

Centro de Investigaciones Fisiológicas
Hospital Tornú. — Buenos Aires

Las sustancias tóxicas de los músculos productoras del shock

V. H. CICARDO *

(Recibido para publicar el 25 de febrero de 1948)

Las inyecciones de extractos de tejidos producen en los animales un shock semejante al obtenido durante los traumatismos musculares o por la eliminación de torniquetes. Los esfuerzos de los investigadores han sido dirigidos a detectar la naturaleza de las sustancias tóxicas contenidas en los extractos, capaces de producir los síntomas del shock. DALE y LAIDLAW (1919) sugirieron la posibilidad de que la sustancia liberada de los tejidos traumatizados sería la histamina. BIELSCHOWSKY y GREEN (1943) admiten que el tóxico es la adenosinatrifosfato o el pirofosfato muscular, mientras que PEN, CAMPBELL y MANERY (1943) hallaron que los extractos «alcohólicos» de los músculos presentan concentraciones de potasio suficientes para producir los efectos tóxicos.

Como puede verse, no se ha establecido definitivamente la naturaleza del o de los tóxicos desencadenantes del shock que producen los extractos de tejidos. Este problema es de gran interés, pues su solución permitirá aclarar también el mecanismo de producción de las distintas formas de shock, que presentan, como es sabido, características semejantes.

El reconocimiento de las sustancias tóxicas musculares ha sido el motivo de estas investigaciones.

MÉTODO. — Los extractos se preparaban sometiendo músculos de vaca o de perro finamente triturados a la acción del al-

* Profesor titular de Física Biológica de la Facultad de Medicina de la Universidad nacional de La Plata (Rep. Argentina).

cohol, en una proporción de 1 c. c. de alcohol por cada gramo de tejido. A las 24 horas se filtraba el líquido y se exprimía la masa muscular con el objeto de obtener un mayor rendimiento. El filtrado se evaporaba por ebullición y se concentraba hasta la total eliminación del alcohol; luego, con el agregado de solución fisiológica se llevaba el extracto a una concentración tal que 1 c. c. = 10 g. de tejido. De la misma manera se prepararon, en ocasiones, extractos de hígado, riñón y páncreas que, como veremos, presentan propiedades hipotensoras más o menos semejantes a la de los músculos. Las extracciones con éter o con agua, realizadas en forma semejante que con el alcohol dieron extractos poco activos, razón por la cual se abandonó este procedimiento de extracción.

Los extractos recién preparados o conservados en la heladera se inyectaban en la vena femoral en perros anestesiados con Nembutal (barbiturato-etil-sódico). La acción se observaba registrando la presión arterial a nivel de la arteria carótida y la respiración por medio de neumógrafos. Se inyectaba por vez 1 c. c. de extracto por cada 3 kilogramos de perro, pues dosis mayores provocan la muerte brusca del animal por paro cardíaco. Para la obtención de una caída duradera de la presión arterial era necesario inyectar entre 70 y 150 c. c. de extracto. A medida que se repetían las inyecciones, el umbral crítico de paro cardíaco disminuía por la intoxicación progresiva, lo que exigía una cantidad menor de extractos en cada inyección.

Teniendo en cuenta la posibilidad de que el fósforo inorgánico o el potasio fuesen los agentes productores del shock, se determinó en los extractos las concentraciones de estos elementos y luego se prepararon soluciones de fosfato disódico y de cloruro de potasio equivalentes. Como la concentración de fósforo en los extractos oscila en los 0,380 g. %, se prepararon soluciones de fosfato disódico al 1,8 g. %. El potasio se encuentra en los extractos en una concentración de alrededor de 1,7 g. % que vale aproximadamente a una solución de cloruro de potasio al 3 g. %. Estas soluciones de fosfato disódico o de cloruro de potasio se inyectaban a los perros en igual forma que los extractos con los cuales se comparaba el comportamiento sobre la presión arterial y la respiración.

En los animales chocados se determinaron las concentra-

ciones plasmáticas del fósforo total ácidosoluble y del potasio, antes y, por lo menos, 30 minutos después de la última inyección de extracto. La sangre se recogía con heparina de la arteria femoral y se centrifugaba para la obtención del plasma. El fósforo total ácidosoluble se determinaba por el método de EISKE y SUBBAROW y el potasio por el de KRAMER y TISDALL modificado por MARENZI y GERSCHMAN. Finalmente se estableció el volumen globular por medio de hematocritos.

RESULTADOS

Toxicidad de los extractos musculares. — La inyección endovenosa de 1 c. c. de extracto muscular por cada 3 kilogramos de perro produce una caída marcada de la presión arterial al mismo tiempo que un aumento de la amplitud y de la frecuencia respiratoria. La presión puede caer a 10 mm. de Hg., pero la intensidad de la hipotensión depende de la reactividad particular de cada animal. El descenso de la presión es transitorio, dura unos pocos minutos y coincide con una disminución de la frecuencia cardíaca.

A medida que se repiten las inyecciones, se observa que la presión no asciende a los valores iniciales, que disminuye la amplitud respiratoria y que finalmente el animal entra en shock, con ausencia de reflejos y presiones por debajo de 70 mm. de Hg. (fig. 1). Por lo general son exigibles de 70 a 150 c. c.

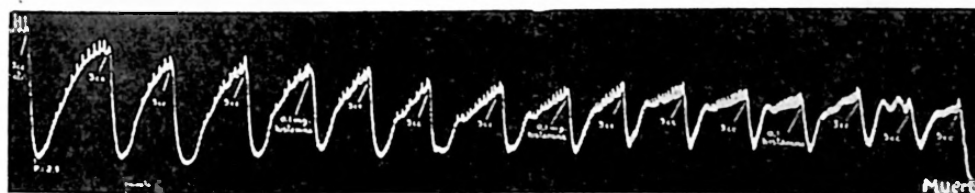


Fig. 1. Muerte por paro cardíaco por inyección de una dosis alta de extracto muscular. La inyección de 0,1 mg. de histamina produce una curva de caída de la presión arterial similar a la de 3 c. c. de extracto.

de extracto para la obtención del estado de shock, presentando los animales grandes diferencias individuales de sensibilidad. Después que se ha desencadenado el shock, a pesar de que han sido suspendidas las inyecciones de extractos, el ani-

mal muere al cabo de varias horas con descensos secundarios de la presión arterial o bien se recupera totalmente.

La inyección de una dosis alta de extracto produce la muerte por paro brusco cardíaco que precede al paro respiratorio (figura 2). Los animales intoxicados por las inyecciones repe-

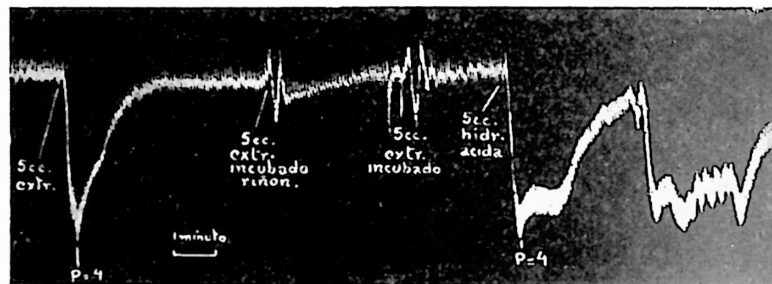


Fig. 2. La hidrólisis ácida del extracto que destruye la adenosinatrifosfato no modifica la curva de caída de la presión arterial. Si el extracto es incubado con riñón (que contiene histaminasa), las caídas bruscas de presión no se observan.

tidas de extractos se muestran hipersensibles y pueden morir con una dosis que no era mortal al principio de la experiencia.

Características semejantes a la de los extractos musculares presentan los extractos de hígado, riñón o páncreas; pero las

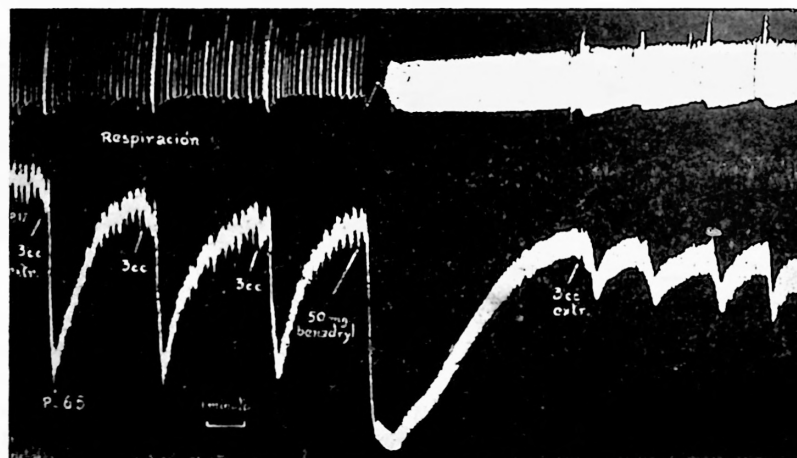


Fig. 3. El Benadryl disminuye la caída de la presión arterial que produce la inyección de extracto muscular.

caídas de presión arterial que producen los extractos de hígado en cada inyección son más acentuadas y duraderas que la de los otros tejidos (fig. 3).

Los extractos obtenidos por medio de extracciones con éter o agua, revelan poca actividad, razón por la cual no fueron utilizados.

MODIFICACIONES ELECTROLITICAS DEL PLASMA

En los estados de shock, distintos autores han puntualizado los aumentos del potasio y del fósforo plasmático, elementos que serían, según algunos de los defensores de la teoría tóxica, los agentes productores más probables del descenso de la presión arterial y demás síntomas asociados. Con las inyecciones de los extractos musculares se obtiene durante el estado de shock modificaciones electrolíticas semejantes a las observadas en el shock traumático. Aumentos constantes y marcados del potasio y del fósforo total ácidosoluble del plasma se registran a nivel de la arteria femoral durante el shock producido por inyecciones repetidas de extractos. Estas modificaciones coinciden con cambios variables del volumen globular (Cuadro I).

CUADRO I

Modificaciones del potasio y del fósforo total ácidosoluble del plasma extraído de la arteria femoral del perro durante el shock inducido por inyecciones repetidas de extractos musculares.

Expe- rimen- to n.º	A N T E S				D U R A N T E E L S O C K				A U M E N T O %	
	Presión arterial	Pota- sio mg. %	Fósforo total ácido- soluble mg. %	Volu- men globu- lar	Pre- sión arte- rial	Pota- sio mg. %	Fósforo total ácido- soluble mg. %	Volu- men globu- lar	Potasio	Fósforo
1	7,5	13	5,0	43	4	20	8,1	43	+ 53	+ 62
2	10	13	5,4	45	5	27	9,4	47	+ 108	+ 74
3	12	17	3,0	45	5,5	21	6,0	52	+ 30	+ 100
4	12	13	2,6	52	6	25	16,4	45	+ 93	+ 530
5	10	13	7,0	37	3	16	9,4	45	+ 100	+ 34
6	14	13	3,6	42	8	32	14,0	45	+ 145	+ 288
7	16	16	6,0	45	8,5	21	8,6	44	+ 31	+ 43
8	13	16	7,3	50	7	33	10,0	43	+ 106	+ 37
9	13	14	3,7	47	5	30	12,6	47	+ 114	+ 240
10	9	11	4,4	39	5	16	8,8	42	+ 45	+ 100
11	11,5	15	4,3	47	5	18	6,0	52	+ 20	+ 39
12	8,5	11	4,1	33	2	21	5,3	30	+ 90	+ 29
13	10	10	3,6	44	2	28	16,4	44	+ 180	+ 355
14	8	13	3,7	44	3	19	13,3	53	+ 46	+ 259
15	18	14	4,7	54	6	23	—	72	+ 64	+ —
16	9	16	5,0	33	3	22	9,3	36	+ 37	+ 86
17	13	12	3,6	41	3	16	7,9	56	+ 33	+ 119
Pro- medios		13,5	4,5			22,8	10,0		+ 76	+ 150

Si los animales no entran en shock a pesar de las inyecciones de extractos, los aumentos de potasio y del fósforo plasmático no se producen, o bien son poco acentuados. A su vez el volumen globular acusa cambios semejantes al de los animales *shocados*, lo que indica que la hemoconcentración es una variación accesoria en el shock (Cuadro II).

CUADRO II

Modificaciones del potasio y del fósforo total ácidosoluble del plasma recogido de la arteria femoral de perros que murieron a consecuencia de la inyección de una dosis abundante de extracto muscular. La muestra había sido extraída al comienzo del paro cardíaco.

Expe- rimen- to n.º	ANTES DEL PARO CARDÍACO				DURANTE EL PARO CARDÍACO				AUMENTO %	
	Presión arterial	Pota- sio mg. %	Fósforo total ácido- soluble mg. %	Volu- men globu- lar	Pre- sión arte- rial	Pota- sio mg. %	Fósforo total ácido- soluble mg. %	Volu- men globu- lar	Potasio	Fósforo
1	12	14	5,7	43	7	28	7,9	43	+ 100	+ 38
2	13	12	4,7	37	9	60	16,7	40	+ 400	+ 255
3	11	16	3,0	48	—	85	14,3	45	+ 431	+ 377
4	—	19	2,4	42	—	76	15,7	41	+ 300	+ 554
5	14	15	5,1	46	11	42	11,1	51	+ 180	+ 118
6	11	14	3,9	50	9	73	19,3	55	+ 421	+ 395
7	12,5	15	4,2	48	11	33	11,9	52	+ 120	+ 183
8	12	12	3,6	42	—	24	8,0	44	+ 100	+ 122
9	13	18	3,3	47	—	53	14,1	43	+ 194	+ 327
Pro- medios		15	4,0			53	13,2		+ 250	+ 263

Las tomas de sangre realizadas en el instante en que sobreviene la muerte por paro cardíaco, como consecuencia de la inyección de una dosis elevada de extracto muscular, revelan las concentraciones más elevadas de potasio y de fósforo plasmático. Los aumentos del potasio en estas circunstancias son siempre superiores al 100 por 100. (Cuadro II.)

NATURALEZA DE LAS SUBSTANCIAS TOXICAS

Las posibles sustancias hipotensoras contenidas en los extractos, capaces de producir los estados de shock, serían la acetilcolina, la adenosino-trifosfato, la histamina y el potasio.

a) *Acetilcolina.* — La acetilcolina queda descartada como agente hipotensor en nuestros extractos, pues las caídas de pre-

sión se producen en idéntica forma en los animales fuertemente atropinizados. Además, si los extractos se mantienen a un pH 8-9 durante un cierto tiempo, la actividad de los mismos se mantiene inalterable, hecho que no se registra con la acetilcolina, la cual se destruye en medio alcalino.

b) *Adenosinatrifosfato*. — La adenosinatrifosfato, otro factor invocado por los autores como agente determinante del shock, no desempeña ningún papel en nuestros extractos, pues la hidrólisis ácida en solución normal de HCl y 7 minutos de ebullición, no modifica en lo más mínimo las curvas de caída de la presión arterial. Además, una solución de fosfato disódico al 1,8 % que contiene una concentración de fósforo igual a la de los extractos, no afecta mayormente la presión arterial (figura 2).

c) *Histamina*. — Las caídas bruscas de la presión que producen en el perro las inyecciones de extractos, son debidas a la presencia de histamina, dado que las inyecciones de difosfato de histamina producen curvas idénticas a la de los extractos. Una cantidad de 0,1 mg. de histamina (0,275 difosfato de histamina) produce una caída de presión equivalente a la que producen 3 c. c. de extracto muscular. Los extractos de hígado producen caídas más acentuadas y prolongadas por la mayor concentración histamínica.

Los extractos presentan sobre los órganos del perro propiedades farmacológicas semejantes a las de la histamina; así puede comprobarse polipnea y aumento de la amplitud respiratoria por el broncoespasmo, contracción intestinal y dilatación pupilar cuando la inyección del extracto se efectúa en la arteria carótida. Lo mismo que la histamina, los extractos inyectados en las venas del conejo producen aumento de la presión arterial.

Los extractos incubados con una papilla de riñón pierden, parcial o totalmente, su actividad, como consecuencia de la destrucción de la histamina por las enzimas renales (Fig. 2).

Las sustancias antihistamínicas sintéticas como el Benadryl (benzedril beta-dimetilaminoetilico) y la Pyribenzamina (piridil-N-benzil-N-dimetilenediamina) inyectadas en cantidades de 3 miligramos por kilo, disminuyen considerablemente la acción hipotensora de los extractos y permiten una más rápida recuperación de la presión (fig. 3). Los animales inyectados pre-

viamente con Benadryl se muestran más resistentes al shock que producen los extractos musculares. La inyección de 100 c. c. de extracto que, por lo general, es suficiente para provocar el estado de shock, no produce descensos de la presión arterial ni modificaciones electrolíticas tan acentuadas como las que se registran en los perros no inyectados con Benadryl.

La acción protectora de las sustancias antihistamínicas no se observa en lo que se refiere a la dosis mortal de extracto, pues la muerte se produce en los animales con Benadryl con dosis semejantes a la de los controles (Fig. 4).

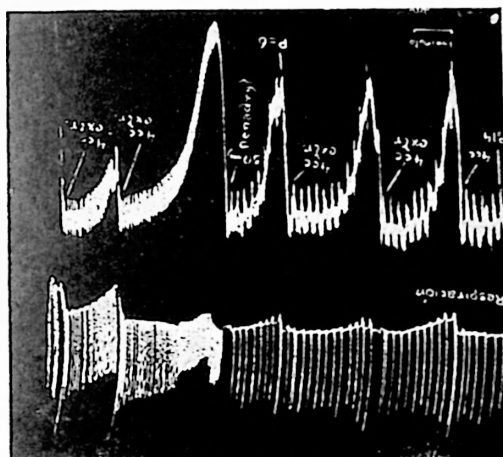


Fig. 4. Los antihistamínicos no impiden la muerte brusca por paro cardíaco que producen las dosis altas de extractos.

d) *Potasio*. — El hecho de que una dosis de extracto superior a 1 c. c. por cada 3 kilos de perro sea mortal, permite establecer que la muerte no es debida a la histamina que contienen los extractos, dado que los animales soportan dosis superiores a 1 mg. de histamina por kilo de peso sin morir, y ya se ha visto que 3 c. c. de nuestros extractos equivalen aproximadamente a 0,1 mg. de histamina. Una solución de cloruro de potasio al 3 %, que tiene la misma concentración de potasio que los extractos, produce la muerte en la misma forma y en cantidades iguales que éstos.

Las inyecciones endovenosas de 1 c. c. por cada 3 kilogramos de la solución de cloruro de potasio al 3 %, producen en

el perro, no un descenso de la presión arterial, sino un aumento transitorio determinado, como es sabido, por la contracción de los músculos lisos de las paredes vasculares, por la excitación de los centros vasomotores y por la descarga de adrenalina. Pero si a la solución de potasio se le agrega una cantidad de histamina semejante a la que presentan los extractos, el efecto hipertensor no se observa y, por el contrario, sólo se registra la caída de la presión arterial con iguales características que con los extractos (Fig. 5).

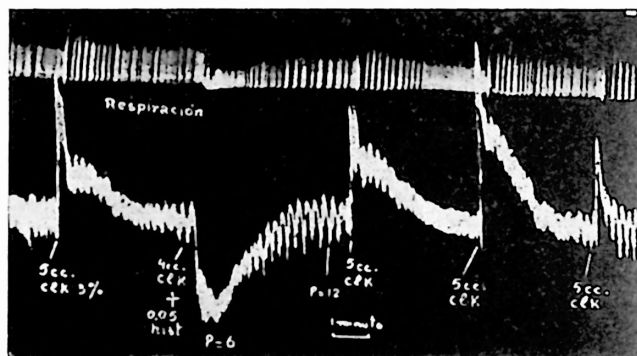


Fig. 5. Las inyecciones de una solución de cloruro de potasio al 3 por 100 en cantidades iguales al extracto muscular, aumentan la presión arterial; pero, si se agrega histamina, la curva es semejante a la que producen los extractos.

Debe señalarse que la hipotensión que produce la histamina es menos acentuada cuando se asocia al potasio, por el antagonismo existente entre estas dos sustancias sobre la presión arterial, lo que significa que las cantidades de histamina determinadas en los extractos sobre este test biológico, son en realidad superiores a las registradas.

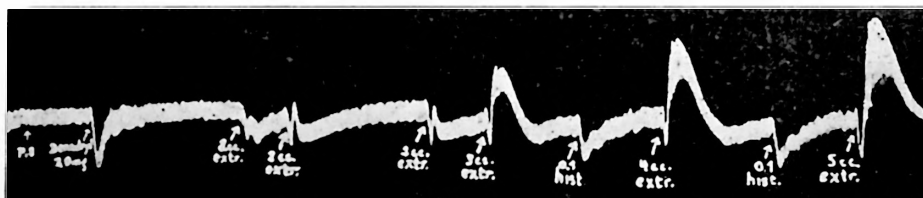


Fig. 6. La inyección previa de Benadryl, al neutralizar la acción de la histamina, hace que el extracto provoque hipertensión por su contenido en potasio.

Los efectos de la histamina y del potasio de los extractos musculares se pueden disociar por medio de los antihistamínicos sintéticos como el Benadryl, pues en los animales inyectados previamente con estas sustancias se comprueba frecuentemente que los extractos, en lugar de producir caída de la presión arterial, causan hipertensión en idéntica forma que las soluciones de potasio (Fig. 6).

DISCUSION

Es evidente que la acción hipotensora de los extractos de tejidos es debida a la presencia de la histamina. El efecto tóxico mortal obtenido con los extractos es debido al potasio, pues cantidades mayores de 1 c. c. por cada 3 kilos de perro de la solución de cloruro de potasio al 3 %, que equivale a las concentraciones de potasio que presentan los extractos musculares producen la muerte en idéntica forma por paro cardíaco.

Teniendo en cuenta que los músculos presentan una concentración de potasio aproximada de 400 mg. % y que los extractos en los cuales 1 c. c. = 10 g. de músculo, contienen 1.800 mg. % de este elemento, puede establecerse que la extracción alcohólica ha permitido extraer el 45 % del contenido del potasio muscular.

La presencia de la histamina en los extractos queda evidenciada por la identidad de las curvas de caída de la presión arterial con respecto a las soluciones de difosfato de histamina, que revelan que 3 c. c. de extracto equivalen aproximadamente a 0,1 mg. de histamina básica. Además, en el perro los extractos producen los mismos efectos farmacológicos que la histamina, pudiéndose registrar broncoespasmo, contracciones intestinales, dilatación pupilar, etc. Lo mismo que la histamina, los extractos aumentan la presión arterial de los conejos cuando se inyectan por vía endovenosa. El hecho de que la papilla renal inactive los extractos, como consecuencia de la acción de la histaminasa y de que los antihistamínicos sintéticos como el Benadryl y la Piribenzamina disminuyen el efecto hipotensor de los extractos, son elementos de juicio que confirman la presencia de histamina en los extractos.

La acetilcolina debe descartarse como agente hipotensor

en los extractos, pues la atropinización previa del animal no modifica las curvas de caída de la presión arterial y lo mismo sucede cuando los extractos se alcalinizan a un pH 8 en que se destruye dicha substancia. También debe descartarse la adenosinatrifosfato, dado que la hidrólisis ácida de los extractos no modifica su actividad. Tampoco las soluciones de fosfato disódico con igual concentración de fósforo que los extractos musculares revelan influencia sobre la presión arterial y la respiración del perro.

Las modificaciones electrolíticas que se observan en el plasma durante el shock inducido por extractos musculares, son semejantes a las registradas durante el shock traumático y como en éste se comprueba aumento de la concentración del potasio y del fósforo inorgánico. Ya se ha visto que la acción tóxica de los extractos es debida al potasio y no al fósforo.

La muerte brusca por la inyección de una dosis alta de extracto, coincide con un aumento de potasio plasmático que siempre es superior al 100 % con respecto a los valores iniciales. No es exigible, como sostienen WINKLER, HOFF y SMITH (año 1939), de que el potasio plasmático deba alcanzar una concentración de 50-60 mg. % en el perro para producir la muerte, pues el paro cardíaco, no sólo depende de la cantidad de potasio inyectado, sino también del grado de sensibilidad de la fibra miocárdica, dado que se ha visto que una dosis que al principio de la experiencia no era mortal, produce el paro cardíaco después de varias inyecciones.

Admitiendo que el shock traumático es producido por las substancias tóxicas liberadas por los músculos, podría aceptarse que la histamina es la causante de la caída de la presión arterial y el potasio de la muerte por paro cardíaco.

Resumen

1.° Los extractos musculares obtenidos por medio del alcohol y concentrados por ebullición de manera que 10 gramos de tejido equivalen a 1 ml. de extracto, revelan una marcada acción hipotensora en el perro y terminan por provocar, después de la inyección de 70 a 150 ml., un estado de shock que puede provocar la muerte al cabo de algunas horas. Los extractos obtenidos con éter o con agua destilada, resultan poco activos.

2.° Las caídas de presión arterial que se producen con la inyec

ción endovenosa de una dosis de extracto no mayor de 1 ml. por cada 3 kilogramos de peso del perro, son debidas a la histamina, pues una curva de presión semejante se obtiene con inyecciones de difosfato de histamina, correspondiendo 3 ml. de extracto a 0,1 mg. de histamina básica. Además, el extracto incubado con papilla renal resulta inactivado por la histaminasa, mientras que los antihistamínicos sintéticos, como el Benadryl o la Pyribenzamina, disminuyen la intensidad de la caída de la presión y aumentan la resistencia a la producción del shock.

3.° La muerte por paro cardíaco que producen cantidades de extracto superiores a 1 ml. por 3 kg. de perro, cuando son inyectadas por vía endovenosa, es debida al potasio, pues la inyección de igual cantidad de una solución de cloruro de potasio al 3 g. %, que equivale, más o menos, a la concentración de potasio que presentan los extractos musculares (1,7 g. %), se comporta de idéntica manera. Las soluciones de cloruro de potasio determinan, como los extractos, una caída gradual de la presión arterial que conduce al estado de shock y a la muerte.

4.° La atropina y la hidrólisis ácida de los extractos no modifican las curvas de caída de la presión arterial, lo que permite descartar la intervención de la acetilcolina y de la adenosina-trifosfato. Soluciones de tosfato disódico al 1,8 g. %, que contienen la misma concentración de fósforo que los extractos, no producen ningún trastorno cuando se las inyecta a los perros.

5.° Las modificaciones electrolíticas del plasma de los animales shockados por las inyecciones de extractos son semejantes a las observadas durante el shock traumático; es decir, que se registra un aumento del potasio y fósforo total ácido soluble del plasma. En el momento de la muerte del animal por la inyección de una dosis alta de extracto, el potasio está aumentado en más del 100 por 100 con respecto a los valores iniciales. El volumen globular, como en el shock traumático, presenta o no hemoconcentración.

6.° El shock primario que producen los extractos sería debido a la histamina y el shock secundario y la muerte al potasio.

Summary

1. The muscular extracts, obtained by alcohol treatment, were filtered, and then concentrated by ebullition until 10 g. of tissue became equivalent to 1 c. c. These extracts exert a noticeable hypotensive effect in the dog, with a subsequent shock condition, which several hours after the injection of from 70 to 150 c. c. of the extract may lead to death. The ether or with distilled water treated extracts were scarcely active.

2. The arterial pressure drops following the intravenous injection of less than 1 c. c. of the extract for each 3 kg. body weight are due to the histamine, as is evident from the fact that histamine diphosphate injections at a proportion of 3 c. c. of extract = 0,1 mg. of basic histamine, yield a similar pressure curve. Furthermore, when the extracts are incubated with renal pap, they become inacti-

vated by the histaminase, whereas the synthetical antihistaminic substances (e. g. Benadryl or Pyribenzamine) lessen the intensity of the pressure fall, thus increasing the resistance against the induction of shock.

3. Death from cardiac arrest following the intravenous injection of more than 1 c. c. of extract for each 3 kg. of the dog's weight, is due to the potassium, as is shown by the fact that the injection of an equal amount of a 3 g. per cent potassium chloride solution (the potassium concentration of which is identical with that of the muscular extracts, i. c., 1,7 g. per cent) produces the same effect.

4. Atropine and acid hydrolysis of the extracts do not modify the curves of the arterial pressure fall; which fact permits one to discard the intervention of acetylcholine and adenosinetriphosphate. 1,8 g. per cent disodium phosphate solutions, which contain the same phosphorus concentration as the extracts, do not produce any symptoms when injected to dogs.

5. The electrolytic changes of the plasma of animals under shock condition provoked by the injections of extracts, are similar to those observed during traumatic shock; i. e., plasma potassium and total acid soluble phosphorus are increased. At the animal's death following the injection of a lethal dose of extract, potassium increase is above 100 per cent, as compared with the initial values. As in traumatic shock, the cell volume may, or may not present any hemoconcentration.

6. The primary shock condition after the injection of extracts would be due to histamine, while the secondary shock and death might be attributed to the potassium.

Bibliografia

- BIELSCHOWSKY, M. y GREN, H. N., *Lancet* 2, 153, 1943.
DALE, H. H. y LAIDLAW, P. P., *J. Physiol.* 52, 355, 1919.
GREEN, H. N., *Lancet* 2, 147, 1943.
PEN, D. F., CAMPBELL, J. y MANERY, J. E., *Amer. J. Physiol.* 141, 262, 1944.
WINKLER, A. W., HOFF, H. E. y SMITH, P. K., *Amer. J. Physiol.* 139, 686, 1943.