

Laboratorio de Fisiología General del C. S. I. C.
Facultad de Medicina de Valencia
(Prof. J. García-Blanco)

Regulación hormonal del glucógeno hepático en el ratón

por

A. M.^a Pascual-Leone*

(Recibido para publicar el 29 de junio de 1957)

Es bien conocido el papel central que juega el glucógeno hepático dentro del recambio glucídico del organismo. También es de conocimiento corriente que la formación y lisis del polisacárido hepático está regulada por juego apropiado de las hormonas pancreáticas, suprarrenales y tiroideas fundamentalmente. Pero la revisión bibliográfica del problema, con los medios a nuestro alcance, nos lleva a la conclusión que si bien el papel de cada hormona en el recambio glucídico está aclarado, se encuentran pocos estudios sobre el mencionado metabolismo cuando se utilizan hormonas agonistas y antagonistas. E igualmente se encuentra esta laguna extendiéndose incluso a las investigaciones de hormonas aisladas, si nos referimos a algunas especies animales muy poco utilizadas en el estudio, específicamente el ratón blanco suizo.

Limitamos nuestro estudio a corticoides (cortisona e hidrocortisona) y A.C.T.H. aislados primero, y finalmente en combinación con insulina haciendo un estudio previo de ésta en la misma dosis como base a las comparaciones. A pesar de las muchas experiencias realizadas con la hormona pancreática solamente hallamos en 1.956 investigaciones de KENNETH, SHULL y MAYER de insulina (9) sobre ratón, los cuales se ate-

* Becario del Patronato Santiago Ramón y Cajal.

nían sólo a la respuesta del azúcar de la sangre, y estudiaban la hipoglucemia según la obesidad del animal.

En cuanto a los corticoides, aunque su bioquímica continúa ocupando los esfuerzos (15) de gran número de investigadores, aproximadamente se han aislado 30 esteroides y existen todo un cúmulo de experiencias con respecto a sus acciones. Por ello es perfectamente sabido que se viene adjudicando a las cápsulas suprarrenales una acción hiperglucemiante por las líneas adrenalítica y glucocorticoide. En general (17) podemos decir que las hormonas corticales ejercen una acción estabilizadora del azúcar sanguíneo, atenúan la hipoglucemia insulínica y la hiperglucemia adrenalínica.

En trabajos recientes encontramos que se produce en ratas una diabetes transitoria por un tratamiento largo y continuado con cortisona (14). En cuanto a glucógeno (7) se concluye que ratas padeciendo diabetes esteroide inducida por cortisona tenían niveles altos en glucógeno. PORTER y SILVER (13) emplean el depósito de glucógeno de hígado como una medida de la proporción de absorción de cortisona e hidrocortisona y sus acetatos por vía intramuscular y subcutánea. Y nos dicen que la actividad de absorción y la vía más rápida en ellos era la intramuscular.

En un estudio comparativo de ABELOVE y PASHKIS (1) sobre la acción diabética de cortisona y hormona de crecimiento en diferentes especies hablan de perros, gatos, conejos y muchas otras y omiten en absoluto al ratón blanco. Sólo tres años después de comenzadas nuestras investigaciones (1956) KENNETH, SHULL y MAYER (8) han venido a corroborar nuestra observación de la escasez de conocimiento sobre las reacciones del ratón a estas hormonas con la publicación de un estudio sobre la respuesta de azúcar de la sangre de ratón obeso y normal a la hormona de crecimiento, cortisona y A.C.T.H. Y nos dicen que la «información de estas hormonas sobre dicho animal es escasa». Ellos no partían de animales en ayunas y, con respecto a la cortisona parecieron no observar aumento ni disminución en el azúcar sanguíneo.

De la hormona adrenocorticotropa natural es sobradamente sabido que segregada por la hipófisis anterior actúa sobre la corteza de las glándulas suprarrenales estimulándolas fisiológicamente. A pesar de que ENGEL (2), en 1953, estableció: «el problema de la naturaleza química exacta del A.C.T.H. todavía está sin resolver» y, aunque ello sigue siendo verdad todavía, según hemos podido comprobar, encontramos muchas experiencias que nos dicen que en términos generales las acciones nocivas y beneficiosas del A.C.T.H y de los glucocorti-

coides son iguales (16). HOUSSAY y ANDERSON (5) estudian las acciones diabéticas de las hormonas de la hipófisis anterior. Por otra parte, se sabe que la corticotrofina purificada eleva de una manera activa el contenido de glucógeno del hígado, por ejemplo, en la rata (20). Respecto al ratón, encontramos tan sólo en (1956) el citado trabajo de KENNETH, SHULL y MAYER, en el cual, con respecto a la corticotrofina, afirman que ya en 1938 se halló que el extracto de la hipófisis anterior, el cual era diabético en perros y gatos, se encontraba sin efecto en el azúcar de la sangre del ratón. Estos autores hallaron que la inyección intraperitoneal de A.C.T.H. a ratones que no estaban en ayunas, tanto obesos como normales, no les produjo alteración del azúcar sanguíneo. Ello indujo a estos investigadores a lanzar la sugerencia de que quizá la cortisona no es una secreción normal de las suprarrenales del ratón. Todo ello se presenta sumamente sugestivo, tanto más cuanto GOLDBERG y MAYER (1952) han revelado que la hipófisis y suprarrenales del ratón tenían histologías normales. Si bien la hiper o hiposecreción de glándulas endocrinas no va siempre acompañada por patología demostrable.

Puestos en este punto de vista del problema, emprendemos nuestro trabajo sobre ratones blancos, cuyo metabolismo es muy rápido, como hemos visto, tanto, que en veinticuatro horas de ayuno moviliza extraordinariamente sus reservas y las consume, quedando en una situación de gran hipoglucemia. Sobre este animal, y en condiciones de carencia alimenticia, *stress* en cierto modo, nos proponemos investigar. No utilizaremos dosis pequeñas y sucesivas, sino grandes proporciones de fármaco y de una sola vez, por la vía intraperitoneal, de absorción muy rápida, con lo cual conseguiremos efectos para el animal de verdaderas descargas hormonales, como producidas por cualquier estímulo, al que responderán, sin duda, aun en el caso de administraciones de hormonas aisladas, todas las múltiples secreciones endocrinas adecuadas al caso.

Interesados en los conocimientos y trabajos realizados sobre la influencia de dichas hormonas en la sensibilidad insulínica en animales, pudimos encontrar muy pocas publicaciones con respecto al A.C.T.H. e insulina, así como referentes a ella y corticoides; en ratones, ninguna. Ya que, aparte las investigaciones halladas sobre animales suprarrenoprivos e hipofisectoprivos o bien en pacientes con coma insulínico, tan sólo encontramos, en 1954, que PINCUS y EJMEDJIAN (12) afirman que las ratas hipofisectomizadas tienen mayor sensibilidad a la insulina que las adrenalectomizadas; ello se interpreta como signo de la existencia de un factor distinto de A.C.T.H. y también hipofisario que concierne a la sensibilidad de la insulina.

Y, muy recientemente (1956) (19), finalizando nuestras investigaciones, SPIRTOS y NAHMI vienen a confirmar con su trabajo nuestras sospechas de lo poco realizado al respecto. Exponen que las hormonas más destacadas por su acción antiinsulínica parecen ser los glucocorticoides adrenales y somatotrofina. Observaciones de WESTERMAYER y RABEN sugieren que el factor de la hipófisis que antagoniza la insulina sin la mediación de glucocorticoides, tal vez sea una pequeña molécula muy potente que está presente en el A.C.T.H. y también en las preparaciones de somatotrofina. Nos dicen en su trabajo, los citados investigadores, que la mayor parte de estudios sistemáticos de los factores endocrinos a la sensibilidad insulínica, se han efectuado sobre perros, y expresan que los estudios sobre ratas aún no han sido publicados. Ellos experimentan en ratas machos Spragne-Dowler. Se concluye que en las condiciones del experimento la somatotrofina y cortisona no inducen insulín resistencia. Por otra parte, ni la somatotrofina ni la cortisona ejercían mejoría significativa en niveles de azúcar de la sangre en ayunas.

Así fuimos estimulados por las pocas investigaciones realizadas en cuanto a combinaciones hormonales; por otra parte, creemos que para obtener un cuadro claro de dichos procesos metabólicos, en el animal intacto, no será suficiente el conocimiento de las acciones individuales de cada una de las hormonas que intervienen en él, sino que se necesitará el estudio de los efectos de sus acciones fisiológicas conjuntas para diversas proporciones de ellas, lo cual será el único modo de llegar a apreciar el proceso en circunstancias de *stress* o próximas a ellas, como es el ayuno, la fatiga, el frío, etc. Situaciones en las cuales actúan en el organismo, como fácilmente se comprende, toda gama de compensaciones y excitaciones hormonales.

Con ello intentamos, con los medios a nuestro alcance, aportar nuevos datos útiles al esclarecimiento de los factores que rigen, en situaciones anormales, las variaciones del metabolismo glucídico.

Material y métodos

En nuestras experiencias hemos utilizado siempre al ratón blanco suizo, de un peso medio de 20 g., adultos, de ambos sexos.

Siempre la inyección de dosis hormonal se hizo por vía intraperitoneal, en animales sometidos a ayuno absoluto durante veinticuatro horas, en condiciones de temperatura fija alrededor

de 30° C. La sangre para las glucemias se obtuvo por decapitación del ratón.

Entre los métodos utilizados en nuestro trabajo hemos de considerar dos partes, según los fines a realizar en el análisis. Primero, uno que atiende a la preparación del hígado hasta la precipitación de su glucógeno ; así como la hidrólisis de éste y su transformación en glucosa. Segundo, la determinación de la glucosa por método químico basado en su oxidación alcalina. En esta segunda parte hemos empleado el HAGEDORN-JENSEN (4). Y en la primera parte se ha seguido el procedimiento GOOD-KRAMER-SOMOGYI (3) en la precipitación del glucógeno hasta su hidrólisis a glucosa.

MÉTODO UTILIZADO PARA LA OBTENCIÓN DE LA GLUCEMIA VERDADERA. — Con el fin de apreciar en casos de glucemia total baja la cantidad de glucosa verdaderamente circulante en la sangre del ratón, hemos realizado determinaciones del nivel de esta glucemia real existente en la sangre. Para ello seguimos el método SOMOGYI (17), el cual está basado en las propiedades de la levadura del pan, que es capaz de fermentar en pocos minutos la glucosa presente en una solución diluída y dejar, por lo tanto, en ella los cuerpos reductores no fermentables.

Para ello se comienza por mezclar 0,2 c.c. de sangre con 2,8 c.c. de agua destilada y se añaden 1 c.c. de una solución de levadura al 25 % ; se deja actuar dos minutos, pasados los cuales se desproteinizan y se verifica una determinación Hagedorn corriente.

Se dispone un testigo de levadura solo, para considerar su poder reductor, y se efectúa una determinación con la sangre para ver la glucemia total, glucosa más cuerpos reductores no fermentables. Con estos dos testigos se verifican los cálculos.

Resultados

Siguiendo las técnicas anteriores, citaremos los resultados obtenidos siguientes :

GLUCEMIA NORMAL Y EN AYUNAS. — Comenzamos por una serie de determinaciones que nos orientaron con respecto al tanto por ciento de la glucemia en ratones normales, alimentados hasta una hora antes del análisis. Con ello nos cercioramos de que partíamos de animales en buenas condiciones, ya que el promedio fué de 159 mg. % (cuadro I).

Efectuado el anterior ensayo y antes de proseguir con la administración de hormonas en animales en ayunas, verifica-

mos una serie de determinaciones para orientarnos en los valores iniciales de glucógeno y glucemia de ratones en ayunas. En el cuadro II pueden verse los valores en porcentaje de glucógeno y glucemia. Como fácilmente se desprende, la media es de 660 mg. % en el glucógeno y 59 mg. % en glucemia.

GLUCEMIA VERDADERA. — El valor reductor no fermentable de la sangre del ratón en ayunas es de 35 mg. %, cifra media de seis casos efectuados como se ha indicado en los métodos.

Tratándose de un valor constante, para obtener el tanto por ciento de glucosa verdadera, no habrá que restar más que del valor reductor total obtenido por Hagedorn la cifra antes indicada. Por tanto, la determinación de ayunas de 59 mg. % nos dará, restándoles 35 mg. %, 24 mg. de azúcar verdadero.

CUADRO I
Glucemia de ratones normales

Ratones	mg. glucosa 100 cc. de sangre
1	134
2	154
3	167
4	154
5	157
6	196
7	145

CUADRO II
Glucógeno hepático y glucemias de ratones en ayunas de 24 horas

Ratones	mg. glucógeno 100 gm. de hígado	mg. glucosa 100 cc. de sangre
8	1.100	—
9	570	—
10	1.050	—
11	620	60
12	660	130
13	430	60
14	400	58
15	600	82
16	1.070	30
17	460	78
18	430	76

Insulina*

Procedimos a una serie de experiencias con dosis de 1 U.I.,

* Se utilizó en todas las experiencias insulina Novo.

estableciendo como tiempo máximo a la determinación del glucógeno y de la glucemia dos horas a partir de la inyección, naturalmente, vigilando el estado del ratón para ver si resistía estas dos horas vivo, y, en caso de coma fuerte o de signos de un precoma, se procedió a la determinación antes de que muriera.

La vía empleada fué igualmente la intraperitoneal, como para todas las administraciones de hormonas. En el cuadro III podemos ver las variaciones por administración de 1 U.I. Las medias de las determinaciones fueron 1.160 mg. por 100 gramos de hígado, en el glucógeno, y 50 mg. % en la glucemia.

Hormonas corticosuprarrenales

Las hormonas utilizadas fueron cortisona e hidrocortisona (*). Las investigaciones realizadas comprenden: Primero, estudio con la cortisona a dos y a cuatro horas; segundo, hidrocortisona con estos mismos intervalos. La vía utilizada fué siempre intraperitoneal y los ratones se usaron después de un ayuno de veinticuatro horas.

CORTISONA. — En las experiencias a dos horas se empleó una dosis de 10 mg. La media de los resultados fué 840 mg. por cien gramos de hígado para el glucógeno y 75 mg % para la glucemia (cuadro IV). En las experiencias a cuatro horas la dosis fué de 15 mg., aumento efectuado con el fin de observar el cambio en las determinaciones por acción de la concentración de hormona.

CUADRO III

Acción de la insulina (1 U. I.) sobre el glucógeno hepático y la glucemia del ratón. Vía intraperitoneal

Ratones	mg. glucógeno 100 gm. de hígado	mg. glucosa 100 cc. de sangre
19	810	34
20	270	52
21	3.700	102
22	1.040	34
23	420	54
24	310	54
25	3.800	52
26	640	55
27	190	27
28	480	42

(*) Se emplearon en los ensayos Altisona (acetato de cortisona) de la casa Alter e Hidrocortisona - F - de los Laboratorios E. F. E. M. N. amablemente suministrada.

La media de glucógeno fué de 580 mg. y la glucemia de 82 mg. % (cuadro V). En la gráfica I correspondiente se ve claramente a igual escala las diferencias en el comportamiento a dos horas y a cuatro horas; el glucógeno se representa por rectángulo blanco, y en la glucemia, rectángulo rayado siempre. No se debe olvidar que la dosis de cortisona a cuatro horas es de 15 mg.

CUADRO IV

Acción de la cortisona (10 mg.) por vía intraperitoneal, sobre el glucógeno hepático y la glucemia del ratón

Ratones	mg. glucógeno 100 gm. de hígado	mg. glucosa 100 cc. de sangre
29	1.500	142
30	250	52
31	500	74
32	3.400	120
33	800	—
34	10	32
35	—	64
36	1.240	69
37	1.280	80
38	590	84
39	100	—
40	1.100	78
41	250	36

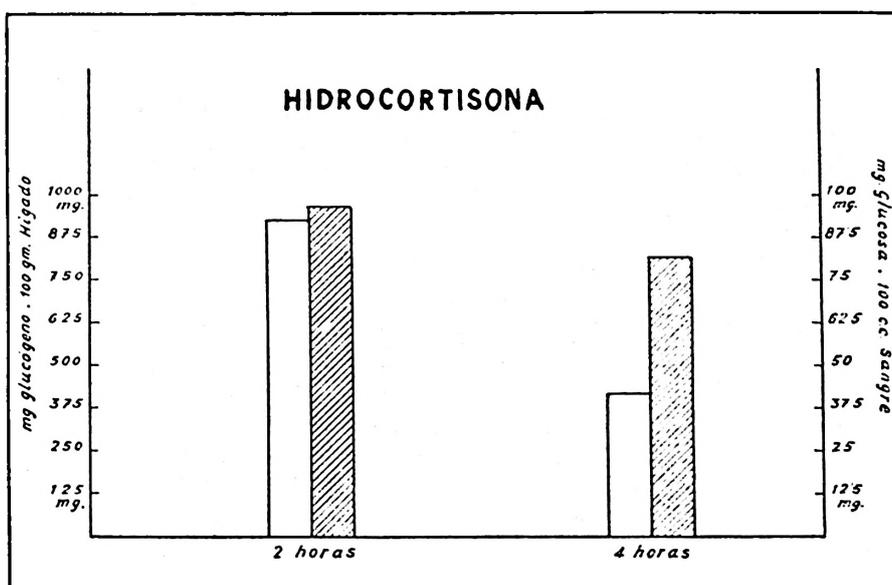
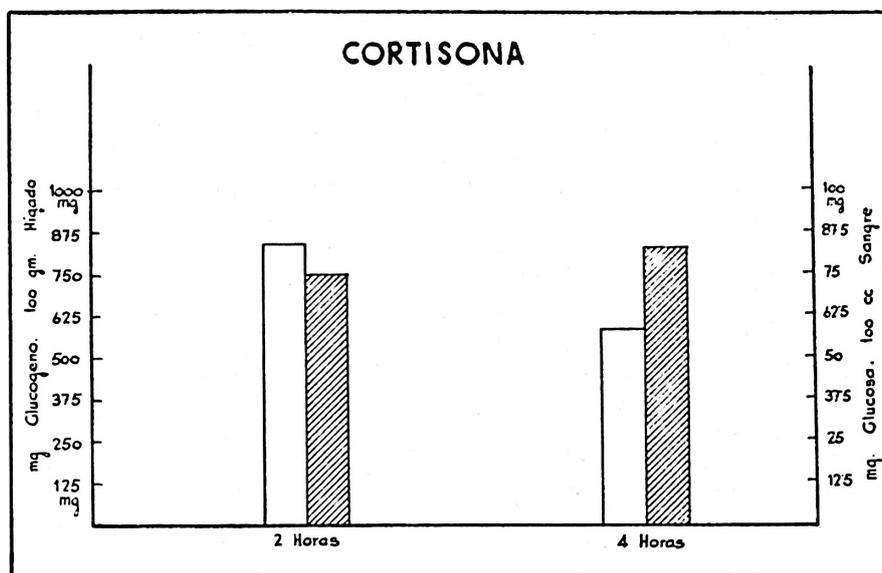
CUADRO V

Acción de la cortisona (15 mg.) por vía intraperitoneal, sobre el glucógeno hepático y la glucemia del ratón

Ratones	mg. glucógeno 100 gm. de hígado	mg. glucosa 100 cc. de sangre
42	730	104
43	270	65
44	520	—
45	310	53
46	610	91
47	1.070	71

HIDROCORTISONA. — Las dosis empleadas fueron de 10 mg. en los dos intervalos de tiempo. El promedio en las determinaciones a dos horas fué de 930 mg. por cien gramos de hígado para el glucógeno y de 97 mg. % para la glucemia. Para las determinaciones a cuatro horas se obtuvo 420 mg. por cien gramos en el glucógeno y de 82 mg. % en la glucemia (cuadros VI y VII).

Estas variaciones se aprecian muy bien en la gráfica I, a igual escala.



GRAFICA I

Hormona corticotropa

Las determinaciones se efectuaron a dosis (1) de 5 U.I., siendo perfectamente toleradas por los animales (*). Los ratones

(*) Se utilizó en los ensayos Adrecortán, suministrado por cortesía de la casa Alter.

fueron machos y hembras adultos que habían permanecido en ayunas durante veinticuatro horas. Primero las experiencias las verificamos con un intervalo de dos horas entre inyección y análisis. Y, con el fin de concretar el estudio, efectuamos nuestras determinaciones esperando un intervalo de cuatro horas. En el cuadro correspondiente (VIII) se puede comprobar que en las dos horas la media de las determinaciones de glucógeno hepático es de 710 mg. por cien gramos de hígado, y para la glucemia de 56 mg. por cien. En las determinaciones de cuatro horas, la media en tanto por cien de glucógeno hepático nos dió 620 mg. y la glucemia 65 mg. (cuadro IX). En la gráfica II, a igual escala, se puede apreciar la poca diferencia en cuanto a glucógeno y glucemia para las determinaciones a dos y cuatro horas.

Combinaciones hormonales

Efectuado el estudio con hormonas aisladas, se comenzó la observación de la influencia de estos corticoides y el A.C.T.H. en la acción insulínica, investigación que, como se ha expuesto, nos pareció muy interesante.

Para ello se emplearon las mismas marcas de hormonas. Se dispuso en cada experimento de dos ratones en ayunas durante veinticuatro horas. A uno de ellos se le inyectó intraperitonealmente una dosis siempre de U.I. de insulina y, al otro, insulina más una dosis determinada de la hormona en estudio por la misma vía; se esperó siempre un máximo de dos horas, dependiendo en cada determinación del estado de los ratones, ya que procedíamos al análisis antes de su muerte por efecto del fármaco.

CUADRO VI

Acción de la hidrocortisona (10 mg.) administrada por vía intraperitoneal, sobre el glucógeno hepático y la glucemia del ratón

Ratones	mg. glucógeno 100 gm. de hígado	mg. glucosa 100 cc. de sangre
48	—	26
49	820	28
50	400	72
51	790	86
52	570	—
53	730	104
54	190	122
55	900	128
56	790	126
57	1.150	66
58	1.900	94
59	1.200	142

CUADRO VII

Acción de la hidrocortisona (10 mg.) sobre el glucógeno hepático y la glucemia del ratón

Ratones	mg. glucógeno 100 gm. de hígado	mg. glucosa 100 cc. de sangre
60	340	94
61	300	71
62	600	54
63	690	80
64	100	78
65	500	116

CUADRO VIII

Efecto del A.C.T.H. (50 U. I.) sobre el glucógeno hepático y la glucemia del ratón

Ratones	mg. glucógeno 100 gm. de hígado	mg. glucosa 100 cc. de sangre
66	360	64
67	300	42
68	120	38
69	200	77
70	550	50
71	450	45
72	780	76
73	2.980	76
74	—	39

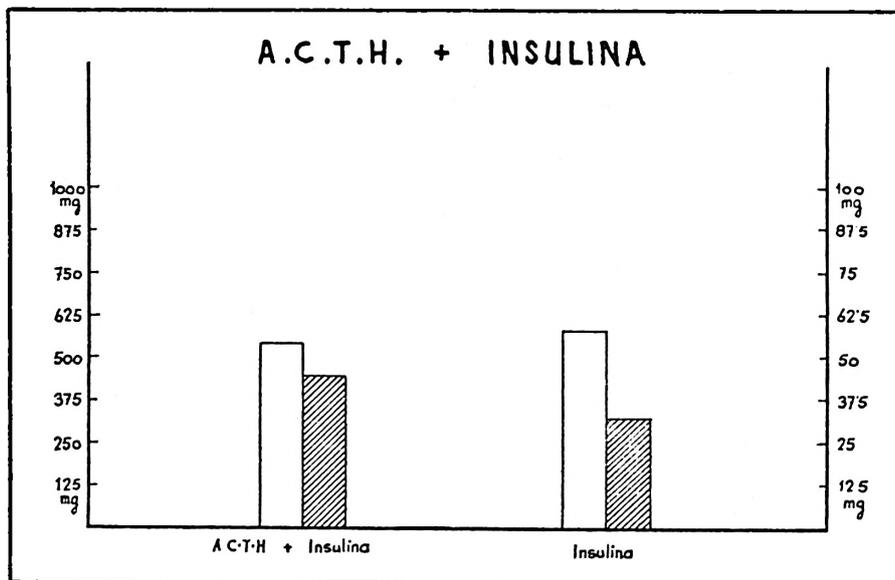
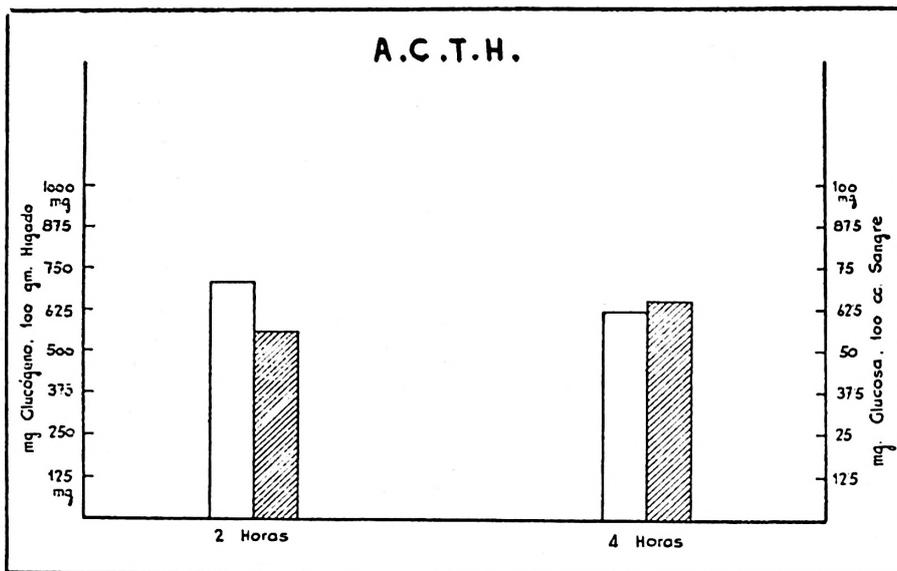
CUADRO IX

Acción del A.C.T.H. (5 U. I.) sobre el glucógeno hepático y la glucemia del ratón

Ratones	mg. glucógeno 100 gm. de hígado	mg. glucosa 100 cc. de sangre
75	650	60
76	760	66
77	—	56
78	370	58
79	840	56
80	—	72
81	870	75
82	260	49
83	—	102
84	—	64

CORTISONA MÁS INSULINA. — La dosis utilizada de cortisona fué de 10 mg. La media de las determinaciones de la combinación es de 610 mg. % para el glucógeno y de 57 mg. % para la glucemia. En las experiencias con 1 U.I. de insulina halla-

mos 690 mg. por cien gramos de hígado en glucógeno y 53 mg. por cien para la glucemia. (Cuadro X. Gráfica III.)



GRAFICA II

CUADRO X

Efecto de la cortisona (10 mg.) más insulina (1 U. I.) sobre el glucógeno hepático y la glucemia del ratón

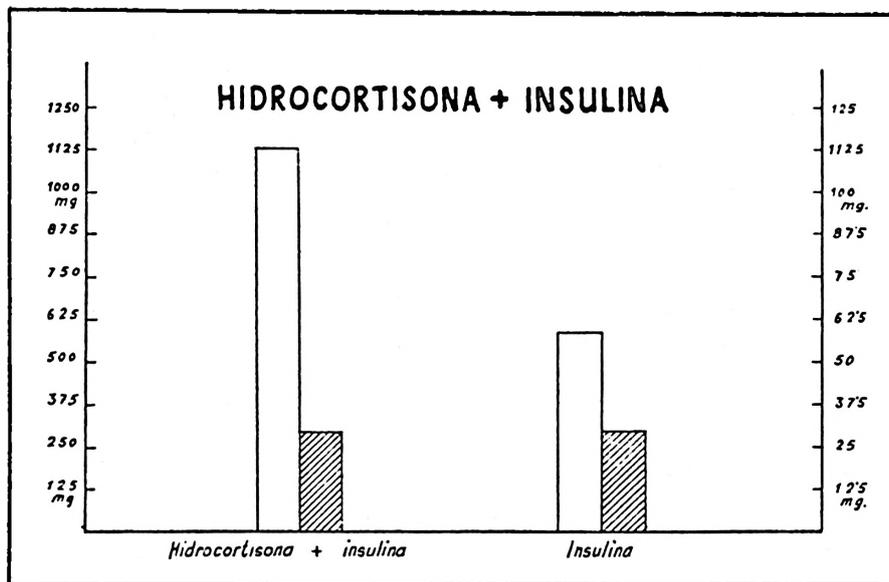
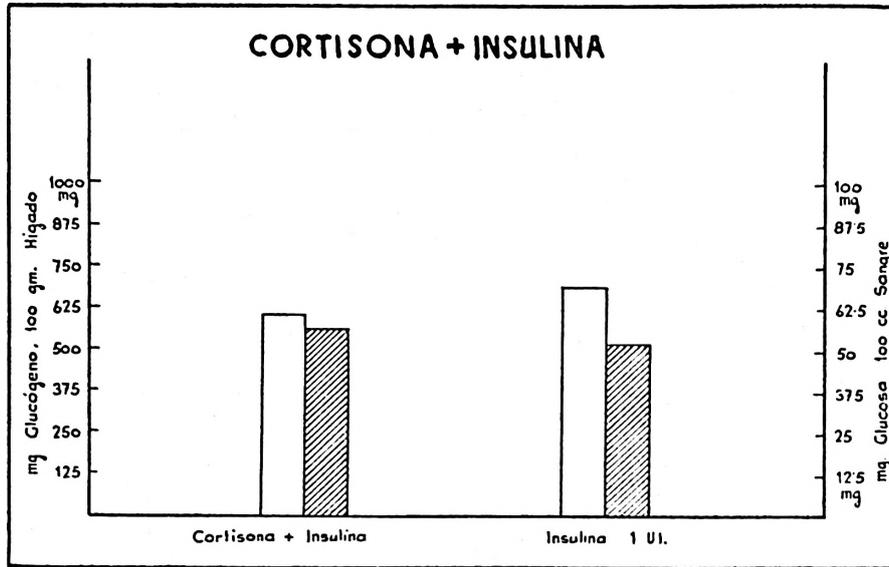
Ratones	mg. glucógeno 100 gm. de hígado	mg. glucosa 100 cc. de sangre
85	300	50
86*	410	48
87	1.900	58
88*		41
89	1.480	26
90	300	38
91*	530	48
92	590	54
93*	510	39
94	300	34
95*	490	45
96	350	92
97*	—	86
98	790	98
99*	840	62
100	640	53
101*	200	42
102	750	67
103*	620	70

CUADRO XI

Acción de la hidrocortisona (6,6 mg.) más insulina (1 U. I.) sobre el glucógeno hepático y la glucemia del ratón

Ratones	Tiempo	mg. glucógeno 100 gm. de hígado	mg. glucosa 100 cc. de sangre
104		3.020	23
105*	½ h.	1.990	46
106		540	44
107*	1 h.	1.400	49
108		780	32
109*	2 h.	670	54
110		1.280	22
111*	1 h.	300	15
112		860	30
113*	1½ h.	1.100	39
114		110	25
115*	1 h.	600	20
116		740	22
117*	1 h.	900	58
118		1.500	62
119*		—	66
120		1.170	26
121*	1½ h.	170	14

* Únicamente con administración 1 U. I. de insulina.



GRAFICA III

CUADRO XII

Efecto del A.C.T.H. (5 U. I.) junto con insulina (1 U. I.) sobre el glucógeno hepático y la glucemia del ratón

Ratones	Tiempo	mg. glucógeno 100 gm. de hígado	mg. glucosa 100 cc. de sangre
122		690	31
123*	2 h.	680	44
124		580	46
125*	2 h.	440	46
126		740	40
127*	2 h.	960	32
128		950	36
129*	1½ h.	970	19
130		570	66
131*	2 h.	470	40
132		340	46
133*	1 h.	77	41
134		140	31
135*	2 h.	—	10
136		360	56
137*	1 h.	490	28

HIDROCORTISONA MÁS INSULINA. — Se efectuaron como se ha expuesto y la dosis administrada de hidrocortisona fué de 6,6 mg. Los valores obtenidos se hallan en el cuadro XI. La media para la mezcla es de 1.130 mg. % en el glucógeno y de 29 mg. % en la glucemia. Para las determinaciones de 1 U.I., 580 mg. por cien gramos de hígado en glucógeno y de 29 mg. por cien en el azúcar de la sangre. En la gráfica III correspondiente observamos las variaciones de los promedios indicados para la mezcla y la insulina.

CORTICOTROFINA MÁS INSULINA. — En estas experiencias la dosis utilizada de hormona corticotropa fué de 5 U.I. Los resultados están consignados en el cuadro XII. La media de ellos para las determinaciones de la mezcla es de 540 mg. % en el glucógeno, y de 44 mg. % en la glucemia. Las determinaciones de 1 U.I. poseen una media de 580 mg. por cien gramos de hígado en el glucógeno y de 32 mg. % en el azúcar de la sangre. Encontramos las medias indicadas situadas en la gráfica II, y las variaciones se aprecian en su pequeñez en este caso.

Discusión

INSULINA. — En la gráfica comparativa, a dos horas, situada al final de los resultados (gráfica IV), se puede apreciar el comportamiento de la insulina con 1 U.I. con respecto al pro-

medio de ayunas y en relación al efecto de corticoides y A.C.-T.H. En todo ello el tiempo fué de dos horas entre inyección y análisis.

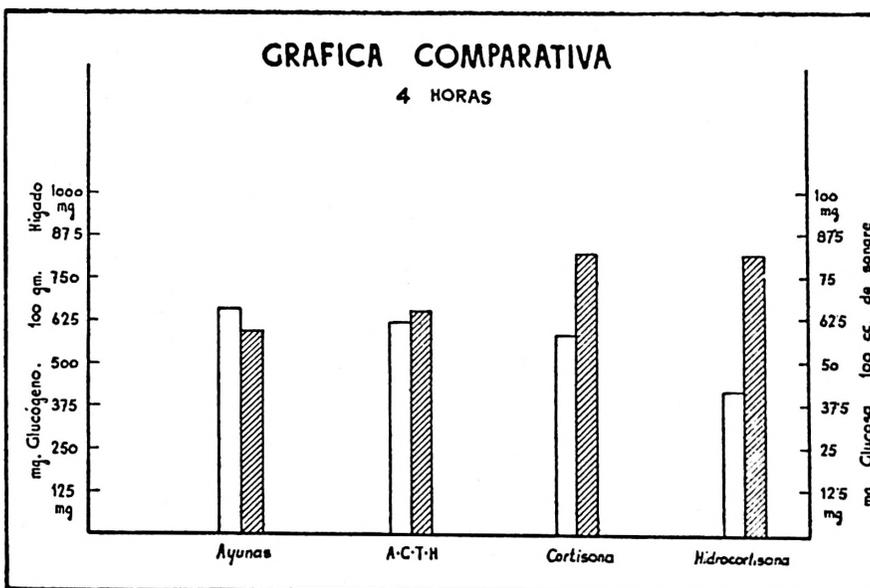
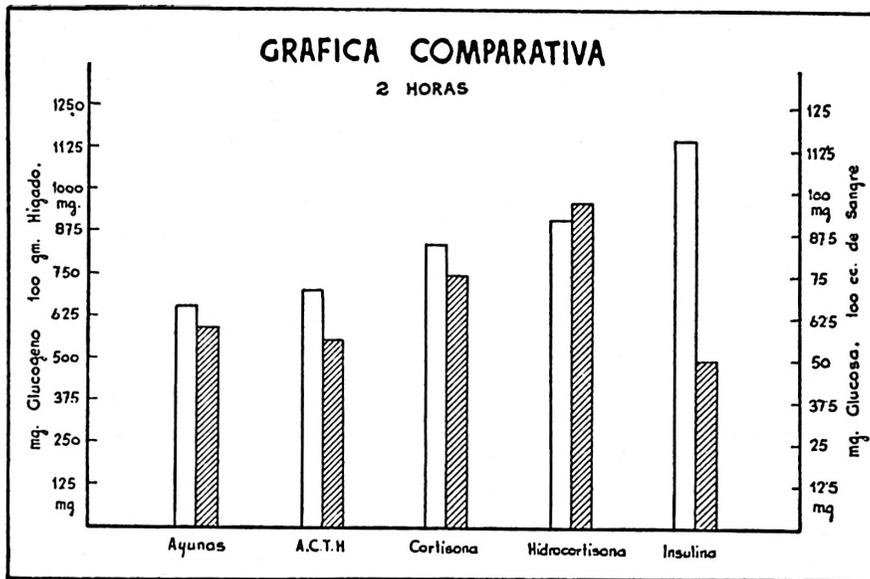
La insulina se comporta, en relación a las demás, como podría esperarse: baja la glucemia más que ellas y eleva el glucógeno. De ello deducimos que para estas dosis y condiciones el ratón aumenta más su glucógeno por efecto de la inhibición insulínica de glucogenolisis que por la neoglucoformación provocada por los corticoides.

HORMONAS CORTICOSUPRARRENALES. — Primero nos referimos a las gráficas comparativas (gráfica IV) en la de dos horas se observa claramente que cortisona e hidrocortisona actúan con respecto a la dosis en ayunas elevando el glucógeno y la glucemia, y que para la misma dosis empleada la acción de la hidrocortisona es mayor que la de la cortisona. En la de cuatro horas vemos resumido y de un modo evidente que las dos hormonas parecen aumentar la glucemia y disminuir el glucógeno en este tiempo en relación a las determinaciones a dos horas. La glucemia en igual proporción para las dos, cortisona e hidrocortisona, y el glucógeno desciende algo más para la última. Con relación a la media en ayunas, desciende el glucógeno, mientras la glucemia continúa más elevada, pero inferior a las de dos horas. No se puede olvidar que la cortisona tiene aquí dosis de 15 mg. y la hidrocortisona de 10 mg., y, como consideramos la última con mayor acción, el efecto, en este caso, debe igualarse.

Hemos observado en nuestras experiencias, como ya se ha expuesto, que la cortisona y la hidrocortisona elevan el nivel de la glucemia y el nivel de glucógeno del hígado. Los ratones parecen experimentar reacción ante estos agentes diabéticos, tal como se preveía después de revisada la bibliografía y tener pruebas del comportamiento de otras especies.

Del mismo modo cabía esperar que la hidrocortisona se mostrara más activa; sin embargo, PERRINI (11) y otros nos dicen que la cortisona es más degradada por el hígado de ratas sujetas a *stress* que por las ratas normales, y, por consiguiente, la respuesta metabólica en el hígado a esta hormona tiene proporcionalmente una intensidad menor para las ratas sometidas a un estímulo maligno. Según esto, si consideramos que nuestros ratones están en una situación de *stress*, que podría ser el ayuno; entonces encontramos una explicación a la menor actividad de la cortisona con respecto a la hidrocortisona. Pero al tratarse de ratón, y no de rata, nada concluimos.

Por otra parte, observamos que en un intervalo de tiempo mayor, cuatro horas, la glucemia continúa más elevada que en



GRAFICA IV

ayunas, pero el glucógeno ha disminuído por bajo de estos valores, en ambos casos, con cortisona e hidrocortisona.

Con ello nos encontramos ante el hecho de que, al parecer, los efectos de los corticoides en la glucogénesis han dejado de existir, y como permanece en ayuno el animal gasta rápidamente las reservas primeramente creadas. También esto podría explicar esta elevación de glucosa en sangre, que puede ser momentánea en este intervalo.

Hay que señalar también el hecho de que KENNETH, en ratones normales, sin estar en ayunas, no encontró efecto a la cortisona, ni aumentando ni decreciendo su azúcar sanguíneo. Indudablemente nuestras condiciones eran muy distintas, y no podemos concluir nada con respecto a los complicados mecanismos endocrinos que pueden intervenir en este estado de *stress*, adrenalina, células alfa del páncreas, etc., mientras no amplíemos el campo en sucesivas y futuras investigaciones.

Además, como se expondrá detalladamente, en el A.C.T.H. existe una duda sugerida por KENNETH en relación a si la cortisona es o no una secreción normal de las suprarrenales del ratón, que nos abre un campo nuevo e interesante de investigación, tanto más, ante este animal, del que reiteradamente hemos comprobado existe una gran laguna en su estudio hipofisario-adrenal.

HORMONA CORTICOTROPA. — En las gráficas comparativas (gráfica IV) tenemos que señalar en ambas la poca discordancia existente entre las determinaciones de A.C.T.H. a dos horas y a cuatro horas con respecto de las experiencias en ayunas.

Nos pareció interesante en nuestro trabajo efectuar determinaciones, esperando tan sólo un intervalo de dos horas para el análisis. En bibliografía hallamos investigaciones, de las cuales se deducía haberse absorbido ya la hormona a dicho tiempo. Experiencias nos dicen que dentro de las tres horas después de la inyección de A.C.T.H. el colesterol contenido en la cápsula suprarrenal desciende al 50 % de su valor inicial (10). Unido a estas consideraciones está el hecho de la gran dosis administrada, la cual debía afectar al animal en menor tiempo. Además de haber empleado la vía intraperitoneal de absorción muy rápida.

En nuestro estudio habíamos tenido conocimiento de una cantidad de investigaciones por las cuales se comprueba la acción hiperglucemiante producida por el A.C.T.H. en variedad de especies animales, entre las que no se cita al ratón. Nosotros hemos tenido que deducir de nuestros datos la anormalidad de comportamiento de este animal a la hormona corticotropa.

Después esperamos un intervalo de cuatro horas con la misma dosis para asegurar los resultados, y tuvimos que deducir lo mismo. El ratón no respondía al estímulo suprarrenal que debía provocarle el A.C.T.H.

Recientemente KENNETH, SHULL y MAYER, en su trabajo ya citado, vinieron a corroborar nuestras investigaciones. Ellos no actuaban sobre ratones en ayunas, empleaban menor dosis de A.C.T.H. (2,6 U.I.) y, basando sus deducciones sólo en glucemia, lanzaron la sugerencia de que tal vez la cortisona no fuera una secreción normal de las suprarrenales del ratón y por ello no tenía lugar la estimulación del A.C.T.H. en la corteza suprarrenal para la producción de sus corticoides.

A nosotros nos llama igualmente la atención este hecho, además de que empleamos dosis mayor y que tenemos el dato del glucógeno hepático, que tampoco aumenta. Los animales, en nuestro caso, estaban en ayunas de veinticuatro horas y parece que la hiperglucemia y glucosuria por A.C.T.H. (6) se favorece con una dieta rica en hidratos de carbono. Sin embargo, no creemos que ello pueda explicar en absoluto la falta de reacción; además, están las investigaciones de KENNETH sobre ratones obesos, para lo cual la anterior exposición parecía indicar un posible mayor incremento de la glucemia, y sin embargo no se efectúa.

Razonando así, nos parece sugestiva la deducción de KENNETH; tanto más cuanto los corticoides (cortisona e hidrocortisona) en nuestras experiencias sí que produjeron aumentos y alteraciones en glucógeno y glucemia, con respecto a los valores iniciales de ayuno. Además, nosotros tenemos la evidencia de la enorme baja de la glucemia en el ratón para veinticuatro horas de ayuno. En el cuadro I se puede ver la media de azúcar de la sangre en ayunas, es de 59 mg. por 100 c.c. y en el cuadro II vemos que la media en los ratones empleados en situación normal es de 159 mg. por 100 c.c. Pues bien, así el descenso de su azúcar para 24 horas de ayuno es, aproximadamente, de una tercera parte. Al comienzo de las investigaciones nos pareció tan sólo un dato de la rapidez de su metabolismo, hoy, después de nuestras investigaciones sobre A.C.T.H., vemos una prueba nueva de su no reaccionabilidad al *stress* (ayuno) movilizándolo corticoides hiperglucemiantes.

Con todo, no podemos llegar a nada definitivo; pero sí que nos parece digno de tenerse en cuenta esta aparente anomalía reaccional del ratón en sus cápsulas suprarrenales, con histología normal, para nuevas investigaciones:

COMBINACIONES HORMONALES. — En las combinaciones de cortisona más insulina apreciamos que la influencia de la cor-

tisona no es grande en la sensibilidad insulínica, lo cual está de acuerdo con el citado trabajo de SPIRTOS y NAHMI en el cual encontraron que la cortisona no causaba antagonismo ni insulín resistencia, si bien ellos operaron sobre ratas. Nosotros observamos que aunque las dos hormonas actúan en el mismo sentido, aumentándolo, en las medias glucémicas en las que debería haber una gran diferencia, con pérdida para los insulinizados, solamente hallamos un descenso claramente despreciable; por ello, no podemos deducir ninguna insulín resistencia.

Por otra parte, los ratones tratados con las dos hormonas mostraron en la experiencia signos manifiestos de hipersecreción adrenalínica, que nos obligaron a matarlos antes de dos horas y que también serían causantes en este caso, de no dejar elevar el glucógeno hepático como corresponde a la suma de las acciones corticoides más insulina.

En la combinación hidrocortisona más insulina, nos parece asimismo que tampoco existe compensación alguna por parte del glucocorticoide a la acción insulínica, ya que no interviene en nada para contrarrestar su hipoglucemia. En este caso los animales resistieron bien la mezcla, sin los síntomas aparecidos en la combinación de cortisona más insulina, teniendo primero el coma en la mayoría de experiencias los ratones inyectados con insulina. Ello podría interpretarse, sugerimos, como que la descarga adrenalínica que se producía en la cortisona no se verifica aquí, o bien no se produce con la misma intensidad, y por ello, también la elevación del glucógeno en los animales con la mezcla sea aquí tan considerable.

De las experiencias con corticotrofina más insulina hemos de concluir la no acción compensadora del A.C.T.H. a la insulina por camino de estímulo glucocorticoide. En cuanto al glucógeno, parece claro, ya que el porcentaje insulínico es mayor, y nos dice que la hormona corticotropa no ha movilizad glucocorticoides que aumentan su almacén glucogénico, prácticamente el glucógeno está igual en ambas determinaciones. Lo mismo ocurre con el azúcar de la sangre, ya que los 8 mg. de diferencia no nos parecen significativos.

Todo ello viene a ser una prueba más de la ausencia de acción adrenocortitropa del A.C.T.H. en el ratón, que nos vuelve a la idea citada de KENNETH de que quizá la cortisona no es una secreción normal de dicho animal.

Conclusiones

- I. Se estudia en el ratón blanco suizo la acción sobre el glucógeno hepático, y glucemia, de las hormonas cortisona, hidrocortisona y A.C.T.H. y las combinaciones

de ellas con insulina (insulina más cortisona, insulina más hidrocortisona e insulina más A.C.T.H.).

- II. En el ratón blanco, después de un ayuno de 24 horas, se encuentra una glucemia media de 59 mg. %, oscilante entre 130-30 mg. %, expresado en valor reductor total que, descontando el valor de los cuerpos reductores hemáticos no fermentables, arroja una cifra de glucemia verdadera de 24 mg. %. El glucógeno hepático en dichas condiciones es de 660 mg. por cien gramos de hígado.
- III. Se inyectaron a un lote de animales en ayunas dosis de insulina de 1 U.I. Se obtuvo en el glucógeno una media de 1.160 mg. %, lo que supone un aumento de 75 % con respecto al nivel en ayunas. En la glucemia la cifra media obtenida fué de 50 mg. %, lo que supone un descenso de 16 %.
- IV. Para los corticoides se utilizaron las dosis siguientes : en las experiencias a dos horas de intervalo entre administración y análisis se emplearon dosis de 10 mg. para la cortisona e hidrocortisona. El aumento para la primera sobre la dosis inicial de glucógeno fué de 27 %, y para la hidrocortisona de 40 %. En la glucemia el aumento es de 27 % sobre la glucemia en ayunas para la cortisona, y de 64 % para la hidrocortisona.

Se observa una mayor acción de esta última hormona para la misma dosis y una correlación muy marcada en los aumentos de glucemia y glucógeno de ambas sustancias corticales.

En las experiencias a cuatro horas de intervalo, se halló para la cortisona un descenso de 13 % en el glucógeno sobre el valor inicial ; la dosis utilizada fué, sin embargo, superior : 15 mg. Para la hidrocortisona con dosis de 10 mg., a las 4 horas, se obtuvo una baja de glucógeno de 37 %. En la glucemia la elevación sobre los valores de partida fué de 38 % para ambas hormonas. Se concluye la concordancia de las acciones, cortisona e hidrocortisona, comprobándose la mayor acción de ésta última, después de compensar en la experiencia la actividad relativa de ambos cuerpos con una mayor dosis de cortisona.

Se destaca la permanencia de la elevación glucémica en este mayor tiempo, en el que se obtiene, por el contrario, un descenso de la acción para el glucógeno.

- V. Se utilizó una dosis de corticotrofina de 5 U.I., tanto para las experiencias de dos horas de intervalo como

para las de cuatro horas. Se inyectaron sobre ratones sometidos a un ayuno de 24 horas. El incremento fué de 7 % con respecto al inicial de ayuno en el glucógeno para las experiencias de 2 horas ; para las de 4 no se apreció incremento.

En la glucemia a dos horas no se obtuvo aumento, y a 4 horas fué de 10 %, con respecto al inicial. Teniendo en cuenta el valor estadístico, se concluye que el A.C.T.H. en estas condiciones no parece ejercer acción significativa sobre la glucemia y el glucógeno del ratón suizo.

- VI. Se efectuaron experiencias con cortisona e insulina, inyectándose 10 mg. de la primera hormona, seguidos de 1 U.I. de insulina, a un lote de animales ; y 1 U.I. de esta última a otro, ambos en ayunas durante 24 horas. Se halló en las determinaciones de cortisona más insulina para el glucógeno ; una diferencia de 12 % de menos sobre las efectuadas con insulina sola. En la glucemia se encontró 7 % más para las determinaciones de la cortisona más insulina.

Se concluye que la cortisona no provoca un estado de insulínresistencia. Se presentaron en los ratones síntomas clínicos que se creen debidos a descarga de adrenalina.

- VII. Fueron realizadas experiencias con hidrocortisona más insulina. Se administraron a una serie de animales 6,6 mg. de hidrocortisona y luego una U.I. de insulina, a otra serie de 1 U.I. de insulina.

Se apreció un 94 % de aumento en el glucógeno de la mezcla sobre las determinaciones con insulina sola.

En la glucemia no se halló diferencia entre ambas determinaciones ; su porcentaje fué en los dos casos, de 29 mg. %. Se concluye igualmente que carece de acción antiinsulínica la hidrocortisona. Y, por los signos presentados por los animales, se cree no se presenta descarga adrenalínica, lo cual explicaría la gran elevación del glucógeno.

- VIII. Se verificaron experiencias con 5 U.I. de A.C.T.H. más 1 U.I. de insulina para un grupo de animales, y 1 U.I. de la última en otro grupo. En el glucógeno se aprecia para las determinaciones de la combinación un descuento de 7 % sobre las efectuadas con la insulina. En la glucemia un aumento, para la mezcla, de 37 % sobre las determinaciones con la hormona sola.

Se deduce que la corticotrofina no ejerce acción compensadora para la insulina por vía glucocorticoide.

Resumen

Se efectuaron una serie de experiencias sobre el ratón blanco suizo en condiciones de carencia alimenticia para apreciar la acción de las hormonas corticosuprarrenales: cortisona e hidrocortisona y A.C.T.H., sobre la glucemia y el glucógeno hepático. También se realizaron determinaciones para ver la influencia de dichas hormonas en la acción insulínica; para ello se efectuó un estudio, como base a las comparaciones, con insulina sólo.

Pareció interesante el estudio con combinaciones de dichas hormonas, ya que además se encontró muy poca bibliografía al respecto, y por la misma razón se utilizó el animal anteriormente citado. En todas las experiencias, se determinaron glucógeno y glucemia de cada ratón en ayunas e inyectado.

Se comenzó por obtener la glucemia en situación normal de alimentación, y después se efectuó glucemia y glucógeno en ayunas; todas las experiencias posteriores se realizaron en dicha situación. En el estudio hormonal, primero se realizaron experiencias previas con insulina, inyectándose a un lote de animales 1 U. I. Se estudió después la acción cortico-suprarrenal en las determinaciones a dos horas de intervalo entre administración y análisis la dosis fué para ambos de 10 mg. Se observó una mayor acción de la hidrocortisona y una correlación muy marcada en los aumentos de glucemia y glucógeno de ambas sustancias corticales. Para las experiencias a cuatro horas, se utilizó una dosis de cortisona de 15 mg., y de hidrocortisona de 10 mg. Se destacó la permanencia de la elevación glucémica en este tiempo, en el que se obtiene, por el contrario, un descenso de la acción para el glucógeno.

Estudiamos luego la hormona corticotropa con dosis de 5 U. I. Siendo perfectamente tolerada por los animales. Se efectuaron experiencias con un intervalo de dos horas y cuatro entre inyección y análisis. Teniendo en cuenta el error estadístico, se dedujo que el A.C.T.H. en estas condiciones no parece ejercer acción significativa sobre el glucógeno y glucemia del ratón.

Una vez efectuados los estudios sobre las hormonas aisladas, se quiso observar la influencia de estos corticoides y el A.C.T.H. en la acción insulínica. En cada experiencia, se dispuso de dos ratones en ayunas de veinticuatro horas.

De las experiencias con cortisona e insulina, se concluyó que la cortisona no provoca un estado de insulín resistencia. Se presentaron en los ratones síntomas clínicos que se creen debidos a descarga de adrenalina. En las determinaciones con hidrocortisona e insulina, se concluyó, igualmente, que carece de acción antiinsulínica la hidrocortisona; por los signos presentados por los animales, se creyó no se presenta descarga adrenalínica, lo cual explicaría la gran elevación del glucógeno que se observa en los inyectados con la mezcla. Se sugiere, de acuerdo con recientes trabajos, la posibilidad de que la cortisona no sea una secreción normal de las suprarrenales del ratón. Para los animales tratados con corticotrofina e insulina, se dedujo que la corticotrofina no ejerce acción compensadora para la insulina por vía glucocorticoide.

Summary

Hormonal regulation of hepatic glycogen in the mouse

A series of experiments on the swiss white mouse were done in conditions of food lack to appreciate the action of

the corticosuprarenal hormones : cortisone, hidrocortisone, and ACTH, on glycaemia and hepatic glycogen. Determinations were also made on the influence of these hormones on insulin action, using effect of insulin alone as a base for comparison.

A study of the effect of combinations of above-mentioned hormones appeared to be of interest as it seems the best way of appreciating the processes developed in the organisms under stress or nearly stress circumstances — fasting, fatigue, atmospheric cold — situations in which all the gamit of hormonal compensations and excitations are brought into play. We were also stimulated by the paucity of investigations done on agonist and antagonist hormones.

The mouse was used because of the scarcity of bibliography in these subjects using this animal.

As to the methods used, the determinations of glycogen were done with the GOOD-KRAMER-SOMOGYI (3) firstly liver liquation by 30 % KOH, and later precipitation with alcohol. Afterwards hidrolisis in normal sulphuric for two hours was done to break down to glucose, for estimation of which the HAGEDORNS-JENSEN (15) was used.

For obtention of true blood glucose with elimination of nonglucidic reducing substances the SOMOGYI (18) was used. This is based on the properties of bread yeast wich can ferment within a few minutes glucose present in a dilute solution, leaving behind the non fermentable reducing bodies.

In all experiments the hepatic glycogen and glycaemia of each animal were determined. The glycaemia in normal situations was first obtained. It was found to be 159 mg. %, giving the starting sugar. After this, determinations were made on various fasting mice of glycogen and blood sugar, thus reaching an average figure in this situation of 59 mg. for the glycaemia oscillating between 130-30 mg. %, and 660 gr. % for glycogen. We present the corresponding tables (tables I and II). Determinations of glycaemias were always made in blood obtained by beheading the mouse.

The hormonal study was begun with insulin, injecting a batch of fasting animals with insulin doses of 1 I. U. and thus obtaining an average glycogen of 1160 mg. %, which signified a 75 % increase in fasting level. In the blood sugar, average figure obtained was 50 mg. %, signifying a descent of 16 %. We present a table corresponding to the determination (table III).

The action of corticosuprarrenal hormones was then studied using cortisone and hydrocortisone. In determination with two hours between injection and analysis the dose employed in both was 10 mg.

Using cortisone, the average result was 840 mg. per hundred grammes of liver for glycogen, which represents a 27 % increase from fasting figure. Average glycaemia is 75 mg. % and thus a 27 % increase over fasting figure (table IV, graph I).

Two hours after administration of hydrocortisone average values of 930 mg. per hundred grammes liver and 97 mg. %. Glycaemia were obtained after two hours, representing increases of 40 and 64 % respectively over average fasting values (table VI).

Thus a greater action of hydrocortisone and a marked correlation in increase in glycaemia and glycogen by both cortical substance are observed. For a four-hour interval a dose of 15 mg. of cortisone was used, it was increased in order to observe the change of determinations. Average glycogen value was 580 mg. % grammes liver, and glucemia was 82 mg. % representing a drop from fasting values of 13 % in the case of glycogen and a rise of 38 % in that of glycaemia (table V).

In hydrocortisone, dose used was also 10 mg. and after 4 hours, and average was 420 mg. % in glycogen and 82 milligrammes % in blood sugar; percentage descent was 37 % and glycaemia increased 38 % (table VII, graphic II). The permanence of glycaemia elevation was marked at this time in which on the other hand a drop in action for glycogen was obtained.

Later we studied corticotropic hormone, a dose of 5 I. U. being perfectly tolerated by the animals. Experiments were done at intervals of 2-3 hours between injection and analysis. Rats fasting for twenty four hours were injected. Increase was 7 % with respect to initial fasting glycogen, the average for two hour experiments being 710 mg. (table VIII), for four hour experiments no increase was found. Glycaemia was not found to be increased after two hours, average was 56 milligrammes %. At four hourly intervals between injection and analysis increase was 10 % with respect to initial figure, the average being 65 mg. % (table IX). The statistical error being taken into account, it was concluded that ACTH in these conditions does not seem to exert a significant action on glycaemia and glycogen of the swiss mouse (graphic II).

After performing studies on isolated hormones it was desired to observe influence of these corticoids and of ACTH on insulin action, an investigation which seemed of much interest. In each experiment we used two mice fasting for 24 hours. To one of them a dose of one unit of insulin was injected intraperitoneally, and to the other, insulin plus a

determined dose of hormone under study waiting for a maximum of two hours.

First, experiments were done with cortisone, 10 mg., and insulin 1 I. U.; it was concluded that cortisone (table X) does not provoke a state of insulin resistance. The mice present clinical symptoms thought to be due to discharge of adrenaline. The average of the mixture was 610 mg. per hundred grammes liver and 57 mg. % for the glycaemia, which represents in glycogen 12 % less than those treated with insulin above and 7 % more than the latter in the glycaemia (graphic III).

In determinations with hydrocortisone and insulin it was concluded that hydrocortisone also lacked anti-insulin action and from signs presented by the animals it is believed that discharge of adrenaline did not occur, which would explain the great rise in glycogen shown in mice injected with the mixture. The dose of hydrocortisone employed was 6,6 mg. (table XI) and 1 I. U. of insulin, and average values obtained with the mixture were 1130 mg. % glycogen, and 29 % glycaemia.

An increase of 94 % gr. is thus appreciated in glycogen over values for insulin alone; in glycaemias there were no alterations (graphic III).

For animals treated with corticotrophin and insulin, doses were 5 I. U. and 1 I. U., the average for the mixture was 540 % glycogen, signifying a fall of 7 % from insulin-treated group, and in glycaemia an average value of 44 mg. % showed an increase for the mixture of 37 % (table XII). It was deduced the corticotrophin does not exert compensatory action for insulin by glucocorticoid pathways (graphic II).

From all this it was deduced that in our experiments the corticoids used act with respect to fasting dose (graphic IV) by raising glycogen and glycaemia, and that for the same dose the action of hydrocortisone is greater than cortisone. All these data apply to experiments performed two hours after injection. At a four-hour interval the two hormones seemed to increase the glycaemia and diminish glycogen in relation to average fasting figures; the glycogen descends while glycaemia continues high but for less than two hours. It seems that after four hours the effects of the glucocorticoids on glycogenogenesis have ceased to exist and as fasting continues the animal rapidly exhausts the fresh reserves primarily created. This could also explain the temporary elevation of blood-sugar in this interval.

It is noteworthy that KENNETH (9) in experiments on normal rats found neither increase nor decrease of blood sugar

caused by cortisone. Undoubtedly, our conditions were very different and we cannot conclude anything with respect to the complicated endocrine mechanisms which may intervene in this state such as stress, adrenaline, alpha cells of pancreas, etc., until we enlarge the field in future successive experiments.

As to corticotrophin (graphic IV) we note the slight difference between determinations of ACTH at two and four-hourly intervals, and the fasting experiments. In this our results agree with those obtained by KENNETH (9) and the effects found in the hormonal combinations done also agree with his; we consider very plausible KENNETH's deduction that cortisone is not perhaps a normal secretion of the mouse suprarenal and that for this reason stimulation of the suprarenal cortex for production of its corticoids does not take place. The animals used in our study had been fasting for 24 hours and it seems that hyperglycaemia and glucosuria by ACTH (6) is favoured by a diet rich in carbohydrate. This could influence this case, not as a cause of the want of reaction but solely as a factor favouring it and above all there are the investigations of KENNETH in obese mice, for which the former theory seems to indicate a possible greater increase in blood sugar which is not however produced.

On the other hand as can be appreciated in table II the average fasting blood sugar is 59 mg. % and in table I we see that the glycaemic average in normal conditions is 159 milligrammes %. Thus the fall in sugar after a 24 hours fast is to approximately one third. At the beginning of the investigations it seemed to us only a point of rapid metabolism, to-day after determinations with ACTH we see a new proof of its non-reactibility to stress (fast) mobilizing hyperglycaemic corticoids. On the whole we cannot conclude anything definitely, but we think worthy of consideration this apparent reactional normality of the mouse in its suprarenal capsules with normal histology for fresh investigations in the future.

Bibliografía

- (1) ABELOVE y PASCKEISH *Endocrinology*, **58**, 1, 1956.
- (2) ENGEL : *Ann. Rev. Physiol.*, **15**, 397, 1953.
- (3) GOOD, KRAMER y SOMOGYI : *J. Biol. Chem.*, **100**, 485, 1933.
- (4) HAGEDORN-JENSEN : *Biochem. Z.*, **135**, 46, 1923 y **137**, 92, 1923.
- (5) HOUSSAY y ANDERSON : *Endocrinology*, **45**, 627, 1949.
- (6) INGLE y colabs. : *Endocrinology*, **41**, 110, 1947.
- (7) INGLE y colabs. : *Proc. Soc. Exper. Biol. (N. Y.)*, **84**, 334, 1952.
- (8) KENNETH, SHULL y MAYER : *Endocrinology*, **58**, 1, 1956.

- (9) KENNETH, SHULL y MAYER : *Endocrinology*, **58**, 220, 1956.
- (10) KRAMPITZ y WERKMAN : *Arch. Biochem.*, **12**, 57, 1947.
- (11) PERRINI y colabs. : *Folia Endocrinologica (Fise)*, **7**, 653, 1931.
- (12) PINCUS y HEMADJIAN : *Ann. Rev. Physiol.*, **16**, 403, 1954.
- (13) PORTER y SILVER : *Endocrinology*, **53**, 73, 1953.
- (14) REINHARDT y colabs. : *Acta Endocrinol.*, **8**, 393, 1951.
- (15) ROBERTS y SZEGO : *Ann. Rev. Biochem.*, **24**, 543, 1955.
- (16) SELYE, H. : «Stress», Ed. Científico-Médica, Madrid, 1954.
- (17) SELYE, H., y DOSNE : *Proc. Soc. Exper. Biol. med.*, **42**, 580, 1939.
- (18) SOMOGYI : *J. Biol. Chem.*, **75**, 33, 1927.
- (19) SPIRTOS y NAHMI : *Endocrinology*, **58**, 193, 1956.
- (20) SPRAGNE y colabs. : *Arch. Int. Med.*, **85**, 199, 1950.