Sols (11), every five minutes after the administration of the extract during the first fifteen minutes. The route of administration was the intravenous one.

The hyperglucemic effect of the extracts is compared with the effect of a specimen of amorphous glucagon Lilly, lot n.º 208-158B-197.

In the first place the initial hyperglucemic effect of the insulin extracts was observed. It was maximum during the first ten minutes, afterwards diminishing, to be followed by the hypoglucemic effect of the insulin.

The inactivation of the insulin extracts by alkaline incubation with KOH 0,08 N for two and a half hours at 37° C. (15, 16) determines the total disappearance of the hypoglucemic effect, while the initial hyperglucemia persists (Table II). Nevertheless, when alkaline incubation is performed at 100° C. for forty minutes (15) the hyperglucemic effect ceases as in these conditions the glucagon is equally hydrolysed. In the same way with the treatment with trichloroacetic acid (1,5 %) a diminution of said effect is provoked, because of partial precipitation of proteins (Table III).

The effect of glucagon in insulin extracts of the *Germo alalunga* is estimated by comparing it with a standard specimen. The extracts are administered intravenously without previous treatment, with the object of avoiding possible actions of the products of hydrolysis existing in the extracts.

The extract of amorphous glucagon Lilly, has an activity which corresponds to 50 % of glucagon crystallised from which we gather that in reality the richness in glucagon of the extracts of endocrine pancreatic nodules of *Germo alalunga*, corresponds to an approximate richness of 1.45 mg. of crystallised glucagon, for gram of endocrine nodule. Taking into account that each animal gives a pancreatic nodule of about 70 mg. weight (9), it corresponds approximately to about 100 γ per animal.

Bibliografía

- (1) AUDY, G. y KERLY, M. : *Biochem. J.*, **52**, 70, 1952.
- (2) AUDY, G. y KERLY, M. : *Biochem. J.*, **52**, 77, 1952.
- (3) CAVALLERO, C. : *Rend. scien. Farnitalia.*, **1**, 307, 1954.
- (4) DUDLEY, H. W. : *Biochem. J.*, **18**, 665, 1924.
- (5) FOÁ, P. P., SANTAMARÍA, L., WEINSTEIN, H. R. BERGER, S., y SMITH, J. A. : *Am. J. Physiol.*, **171**, 32, 1952.
- (6) KIMBALL, C. P. y MURLIN, J. R. : *J. Biol. Chem.*, **58**, 337, 1923.
- (7) MIALHE, P. : *Comp. Rend. acad. sc.*, **235**, 94, 1952.
- (8) PINCUS, I. J. : *J. Clin. End.*, **10**, 556, 1950.
- (9) PLANAS, J. : Pendiente de publicación.
- (10) RODRÍGUEZ CANDELA, J. L. : *J. Clin. End. and Met.*, **12**, 245, 1952.
- (11) SOLS, A. : *R. esp. Fisiol.*, **5**, 149, 1949.
- (12) STAHL, J. y DORNER, M. : *Comp. rend. Soc. Biol.*, **146**, 1.782, 1952.
- (13) STAUB, A. y BEHRENS, O. K. : *J. Clin. Invest.*, **33**, 1.629, 1954.
- (14) STEIGERWALD, H. : *Die Mediz.*, 1.497, 1954.
- (15) SUTHERLAND, E. W. y CORI, C. F. : *J. Biol. Chem.*, **172**, 737, 1948.
- (16) SUTHERLAND, E. W., CORI, C. F., HAYNES, R. y OLSEN, N. S. : *J. Biol. Chem.*, **180**, 825, 1949.