

REVISTA CLÍNICA ESPAÑOLA

Director: C. JIMENEZ DIAZ. Secretarios: J. DE PAZ y F. VIVANCO

Redacción y Administración: Antonio Maura, 13. Madrid. Teléfono 22 18 29

TOMO LV

15 DE DICIEMBRE DE 1954

NUMERO 5

REVISIONES DE CONJUNTO

GLUCAGON

(Factor hiperglucemiante - glucogenolítico F H G).

J.-V. FERNÁNDEZ COLINA y J. M.^a TORRES-ACERO
FERNÁNDEZ.

Servicio de Medicina General y Nutrición del Hospital
Central de la Cruz Roja de Madrid.
Jefe: Doctor C. BLANCO-SOLER.

SUMARIO: Introducción.—Sinonimia.—Historia.—Aislamiento.
Purificación. Propiedades físico-químicas.—Lugar de producción y distribución.—Naturaleza hormonal.—Propiedades biológicas y mecanismo bioquímico de su acción.—Efectos fisiológicos e importancia patológica en relación con la diabetes.—Conclusiones.—Bibliografía.

INTRODUCCIÓN.

Desde que BANTING y BEST aislaron, hace ahora treinta y tres años, la insulina como hormona pancreática, muchos han sido los estudios dedicados al conocimiento de esta hormona, y en especial se ha insistido por numerosos autores sobre la existencia de una posible sustancia hiperglucemiante que acompaña a la insulina en los extractos pancreáticos, y que también ha sido identificada en la mayor parte de las insulinas comerciales.

El reciente estudio del factor hiperglucemiante-glucogenolítico (F H G) del páncreas, o Glucagón, ha venido a completar el conocimiento de la función endocrina pancreática y ha servido para explicar también muchos problemas relacionados con el metabolismo hidrocarbonado y la diabetes, tanto experimental como clínica, que todavía permanecían bastante oscuros.

En este trabajo nos proponemos hacer un resumen del estado actual de nuestros conocimientos sobre tan interesante tema, insistiendo preferentemente sobre el fundamental papel que el Glucagón posee en el metabolismo hidrocarbonado.

SINONIMIA.

El factor hiperglucemiante del páncreas fué denominado con el nombre de Glucagón por KIMBALL y

MURLIN (1924), nombre que posteriormente fué aceptado por BÜRGER y BRANDT (1935). GREVENSTUCK y LAQUEUR (1925) han llamado también a esta sustancia "anti-insulina", denominación aceptada por CHOAY (1926), y BELFANTI (1924) a la sustancia aislada del páncreas con acción hiperglucemiante la denominó "Sustancia Y". La denominación de Glucagón ha sido mantenida durante todos estos últimos años, aunque más recientemente se denomina también factor hiperglucemiante-glucogenolítico, factor H. G. o F. H. G.

HISTORIA.

La hiperglucemia que alcanza su máximo a los diez o quince minutos de inyectados los extractos pancreáticos y muchas insulinas del comercio, es transitoria, desapareciendo pronto para ser sustituida por la hipoglucemia clásica insulínica. Este fenómeno, que aparece principalmente cuando los extractos pancreáticos o la insulina se inyectan por vía intravenosa, fué ya dado a conocer al poco tiempo de comenzarse a emplear estas preparaciones en la terapéutica de la diabetes (ASHBY, 1923; CLOUGH, STOKES, GIBBS, STONE y MURLIN, 1923; CLOUGH, ALLEN y ROOT, 1923; COLLENS y MURLIN, 1929; GIBBS, ROOT y MURLIN, 1923; LAGUESSE, 1923 y MURLIN, CLOUGH, GIBBS y STOKES, 1923). Según BÜRGER y KRAMER (1929 a, 1929 b y 1930 a), este efecto hiperglucemiante es debido a la acción glucogenolítica que posee la insulina sobre el hígado cuando es inyectada intravenosamente. Desde un principio se supuso que la acción hiperglucemiante era producida por impurezas más que por un producto pancreático específico: se basaba esta suposición en que la insulina cristalizada obtenida por ABEL (1926), en manos de GEILING y de LAWDER (1930) y de BÜRGER y KRAMER (1930 b) no producía hiperglucemia. Sin embargo, en 1934 SCOTT, por un nuevo procedimiento, obtiene una insulina cristalizada que es adoptada por la mayoría de los preparadores de insulina comercial; este hecho, aparentemente intrascendente, viene a cambiar no obstante el rumbo de las investigaciones referentes

al factor hiperglucemiante-glucogenolítico, ya que con las nuevas insulinas, algunas recrystalizadas varias veces, se vuelve a observar la aparición de glucogenolisis tras de su administración. Los estudios de BRIDGE (1938) y EVANS (1941) en animales y de SHYPLEY y HUMEL (1945) en cortes de hígado confirmaron este fenómeno, que muchos sostuvieron era debido a la propia insulina, hecho no aceptado por otros autores como FIESSINGER, BENARD, HERBAIN y DERMER (1936) y FIESSINGER y BAREILLIER (1937), que vuelven a pensar en que esta acción es debida a impurezas que acompañan a la insulina, que según BENARD (1939) es un cofactor de la amilasa y para otros por la presencia de nuevo del Glucagón en las insulinas crystalizadas y purificadas (LUNDGAARD, NIELSEN y ORSKOV, 1939, y BÜRGER y BRANDT, 1935).

El problema de la hiperglucemia inicial causada por las preparaciones de insulina crystalizada se vuelve a poner de manifiesto con los trabajos de DE DUVE (1945), DE DUVE, MARIN y BOUCKAERT (1946) y DE DUVE, HERS y BOUCKAERT (1946) empleando distintas insulinas comerciales, resultados que han sido confirmados también por OLSEN y KLEIN (1945). En 1948, SUTHERLAND y CORI demuestran, utilizando cortes de hígado, un efecto glucogenolítico que no aparece con aquellas insulinas que no ejercen efecto hiperglucemiante, efecto atribuible únicamente a un segundo factor que acompaña indudablemente a la insulina.

Ya los trabajos de MARKS y YOUNG (1939) y de THOROGOOD y ZIMMERMANN (1945) sugerían la existencia de un factor antagonista de la insulina segregado por el páncreas, que SUTHERLAND y DE DUVE (1948) han demostrado está presente en los extractos pancreáticos, pues éstos, al igual que las *muestras comerciales de insulina*, actúan en una primera fase como hiperglucemiantes.

Las revisiones recientes de BÜRGER (1950), CORI (1949), PINCUS (1950), SUTHERLAND (1950, 1951 a, 1951 b), SUTHERLAND y CORI (1951), DE DUVE (1951 a, 1951 b, 1952 y 1953), GRANDE (1953), PLICHET (1953) y STEIGERWALD (1954) han servido para aclarar este tema, que hasta el momento se encontraba muy confuso.

ASLAMIENTO, PURIFICACIÓN, PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.

La separación del Glucagón de la insulina es sumamente difícil, lo que hace presumir que la naturaleza química de ambas sustancias debe ser muy semejante.

FISHER (1923) aisló de los extractos acuosos de páncreas, por precipitación con alcohol a baja concentración, un componente hiperglucemiante, separando éste de la insulina, ya que aquélla precisa de una mayor concentración alcohólica para obtener su precipitación, y BELFANTI (1924) obtuvo de los extractos etéreo-alcohólicos de páncreas una sustancia (Sustancia Y) con propiedades igualmente hiperglucemiantes. Ya en época más reciente SAKA (1952) ha aislado de páncreas normal, de orina de ratas y conejos aloxán-diabéticos, y orina de pacientes diabéticos, por precipitación con alcohol de 72-80 por 100, y redisolviendo en búffer de fosfatos a pH de 4-4.5, y evaporando a vacío un factor hiperglucemiante-glucogenolítico.

Después de considerables esfuerzos, BÜRGER y BRANDT en 1935 aislaron una fracción del páncreas

que era muy activa como hiperglucemiante, pero que todavía contenía alguna cantidad de insulina. HEARD, LOZINSKI y STEWARD (1948) separaron en el sobrenadante de la primera precipitación isoelectrica de la insulina productos hiperglucemiantes, que KAZAL, SPICER y BARNES y BRAHINSKY (1948) lograron obtener más activos del sobrenadante de la precipitación con cloruro sódico al 15 por 100 utilizando el procedimiento descrito por ROMAS, SCOTT y FISHER (1940). Posteriormente, KAZAL, WOLFE, SPICER y BARNES (1950), utilizando también la solución de cloruro sódico al 15 por 100, y siguiendo la marcha que a continuación se indica (cuadro I), han logrado aislar fracciones muy activas como hiperglucemiantes a partir de preparados crudos de páncreas.

De estas fracciones la más activa es la tercera, o preparado número 3 (ver cuadro), insoluble en ácido tricloroacético y que aparentemente está libre de insulina; los preparados restantes, si bien actúan como ligeramente hiperglucemiantes en su fase inicial, después pueden producir una fuerte hipoglucemia que en los animales de experimentación utilizados (conejos) puede llegar a producir convulsiones. La presencia de factor hiperglucemiante en todas las fracciones indica falta de una adecuada separación de este factor de las sustancias contaminantes y es posible pensar que se encuentra realmente adsorbido por las proteínas de estas fracciones. La actividad de estas fracciones es igual si se administran por vía hipodérmica o intravenosa. La repetida administración por vía hipodérmica produce hipoglucemia y convulsiones en los animales inyectados.

GAEDE, FERNER y KASTRUP (1950) han separado también el Glucagón por medio de un fraccionamiento con cloruro sódico. Otro procedimiento de separación del Glucagón es el propuesto por SUTHERLAND, HAYNES y OLSEN (1949), basado en que este factor no forma filamentos con ácido clorhídrico en caliente, como le ocurre a la insulina (WAUGH, 1946). La separación del Glucagón por inactivación alcalina de la insulina, en los preparados comerciales de ésta, tiene el inconveniente de que también se produce en parte una degradación del factor hiperglucemiante.

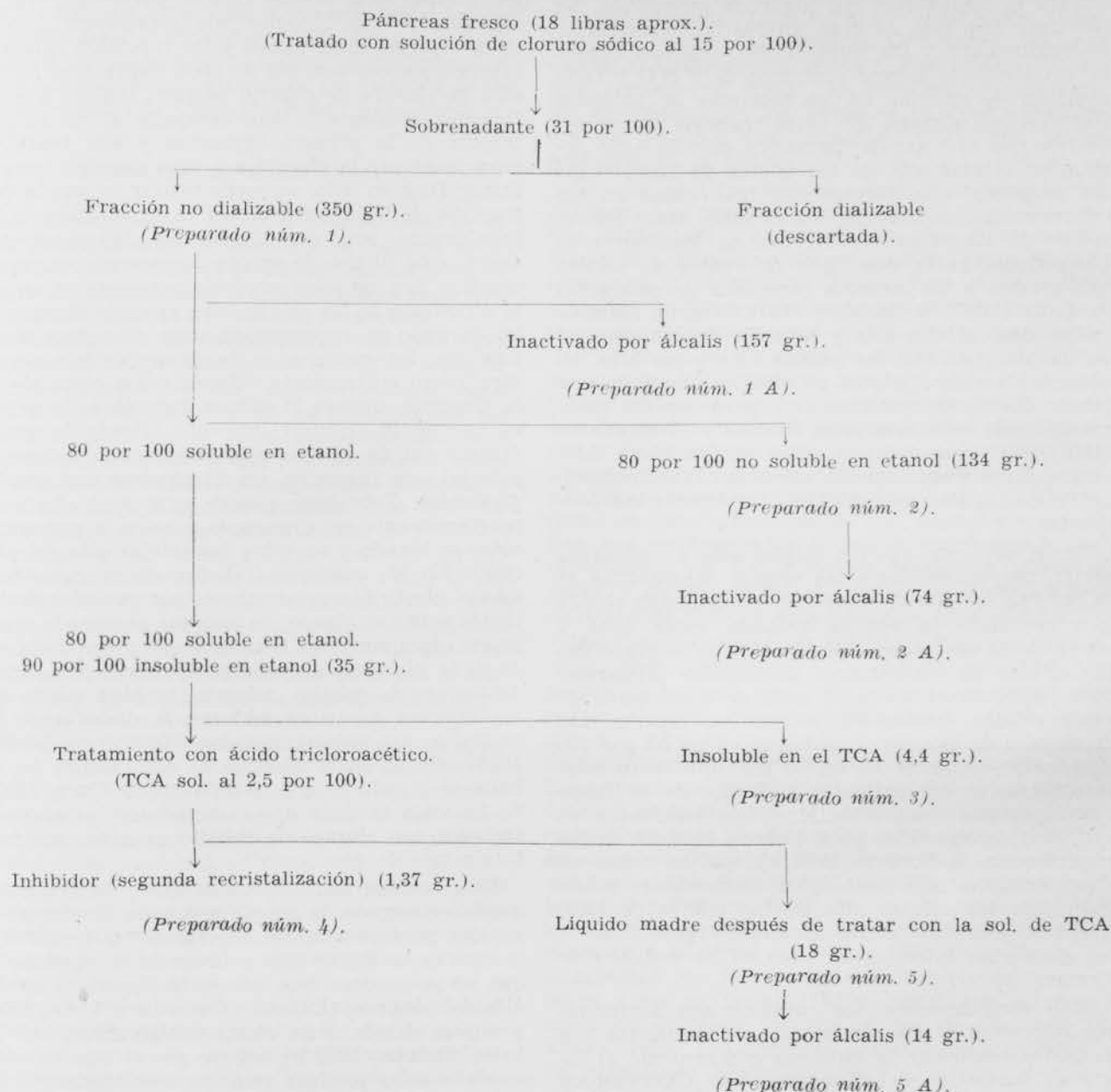
VUYLSTEKE y DE DUVE (1953) han aislado de insulinas purificadas una fracción parcialmente cristalina que es diez veces más activa en cortes de hígado que las muestras obtenidas por el método de SUTHERLAND, HAYNES y OLSEN (1949), y STAUB, SINN y BEHRENS (1953) han obtenido de una insulina amorfa un factor hiperglucemiante, en forma cristalina, muy purificado, que a dosis de 0,15 µg. por kilo de peso produce en gatos una elevación de la glucemia de 30 mg. por 100, haciéndose observar que los cristales aún contienen indicios de zinc.

FOA, SANTAMARÍA, BERGER, SMITH y WEINSTEIN (1952) han empleado en sus experiencias dos tipos de FHG: uno, llamado "FHG crudo", obtenido tratando un subproducto de la fabricación de insulina, que se disuelve en NaOH 0,08 N y que se incubaba dos horas a 39° ajustando el pH a 7,4 con ClH diluido, filtrando o centrifugando a continuación, y otro, el "FHG semipurificado", obtenido tratando con NH₃ y haciendo una purificación parcial precipitando con alcohol etílico al 80 por 100.

También son recientes las investigaciones de BOKMÜLLER y REBLING (1954), que han aislado un Glucagón muy puro por medios electroforéticos.

CUADRO I

PREPARACION DE FRACCIONES PANCREATICAS CON PROPIEDADES HIPERGLUCEMIANTES (KAZAL, WOLFE, SPICER y BARNES)



El Glucagón es, pues, como la insulina, de naturaleza polipeptídica, no es dializable y precipita por el ácido tricloroacético y es inactivado por los enzimas proteolíticos (BÜRGER y BRANDT, 1935, y SUTHERLAND y CORI, 1948). Difiere de la insulina en que retiene más de su actividad después de incubación con álcalis o con cisteína (NIELSEN, 1932; BÜRGER y BRANDT, 1935; SUTHERLAND y CORI, 1948), siendo también mucho más sensible a la inactivación con tripsina (VAN ABEELE y CAMPBELL, 1951). Para STEIGERWALD (1954) se trata el Glucagón de un glucoproteído, según se demuestra por el análisis de BAUSTEIN. Es factor estable en sangre heparinizada a 37° durante una hora, no protege en cambio los ratones frente a las convulsiones inducidas por la insulina, pero sí invierte el efecto hipoglucemiante de la insulina en el conejo.

LUGAR DE PRODUCCIÓN. DISTRIBUCIÓN.

La distribución del Glucagón en diferentes tejidos ha sido estudiada por SUTHERLAND y CORI (1948), habiendo observado que el único órgano que da verdaderamente extractos activos es el páncreas. En perros y en conejos, pero no en cerdos, ovejas y vacas, se encuentra igualmente en los dos tercios superiores de la mucosa gástrica una sustancia en todo semejante con el Glucagón. En el íleon y en el duodeno de perro también se ha encontrado, mientras que de la zona pilórica no se ha obtenido casi producto hiperglucemiante. Es más abundante en los páncreas fetales, localizándose en los páncreas de los adultos en la parte de la cola (porción esplénica) y en los páncreas esclerosados por ligadura de los conductos excretores. FOA y co-

laboradores (1953) han obtenido FHG tratando el páncreas y mucosa gástrica con amoníaco, sin que este procedimiento haya dado resultados positivos con el tejido hepático y renal.

Para la localización del lugar de producción del Glucagón han sido de gran interés las experiencias de SUTHERLAND y DE DUVE (1948), que han puesto de manifiesto el mayor contenido de FHG y falta absoluta de insulina en los páncreas de animales tratados con aloxana. De estos trabajos parece deducirse que el lugar de formación del Glucagón serían las células alfa de los islotes de Langerhans del páncreas, que permanecen inalteradas en las experiencias con aloxana. Ya se sabe, desde los estudios de LAGUESSE (1894), que en los islotes de Langerhans había dos tipos diferentes de células que gracias a los métodos especiales de coloración de LANE (1907) y BENSLEY (1911) fueron identificadas como células alfa y beta. Se llegó a suponer en un principio que las células alfa y las beta del páncreas serían distintos estadios celulares de una misma formación embriogénica, pero hoy día autores de tanta solvencia como FERNER y STOECKENIUS (1951-1953) consideran a estas células como diferentes tanto morfológicamente como funcionalmente, formando sistemas celulares totalmente independientes.

Se ha supuesto que las células alfa del páncreas serían muy parecidas a las células argentófilas de la mucosa intestinal. WEISBERG y GERSCHEN (1952) han estudiado la posible relación entre unas y otras, tomando como tipo de células argentófilas las células de los tumores carcinoides primarios; han analizado asimismo el sitio de localización de estas células carcinoides, siendo los lugares más frecuentes de asiento el apéndice (en un 57 por 100 de casos) y el íleon (en un 20 por 100), pero solamente tres de los pacientes revisados de la literatura existente eran diabéticos. Los resultados en este sentido han sido, pues, pobres, también de las experiencias de FODDEN (1953 a), que ha hecho un concienzudo estudio histológico, histoquímico y biológico de las células alfa de los islotes de Langerhans, y de las células cromafín-argentófilas de los elementos intestinales, poco se ha podido confirmar.

Más recientemente, los estudios con destructores selectivos de las células alfa de los islotes han venido a reafirmar la hipótesis concerniente al lugar de formación del Glucagón. VAN CAMPENHOUT y CORNELIS (1951 a y 1951 b) observaron que el cloruro de cobalto lesionaba específicamente las células alfa en los páncreas de cobayas; también VUYLSTEKE, CORNELIS y DE DUVE (1952) han investigado el contenido en Glucagón de los páncreas tratados por este medio, comprobando en cortes de hígado y en administración parenteral cómo se reduce a más de un tercio su valor normal. GOLDNER, VOLK y LAZARUS (1952) han comprobado cómo los páncreas de conejos tratados por vía intravenosa con cloruro de cobalto sacrificados a las veinticuatro o cuarenta y ocho horas muestran la destrucción de las células alfa. Al momento de la inyección se eleva el azúcar sanguíneo, volviendo a la normalidad después de cuatro o cinco horas, siendo producida también hiperglucemia por la nueva inyección de cloruro de cobalto.

Estos hechos hacen suponer dos eventualidades según estos mismos autores (GOLDNER, VOLK y LAZARUS, 1953): se puede pensar, por un lado, en

la posibilidad de que las células alfa lesionadas liberen una sustancia hiperglucemiante, hipótesis ésta en relación con la admitida por BÜRGER y BRANDT (1935), PINCUS (1950) y SUTHERLAND y DE DUVE (1948); al mismo tiempo parece ser que la ausencia de una hipoglucemia persistente después de la hiperglucemia inicial y los repetidos episodios hiperglucémicos después de cada nueva administración de cloruro de cobalto parecen indicar que suficientes células alfa han escapado al efecto destructor de la primera inyección y son bastantes para mantener la glucemia y para causar hiperglucemia. De otro lado, se puede pensar en que la destrucción de las células alfa y la producción de hiperglucemia son dos fenómenos independientes, siendo este último de origen únicamente extrapancreático. Los estudios morfológicos demuestran que la alteración de las células alfa aparece rápidamente, durando su regeneración unos diez días, mientras que los cambios en la hiperglucemia siguen otro ritmo enteramente diferente. La elevación de la glucemia aparece lo mismo después de la primera que de la segunda inyección, siendo la mayor destrucción de células alfa consecutiva solamente a la primera inyección, no alterándose casi con las siguientes. Todo hace pensar en que el efecto hiperglucemiante del cloruro de cobalto es por acción sobre el hígado y no sobre las células alfa del páncreas. En los animales tratados con aloxana dura más el efecto hiperglucemiante por probable acción tóxica sobre el hígado, habiéndose observado igualmente otros síntomas tóxicos y una precipitada caída de la glucemia después de sucesivas inyecciones de cloruro de cobalto. Además, es bien sabido que las injurias hepáticas mejoran la diabetes de los animales pancreatetectomizados (SOSKIN y LEVINE, 1952), siendo lugar electivo de eliminación del cobalto el hígado y bilis (GREENBERG y COPP, 1943). Se ha visto también que el hígado de los animales tratados con cloruro de cobalto aparece casi faltar totalmente de glucógeno.

En el animal pancreatetectomizado y en el parcialmente eviscerado, la simple inyección de cloruro de cobalto produce también hiperglucemia transitoria, lo cual es un hecho más a favor de la hipótesis de que no se produce ésta por estímulo de las células alfa del páncreas (LAZARUS, GOLDNER y VOLK, 1953) y que es debida a un efecto independiente del cobalto. FODDEN (1953 b) arguye que si bien el cloruro de cobalto produce cambios morfológicos degenerativos en las células alfa, no se aprecian aberraciones metabólicas en estas células. Confirma todas estas suposiciones el último trabajo de GOLDNER, VOLK y LAZARUS (1954), que estudian el efecto sobre la glucemia de los extractos pancreáticos de perros previamente tratados con cobalto, observándose que causan la misma hiperglucemia los extractos de los perros cobalto-tratados que de los no tratados con cobalto, de lo que parece deducirse que no es en las células alfa del páncreas donde se forma el Glucagón.

Se ha aislado también de la orina de enfermos esquizofrénicos, clasificados por MEDUNA (1950) más recientemente como "oneirofrénicos", un factor hiperglucemiante (MEDUNA y VAICHULIS, 1948, y MEDUNA y CULLOCH, 1945). La existencia de este factor en la orina hace presumir que en estos procesos patológicos se produce un anormal metabolismo hidrocarbonado. La fracción G aislada por MORGAN y PILGRIM (1951) de enfermos de la Wes-

tern Psychiatric Clinic por método distinto al recomendado con la orina de normales por HARROW, MAZUR, CHAMELIN y LESUK (1936) ha dado como resultado en su administración intravenosa a dosis de 0,5-1 mg. por rata a un incremento en el azúcar sanguíneo de 35 a 69 mg. por 100. Aunque todavía es pronto para hacer deducciones categóricas, parece ser que el producto eliminado por la orina de los onefrénicos y el Glucagón tienen una íntima relación.

NATURALEZA HORMONAL. ENSAYO.

Las investigaciones de estos últimos años se dirigen principalmente a descubrir la naturaleza de este factor. ¿Se trata en efecto de una hormona diferente de la insulina o, por el contrario, es la misma insulina con una variante en su acción?

El Glucagón es un polipéptido o sustancia similar capaz de ejercer una acción específica sobre un sistema enzimático de un órgano remoto al lugar de su formación. Se pensó en un principio que por su acción en el hígado como glucogenolítico sería parecido a la adrenalina, con la diferencia de que el Glucagón no estimula la glucogenólisis muscular y carece de acción simpaticomimética. Una molécula de Glucagón (peso molecular alrededor de 6.000) es equivalente en actividad glucogenolítica a un mínimo de seis moléculas de adrenalina y con 10 μ g. de factor hiperglucemiante-glucogenolítico se produce una acción hiperglucemiante en el conejo, todo ello aboga por la naturaleza hormonal de este factor, dadas las pequeñas dosis que producen efecto. Su acción a distancia, sobre la glucogenólisis hepática, como lo demuestra la falta de acción en animales en los que se excluye el hígado por hepatectomía o evisceración (MERCKLEN e INGLE, NEZAMIS y HUMPHREY, 1953), y su producción en formaciones celulares típicamente endocrinas, como ocurre para otras hormonas, inclinan también a pensar en su naturaleza hormonal.

La principal confirmación de su característica hormonal sería su demostración en sangre y el hecho de que la extirpación de las formaciones incertoras creara un cuadro de ausencia de la misma, tratable únicamente con la administración de la hormona. El cobalto, como ya hemos dicho, no causa más que una efímera destrucción de las células alfa, y por otro lado, en la diabetes metahipofisaria y en la aloxánica, sólo se destruyen las células beta, y en los pancreatetectomizados sí son destruidas ambos tipos de células. Por ello, de la comparación de pancreatetectomizados de una parte, y de aloxanizados y diabéticos por estímulo hipofisario por otra, pueden resultar conclusiones muy interesantes a este respecto. Ya después de los trabajos de MARKS e YOUNG (1939) con perros diabéticos metahipofisarios y de THOROGOOD y ZIMMERMANN (1945) con aloxán-diabéticos, se vio la diferencia existente con aquellos que habían sido pancreatetectomizados. Cuando se priva de insulina a este último grupo de perros sufren más severamente que los otros aunque la dosis de insulina necesaria para controlar esta diabetes sea menor. Iguaes diferencias se han descrito entre los verdaderos diabéticos y los que han sufrido pancreatetectomía (ROCKEY, 1943; GOLDNER y CLARK, 1944, y GASTON, 1948). El que necesiten los perros diabéticos por la aloxana más insulina que los otros para controlar su proceso, parece explicar que un factor anti-insular sigue produciéndose, que contrarresta parte de la in-

sulina administrada. El que este factor se localice en páncreas parece ser un hecho, como lo demuestra que las necesidades de insulina en los animales diabéticos por la aloxana disminuyen al ser pancreatetectomizados (THOROGOOD y ZIMMERMANN, 1945; CANDELA, GOÑI, CALDEIRO y GONZÁLEZ, 1947, y CANDELA, 1952). Según MIRSKY, FUTTERMAN, WACHMAN y PERISUTTI (1951), los menores requerimientos en insulina en los animales pancreatetectomizados era debido a una incompleta utilización de las proteínas de la dieta.

El que el Glucagón es vertido en sangre ha quedado confirmado gracias a los trabajos de FOA, WEINSTEIN y SMITH (1949), FOA, SANTAMARÍA, WEINSTEIN, BERGER y SMITH (1952) y FOA, MAGID, GLASSMAN y WEINSTEIN (1953). Con circulaciones cruzadas en perros haciéndose anastomosis venosas pancreato-duodenales = femoral y mesentérica = femoral, se ve cómo la inyección de insulina en un perro va seguida de hiperglucemia en el otro y viceversa, cómo por la inyección de F H G en el donador se produce una hipoglucemia en el receptor por probable secreción de insulina en respuesta a la administración del factor hiperglucemiante. La respuesta en animales tratados con aloxana, que se ponen en circulación cruzada con normales es idéntica, con producción de Glucagón, confirmando las experiencias de CAVALLERO y MALANDRA (1949 y 1950) y de MALANDRA y CAVALLERO (1950) sobre secreción de F H G en los páncreas aloxanizados.

Más recientemente BORNSTEIN, REID y YOUNG (1951) han demostrado la presencia de F H G en sangre de la vena pancreática de ratas diabéticas por la aloxana, hipofisectomizadas y adrenalectomizadas, y en gatos normales tratados por hormona hipofisaria del crecimiento. Actuando esta hormona (hormona somatotrófica hipofisaria) desencadenando la producción de Glucagón en ausencia de la hipófisis y de las glándulas suprarrenales y siendo activo el Glucagón después de suprarrenalectomía, como han demostrado RATHERY, KOURILSKY y LAURENT y PINCUS (1950), y tras de la sección de los espláncnicos (IONESCO). Ya desde los trabajos de HOUSSAY y BIASOTTI (1930 a y 1930 b) al extirpar la hipófisis con la consiguiente mejoría de la diabetes, y los de YOUNG (1949) inyectando extracto crudo de hipófisis anterior, y los de BENNETT y EVANS (1950) con hormona somatotrófica hipofisaria obteniendo hiperglucemia y glucosuria temporal, se vio la gran relación que existe entre la hormona del crecimiento con el posible papel del Glucagón. Después de la administración de la hormona del crecimiento hipofisario se produce un incremento en la demanda de insulina que al hacerse la inyección continua termina por producir una degeneración en las células beta con el consiguiente descenso en la producción de insulina (HOUSSAY y FOGLIA, 1938 y 1944 y ANDERSON y LONG, 1947), mientras que las células alfa no sufren modificación (DOHAN, FISH y LUKENS, 1941) y pueden ser estimuladas por la hormona somatotrófica hipofisaria. FOA y colaboradores (1953) han comprobado también la producción de hiperglucemia en perros con anastomosis pancreatoduodenal-femoral al inyectar hormona del crecimiento. Con ello se confirman las experiencias de BORNSTEIN y cols. (1951) y se reafirma la hipótesis de la naturaleza hormonal del Glucagón.

El ensayo del Glucagón se puede hacer o bien "in vivo" o "in vitro". "In vivo", estudiando el efecto

hiperglucemiante en conejos directamente por la inyección intravenosa o por el efecto antagónico frente a la administración de insulina. Este último procedimiento sería de elección si los preparados de Glucagón fueran completamente puros y estuvieran totalmente exentos de insulina.

Sin embargo, el mejor procedimiento de control es el que se basa en el estudio de la glucogenolisis en cortes de hígado según la técnica propuesta y desarrollada por SUTHERLAND y DE DUVE (1948) y SUTHERLAND y cols. (1949). El fundamento es el siguiente: En los cortes de hígado de animales incubados a 37° en condiciones aerobias en una solución salina tampón de fosfatos, la reserva de glucógeno se transforma en glucosa. La adición de Glucagón aumenta la cantidad de glucosa producida. Se harán comparaciones con los resultados obtenidos por preparados tomados como standards.

PROPIEDADES BIOLÓGICAS. MECANISMO DE SU ACCIÓN BIOQUÍMICA.

Probablemente la acción biológica más saliente y hasta ahora más comprobada en el Glucagón es su efecto glucogenolítico sobre el hígado. En contra de las primeras opiniones de OLSEN y KLEIN (1947) y de WEISBERG, CAREN, HUDDLESTUM y LEVINE (1949), el Glucagón es igualmente activo cuando se administra por vía hipodérmica que cuando se hace por vía intravenosa (VUYLSTEKE, DE DUVE y NYS, 1950). Su actividad glucogenolítica se presenta "in vitro" en perfusión de hígado y en cortes de hígado, no apareciendo si éstos previamente han sido homogeneizados, pues es necesaria la estructura celular intacta para que se presente este efecto.

No sólo ha sido ésta la única propiedad biológica estudiada del Glucagón, ya que a él se atribuyen también la acción estimulante de la respiración (HEARD, LOZINSKI, STEWARD y STEWARD, 1948); el efecto sobre gluconeogénesis (WATERS, 1949) en cortes de hígado; la inhibición del efecto de la insulina en diafragma aislado de rata, a la que antagoniza, haciendo pensar que el Glucagón podía actuar disminuyendo el consumo de glucosa en el músculo (CANDELA, TAMARIT, CANDELA y CRISTENSEN-KÖNIG, 1951 y 1952 b); la elevación de la cantidad de grasas en el hígado (BENSLEY y WORNEY, 1938); la acción cetogénica en el animal completo (ZIMMERMANN y DONOVAN, 1948); la acción estimulante de la excreción de urea (TYBERGHEIN, 1953) cuando se administra de forma continua intravenosa, y la acción eosinopénica (VUYLSTEKE, DE DUVE y NYS, 1950) que presenta como la adrenalina.

De todas estas propiedades es, como decíamos antes, su actividad glucogenolítica la más importante. Esta acción recuerda mucho a la producida por la adrenalina, aunque otras propiedades de ésta no hayan podido ser reproducidas por el Glucagón como la acción sobre aparato cardiovascular (VUYLSTEKE, DE DUVE y NYS, 1950; PINCUS, 1950),

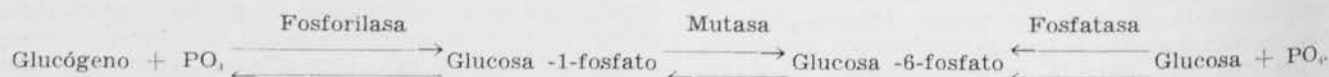
el efecto sobre el nivel de ácido láctico en sangre (SUTHERLAND, 1950; VUYLSTEKE y cols., 1950) y sobre la caída de glucógeno en el músculo (TYBERGHEIN, 1950).

El metabolismo de las grasas es íntimamente afectado, hecho ya observado con la adrenalina (BLIXENKRONE y MOLLER, 1938), que incrementa la producción de acetoacetato en las experiencias de perfusión de hígado de gato. HAUGGARD y STADIE (1953) han observado que la adrenalina y el Glucagón inhiben parcialmente la incorporación de acetato a los ácidos grasos en cortes de hígado de rata y posteriormente HAUGGARD y HAUGGARD (1954) han estudiado la síntesis de ácidos grasos y la formación de cuerpos cetónicos a partir de glucosa y fructosa isotópica. Como dato sobresaliente de estos trabajos se deduce que el F H G actúa oxidando los ácidos grasos e inhibiendo su síntesis, acción que se opone a la insulina.

Sin embargo, este efecto no es nada claro, ya que es inhibida la síntesis de los ácidos grasos tanto si el precursor es el acetato como si lo es la glucosa o fructosa, indicando con ello que el Glucagón actúa sobre la oxidación de los ácidos grasos tanto como sobre las preliminares reacciones del substrato radiactivo. Simultáneamente se observa cómo se incrementa la formación de cuerpos cetónicos.

El mecanismo bioquímico de la acción del Glucagón ha sido bien estudiado por SUTHERLAND y CORI (1948 y 1951), que han observado considerable incremento de la fosforilasa activa en las células hepáticas, hecho que explica la mayor producción de glucosa en los cortes de hígado. Hecho semejante se produce con la adrenalina sobre cortes de hígado (ELLIS, ANDERSON y TURTLE, 1952). La dihidroergotamina bloquea el efecto de la adrenalina, pero no el del F H G (ELLIS, ANDERSON y COLLINS, 1954); en ambiente oxigenado, la respuesta se produce también; no en cambio en presencia de nitrógeno. Concentraciones moderadas de iodoacetato, que bloquean la glucólisis, no interfieren en cambio los efectos de la adrenalina, siendo incrementada la glucogenolisis por pequeñas cantidades de 2-4-dinitrofenol, que favorece la acción de la adrenalina activando la fosforilasa, mientras que el fluoruro sódico que por sí sólo incrementa la producción de glucosa y glucogenolisis y activa la fosforilasa no acentúa estos efectos de la adrenalina en su presencia.

Es fundamental para que se realice el efecto hiperglucemiante-glucogenolítico del Glucagón que exista una estructura celular, ya que carece de acción, como antes se indicó, sobre extractos o papillas de hígado. Por lo tanto, se deduce de esto que el Glucagón, si bien no actúa directamente sobre sistemas enzimáticos, su efecto es a través de algún mecanismo celular regulador de los enzimas que intervienen en el paso del glucógeno a glucosa. Según SUTHERLAND (1951 a), en este proceso intervienen tres enzimas en la forma que a continuación se indica:



La adición a los cortes de hígado de glucosa-1-fosfato o glucosa-6-fosfato incrementa la producción de glucosa (SUTHERLAND y CORI, 1951), lo que

viene a indicar que tanto la mutasa como la fosfatasa pueden transformar mayores cantidades de éster fosfórico de la glucosa que el producido por la fosfo-

rilasa. De ello parece deducirse que la primera parte de la reacción, precisamente en la que interviene la fosforilasa, aun siendo la más lenta es la primordial y sobre la que puede actuar el Glucagón activándola. El Glucagón, lo mismo que la adrenalina, aumentan la cantidad de fosforilasa en los cortes de hígado, actuando más sobre la síntesis de la fosforilasa que sobre su destrucción, incliniéndose el equilibrio

Síntesis de fosforilasa \rightleftharpoons Destrucción de fosforilasa

hacia la síntesis, mientras que tóxicos como el fluoruro sódico impiden sólo la destrucción. A su vez, el paso de fosforilasa inactiva a activa puede realizarse muy rápidamente en presencia de Glucagón. Es, pues, primordial el conocimiento del mecanismo bioquímico por el que actúa el Glucagón para explicar su importante papel como regulador del metabolismo hidrocabonado aunque todavía no se encuentre resuelto totalmente este problema.

EFFECTOS FISIOLÓGICOS E IMPORTANCIA PATOGENICA EN RELACIÓN CON LA DIABETES.

A pesar de que todavía es provisional todo cuanto pueda decirse en relación con el papel fisiológico que desempeña el Glucagón en el organismo, es casi generalmente admitido que sus acciones son opuestas a las de la insulina. Podría argumentarse en este sentido que también la adrenalina es efectiva bajo este punto de vista. Sin embargo, el Glucagón la aventaja al carecer de acción sobre el glucógeno muscular y no poseer acción simpaticomimética. Posiblemente el Glucagón no actúa como la adrenalina, neutralizando la acción economizante de proteínas propias de la insulina.

Parece, pues, lógico admitir que el Glucagón es una segunda hormona pancreática que se opone a los efectos de la insulina, aunque conjuntamente con ella mantiene el equilibrio hidrocabonado.

El Glucagón puede variar en sus efectos fisiológicos en animales anestesiados (WEISBERG, CARON, HUDDLESTON y LEVINE, 1949), hecho también estudiado por LOUBE, CAMPBELL y MIRSKY (1950) en el hombre. El efecto hiperglucemiante se aumenta con la anestesia (inyección intravenosa de pentobarbital sódico). Podría ser debido a que se aumenta el tiempo de la circulación periférica (ABRAMSON, 1944). Tal aumento en la corriente periférica sanguínea reduce la diferencia arteriovenosa de azúcar en sangre. En cambio, la anestesia no modifica el efecto glucogenolítico del Glucagón.

La variable acción del Glucagón en cuanto a la producción de hiperglucemia ha sido bien estudiada por FOA, SANTAMARÍA, BERGER, SMITH y WEINSTEIN (1952), que han comprobado que el F.H.G. en animales pancreatectomizados con cetosis es mayor la hiperglucemia en los que presentan cetosis ligera que en aquellos con cetosis más severa. En el animal pancreatectomizado bien controlado y sin cetosis el efecto hiperglucemiante es mayor que en el animal normal, sugiriendo estos autores que la acción del F.H.G. es limitada por la presencia de insulina; al mismo tiempo, en los animales pancreatectomizados bien controlados sin cetosis, el efecto hipoglucemiante de la insulina es mayor que en los normales, creyendo igualmente que la insulina es también limitada en sus efectos por el Glucagón.

De todo lo cual se deduce que la insulina y el Glucagón actúan mutuamente regulándose una a otra y manteniendo el nivel de glucosa en sangre.

Es de gran interés la relación existente entre la hormona del crecimiento hipofisaria y el Glucagón, ya que cabía la posibilidad de un efecto sobre crecimiento del factor hiperglucemiante-glucogenolítico. El reciente trabajo de GESCHWIND y STAUB (1953) no parece reconocer esta actividad del Glucagón, ya que con un preparado altamente purificado (Lote núm. 208-108 B-234) y en el que la insulina había sido previamente destruida por tratamiento con cisteína, a dosis de 250 μ g. por día, durante períodos de tiempo de cuatro días en ratas hipofisectomizadas, no se produce estímulo en el crecimiento del disco cartilaginoso del extremo epifisario proximal de la tibia. Este resultado no concuerda con las experiencias de ELDRICK (1952), lo que hace suponer que los preparados utilizados por este autor no estaban lo debidamente purificados; la presencia de insulina puede ser la causa de este estímulo sobre el crecimiento del cartilago de la tibia de rata hipofisectomizada, pues se sabe desde los trabajos de SALTER y BEST (1953) y BEST (1952) que la insulina en animales en estas condiciones actúa como estimulante del desarrollo del disco cartilaginoso de la tibia. Todo ello tiene relación indudablemente con la presencia de fosforilasa encontrada en los cartilagos de las epifisis (GUTMAN y GUTMAN, 1941; ALBAUM, HIRSCHFELD y SOBEL, 1952) y con el papel que la glucogenolisis tiene en la calcificación de los cartilagos. Las reservas citoplasmáticas de glucógeno empiezan a desaparecer en el momento que el material mineral del hueso comienza a depositarse en el tejido preóseo (GUTMAN, 1951 y HARRIS, 1932) y se estimula la división celular, efecto sobre la mitosis (JORDÁN, 1928), muy interesante para explicar la acción sobre el crecimiento.

La hormona hipofisaria del crecimiento produce un efecto hiperglucemiante transitorio por probable estímulo en la producción de Glucagón (CARBALLEIRA, ELDRICK, MACKENZIE y BROWNE, 1952) por las células alfa del páncreas (CAVALLERO y MOSCA, 1953).

En época reciente, INGLE, BEARY y PUMARLIS (1954) han observado un aumento temporal en la eliminación de glucosa por la orina de ratas moderadamente diabéticas por pancreatectomía parcial después de la administración continua de Glucagón.

El papel que el Glucagón puede desempeñar en la patogenia de la diabetes ha sido motivo de múltiples experiencias (PINCUS y RUTMAN, 1953). MAC QUARRIE, BELL, ZIMMERMANN y WRIGHT (1950) han observado en ciertos pacientes diabéticos que el aumento o la disminución en la producción de Glucagón por sus células alfa de los islotes de Langerhans del páncreas crea variaciones en sus manifestaciones clínicas. PINCUS (1950) ha estudiado el efecto del Glucagón sobre el azúcar sanguíneo de enfermos diabéticos. En pacientes con "diabetes estable" y función normal de sus células alfa, la administración de insulina puede directa o indirectamente producir un aumento en la secreción de F.H.G. y en pacientes con "diabetes lábiles", por tener pequeñas cantidades de Glucagón, presentan gran fluctuación en el nivel de azúcar sanguíneo después de la administración de alimentos y de insulina. Por eso, en estos diabéticos lábiles cabe la posibilidad de tratarlos con Glucagón, como ha sido

realizado en estas experiencias de PINCUS (1950). KIRTLEY, WAIFE y PECK (1953) han visto cómo por la administración intravenosa de una solución diluida de FHG a sujetos normales y diabéticos se producen diferentes tipos de respuesta en cuanto a los niveles de azúcar en sangre y P inorgánico en suero. Los sujetos normales reaccionan igual que si se les diese glucosa. Los diabéticos estables insulín-insensibles, muestran una prolongada elevación de la glucemia y una disminución en el P inorgánico. Los diabéticos inestables insulín-insensibles reaccionan en cambio de otra manera: responden con una menor elevación de la glucemia, que baja a su valor inicial después de los primeros sesenta minutos, y el P inorgánico se comporta de una manera parecida a como lo hace en los sujetos normales.

En ciertas condiciones experimentales el Glucagón puede impedir la hipoglucemia causada por la insulina. DE DUVE, HERS y BOUCKAERT (1946) han demostrado que cuando el Glucagón se añade a la solución de glucosa que se infunde en conejos que han recibido una gran dosis de insulina (30 unidades) la cantidad de glucosa necesaria por unidad de tiempo para mantener en un valor normal la glucemia es menor que la que se necesitaría si no hubiese administrado el FHG. Las experiencias de ROOT, ELLIS y STAUB (1954) en conejos y en ratones a los que se administra Glucagón junto con insulina en la proporción de 1:100 y 1:10, respectivamente, demuestran que no se influencia el descenso de la glucemia producido por la insulina con la administración simultánea de Glucagón, que tampoco altera la potencia de una preparación de insulina estudiada sobre el test de convulsiones en ratón.

En cuanto a otras posibilidades terapéuticas del Glucagón, se ha intentado su empleo en la enfermedad glucogénica del hígado de Von Gierke. HUBLE (1954) ha empleado el FHG en un caso sin éxito, ya que la inyección intravenosa del Glucagón no elevó el nivel de la glucosa sanguínea. MAC QUARRIE, BELL, ZIMMERMANN y WRIGHT (1950) han publicado un caso de hipoglucemia familiar, asociada con una total o casi total ausencia de células alfa en los islotes pancreáticos, proceso en el que podría haber estado indicado el empleo del Glucagón y que respondió sin embargo a la medicación por ACTH.

CONCLUSIONES.

1. Hasta la fecha se conocen del Glucagón, o factor hiperglucemiante-glucogenolítico del páncreas (FHG), algunas de sus propiedades físicas, químicas, biológicas y fisiológicas.
2. Se interpreta su mecanismo bioquímico de actuación a través de su acción sobre la glucogenólisis hepática, activando la acción de la fosforilasa.
3. Se da como casi segura su producción por las células alfa de los islotes de Langerhans del páncreas, aunque también sea posible su formación extrapancreática.
4. Todavía no se conoce con exactitud el mecanismo de acción sobre la glucemia.
5. Tampoco poseemos datos exactos acerca de su relación con las alteraciones metabólicas de la diabetes.

BIBLIOGRAFIA

- ABEL, J. J.—Proc. Nat. Acad. Sci., 12, 132, 1926.
 ABRAMSON, D. I.—"Vascular Responses in the extremities of man in health and disease", Univ. of Chicago Press, Chicago, 3, 1944.
 ALBAUM, H. G., HIRSCHFELD, A. y SOBEL, A. E.—Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 79, 682, 1952.
 ANDERSON, E. y LONG, J. A.—Endocrinology, 40, 98, 1947.
 ASHBY, J. S.—Am. J. Physiol., 67, 77, 1923.
 BELFANTI, S.—Cit. CHOAY.
 BENARD, H.—"Problemes actuels de biologie generale et de pathologie experimentale", Paris, 1939.
 BENNET, L. L. y EVANS, H. M.—En el libro "The Hormones", de G. PINCUS y K. V. THIMANN, Academic Press, Inc., New York, 1950.
 BENSLEY, S. H. y WOERNER, C. A.—Anat. Rec., 72, 413, 1938.
 BEST, C. H.—"Diabetes", 1, 157, 1952.
 BLANCO-SOLER y PALLARDO,—"La diabetes mellitus", Madrid, 1943.
 BLIXENKRÖNE-MÖLLER, N.—Z. Physiol. Chem., 252, 117, 1938.
 BOCKMÜLLER y REHLING,—Cit. STEIGERWALD, 1954.
 EORNSTEIN, J., REID, E. y YOUNG, F. G.—Nature, 168, 903, 1951.
 BRIDGE, E. M.—Johns Hopk. Bull., 62, 408, 1938.
 BURGER, M. y KRAMER, H.—Z. Ges. Expt. Med., 65, 487, 1929 (a).
 BURGER, M. y KRAMER, H.—Z. Ges. Expt. Med., 67, 441, 1929 (b).
 BURGER, M. y KRAMER, H.—Z. Ges. Expt. Med., 69, 57, 1930 (a).
 BURGER, M. y KRAMER, H.—Arch. Expt. Path. Pharm., 156, 1, 1930 (b).
 BURGER, M. y BRANDT, W.—Zeits. f. d. Expt. Med., 96, 375, 1935.
 BURGER, M.—Fortschr. Diagn. Therap., 1, 7, 1950.
 CANDELA, J. L. R., GONZÁLEZ, P. M., CALDEIRO, M. R. y GONZÁLEZ, P.—Inst. Nac. Cienc. Med., 9, 89, 1947.
 CANDELA, J. L. R., TAMARIT, J., CANDELA, H. R. y CRISTEN-SEN-KÖNIG, W.—Arch. Med. Expt., 14, 11, 1951.
 CANDELA, J. L. R.—Jour. Clin. Endocr. and Metab., 12, 245, 1952.
 CANDELA, J. L. R., TAMARIT, J., CANDELA, H. R. y CRISTEN-SEN-KÖNIG, W.—Arch. Med. Expt., 15, 91, 1952.
 CARBALLEIRA, A., ELDRICK, H., MACKENZIE, K. R. y BROWN, J. S. L.—Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 81, 15, 1951.
 CAVALIERO, C. y MALANDRA, B.—Boll. Soc. Ital. Bio. Sper., 25, 87, 1949.
 CAVALIERO, C. y MALANDRA, B.—Arch. Sci. Biol. Napoli, 34, 138, 1950.
 CAVALIERO, C. y MOSCA, L.—Jour. Path. and Bact., 66, 147, 1953.
 CHOAY, A.—"Le secretion interne du pancreas et l'insuline", Paris, 1926.
 CLOUGH, H. D., STOKES, A. M., GIBBS, C. B. F., STONE, N. C. y MURLIN, J. R.—J. Biol. Chem., 55, 30, 1923.
 CLOUGH, H. D., ALLEN, R. S. y ROOT, E. N.—Am. J. Physiol., 66, 461, 1923.
 COLLENS, W. S. y MURLIN, J. R.—Proc. Exp. Biol. and Med., 26, 485, 1929.
 CORI, C. F.—Conferencia I Congreso Intern. Bioquímica, 1949.
 DE DUVE, C., HERS, H. G. y BOUCKAERT, J. P.—Arch. Intern. Pharmacodyn., 72, 45, 1946.
 DE DUVE, CH.—Rev. Med. Liege, 6, 258, 1951 (a).
 DE DUVE, CH.—Acta Physiol. Pharm. Neerl., 2, 302, 1951 (b).
 DE DUVE, CH.—Congreso de la Federación Internacional de Diabetes, 1952.
 DE DUVE, CH.—Lancet, 2, 99, 1953.
 DOHAN, F. C., FISH, C. A. y LUKENS, F. D. W.—Endocrinology, 28, 341, 1941.
 ELDRICK, H.—Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 82, 76, 1952.
 ELLIS, S., ANDERSON, H. L. Jr. y TURTLE, M. A.—Jour. Pharm. Expt. Therap., 106, 383, 1952.
 ELLIS, S., ANDERSON, H. L. Jr. y COLLINS, M. C.—Jour. Pharm. Expt. Therap., 110, 16, 1954.
 EVANS, G.—Amer. J. Physiol., 134, 798, 1941.
 FERNER, H. y STÖCKENIUS, W. Jr.—Zeitschr. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 35, 147, 1951.
 FERNER, H.—"Das Inselsystem of Langerhans des Pankreas. Entwicklung, Histobiologie und Pathologie mit besonderer Berücksichtigung des diabetes mellitus", Ed. Georg Thieme, Stuttgart, 1952.
 FIESSINGER, N., BENARD, H., HERRAIN, M. y DERMER, L.—C. R. Soc. Biol., 122, 32, 1936.
 FIESSINGER, N. y BARRELLER, G.—C. R. Soc. Biol., 124, 952, 1937.
 FISHER, N. F.—Amer. J. Physiol., 67, 57, 1923.
 FOA, P. P., WEINSTEIN, H. R. y SMITH, J. A.—Amer. J. Physiol., 157, 197, 1949.
 FOA, P. P., SANTAMARÍA, L., WEINSTEIN, H. R., BERGER, S. y SMITH, J. A.—Amer. J. Physiol., 171, 32, 1952 (a).
 FOA, P. P., SANTAMARÍA, L., BERGER, S., SMITH, J. A. y WEINSTEIN, H. R.—Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 80, 635, 1952 (b).
 FOA, P. P. y cols.—Science, 117, 82, 1953 (a).
 FOA, P. P., MAGID, E. B., GLASSMAN y WEINSTEIN, H. R.—Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 83, 758, 1953 (b).
 FODDEN, J. H.—Amer. Jour. Clin. Pathol., 23, 994, 1953 (a).
 FODDEN, J. H.—Amer. Jour. Clin. Pathol., 23, 1002, 1953 (b).
 GADE, K., FERNER, H. y KASTRUP, H.—Klin. Wschr., 28, 388, 1950.

- GASTON, E. A.—New Engl. J. Med., 238, 345, 1948.
- GEILING, E. M. K. y DE LAUDNER, A. M.—J. Pharmacol., 39, 369, 1930.
- GESCHWIND, I. I. y STAUB, A.—Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 84, 244, 1953.
- GIBBS, C. B. F., ROOT, E. W. y MURLIN, J. R.—IX Congreso Internacional de Fisiología, Edimburgo, 1923.
- GOLDNER, M. y CLARK, D. E.—J. Clin. Endocrinol., 4, 194, 1944.
- GOLDNER, M. G., VOLK, B. W. y LAZARUS, S. S.—Metabolism, 1, 544, 1952.
- GOLDNER, M. G., VOLK, B. W. y LAZARUS, S. S.—Jour. Clin. Endocrin. and Metab., 14, 184, 1954.
- GRANDE COVIAN, F.—Medicamenta, Edic. Farm., 5, 183, 1953.
- GREENBERG, D. y COPP, H. D.—J. Biol. Chem., 147, 749, 1943.
- GREVENSTUCK, A. y LAQUEUER, E.—“Insulin”, München, 1925.
- GUTMAN, A. B. y GUTMAN, E. B.—Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 48, 687, 1941.
- GUTMAN, A. B.—Bull. Hosp. Joint. Disease, 12, 74, 1951.
- HARRIS, H. A.—Nature, 130, 996, 1932.
- HARROW, B., MAZUR, A., CHAMELIN, I. M. y LESUK, A.—Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 34, 688, 1936.
- HAUGGARD, E. S. y STADIE, W. C.—J. Biol. Chem., 200, 753, 1953.
- HAUGGARD, E. S. y HAUGGARD, N.—J. Biol. Chem., 206, 641, 1954.
- HEARD, R. H. D., LOZINSKI, E., STEWARD, L. y STEWARD, R. D.—J. Biol. Chem., 172, 857, 1948.
- HEARD, R. H. D., LOZINSKI, E., STEWARD, L. y STEWARD, R. D.—J. Biol. Chem., 172, 987, 1950.
- HOUSSAY, B. A. y BIASOTTI, A.—Rev. Soc. Arg. Biol., 6, 8, 1930 (a).
- HOUSSAY, B. A. y BIASOTTI, A.—C. R. Soc. Biol., 104, 407, 1930 (b).
- HOUSSAY, B. A. y FOGLIA, V. G.—Rev. Soc. Arg. Biol., 4, 859, 1938.
- HOUSSAY, B. A. y FOGLIA, V. G.—Rev. Soc. Arg. Biol., 20, 247, 1944.
- HUBBLE DOUGLAS.—Lancet, 1, 235, 1954.
- INGLE, D. J., NEZAMIS, J. E. y HUMPHLEY, L. M.—Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 84, 232, 1953.
- INGLE, D. J., BEARY, D. F. y PUMARIS, A.—Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 85, 432, 1954.
- IONESCO.—Cit. Plichet, 1953.
- JORDAN, P.—Z. Zellforsch. u. Mikrosk. Anat., 6, 558, 1927-1928.
- KAZAL, L. A., SPICER, D. S. y BRAHINSKY, R. A.—J. Am. Chem. Soc., 70, 3,034, 1948.
- KAZAL, L. A., WOOLFE, E. K., SPICER, D. S. y BARNES, R. H.—Proc. Soc. Exp. Med. and Biol., 74, 8, 1950.
- KIMBALL, C. P. y MURLIN, J. R.—J. Biol. Chem., 58, 337, 1924.
- KIRLEY, W. R., WAIFE, S. O. y PECK, F. B.—Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 83, 387, 1953.
- LAGUESSE, E.—Rev. Franc. D'Endocrinologie, 1, 281, 1923.
- LAZARUS, S. S., GOLDNER, M. G. y VOLK, B. W.—Metabolism, 2, 513, 1953.
- LOURE, S. D., CAMPBELL, E. D. y MIRSKY, I. A.—Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 75, 161, 1950.
- LUNDGAARD, E., NIELSEN, N. A. y ORSKOV, S. L.—Skand. Arch. Physiol., 81, 11, 1939.
- MARKS, H. P., y YOUNG, F. G.—J. Endocrinol., 1, 470, 1939.
- MALANDRA, B. y CAVALLEIRO, C.—Rass. Fisiop. Clin. Terap., 22, 1, 1950.
- MAC QUARRIE, I., BELL, E. T., ZIMMERMANN, B. y WRIGHT, W. S.—Fed. Proc., 9, 337, 1950.
- MEDUNA, L. J. y MAC CULLOCH, W. S.—M. Clin. North América, 29, 147, 1945.
- MEDUNA, L. J. y VAICHULIS, J. A.—Dis. Nerv. System, 9, 248, 1948.
- MEDUNA, L. J.—“Oneirophrenia”. The University of Illinois Pres., Urbana, 1950.
- MERCKLEN, F. P.—“Les diabetes experimentaux”. Vigot Freres, edit.
- MIRSKY, I. A., FUTTERMANN, P., WACHMANN y PERISUTTI, G.—Endocrinology, 49, 72, 1951.
- MORGAN, M. S. y PILGRIM, F. J.—Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 79, 106, 1951.
- MURLIN, J. R., CLOUGH, H. D., GIBBS, C. B. F. y STOKES, A. M.—J. Biol. Chem., 56, 252, 1923.
- NIELSEN, N. A.—“Om Insulins Virkemaade”. Copenhagen, 1935.
- OLSEN, N. S. y KLEIN, J. R.—Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 66, 86, 1947.
- PINCUS, I. J.—J. Clin. Endocrinol., 10, 556, 1950.
- PINCUS, I. J.—Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 74, 377, 1950.
- PINCUS, I. J. y RUTMAN, J. Z.—Arch. Int. Med., 92, 666, 1953.
- PLICHET, A.—Presse Méd., 61, 1,022, 1953.
- RATHERY, KOURILSKY y LAURENT.—Cit. Plichet, 1953.
- ROCKEY, E. W.—Ann. Surg., 118, 603, 1943.
- ROMANS, R. G., SCOTT, D. A. y FISHER, A. M.—Ind. Eng. Chem., 32, 908, 1940.
- ROOT, M. A., ELLIS, J. y STAUB, A.—Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 85, 507, 1954.
- SAKA M. OSMAN.—Amer. J. Physiol., 171, 401, 1952.
- SALTER, J. y BEST, C. H.—Fed. Proc., 12, 122, 1953.
- SCOTT, D. A.—Biochem. J., 28, 1,592, 1934.
- SHYPLEY, R. A. y HUMEL, E. J. Jr.—Amer. J. Physiol., 144, 51, 1945.
- SOSKIN, S. y LEVINE, R.—“Carbohydrate Metabolism”. Univ. of Chicago Press. Rev. Ed., 209, 1952.
- STAUB, A., SINN, L. y BEHRENS, O. K.—Science, 117, 628, 1953.
- STEIGERWALD, H.—Arzneimittelforschung, 4, 408, 1954.
- SUTHERLAND, E. W. y CORI, C. F.—J. Biol. Chem., 172, 737, 1948.
- SUTHERLAND, E. W. y DE DUVE CH.—J. Biol. Chem., 175, 663, 1948.
- SUTHERLAND, E. W.—Recent. Progr. Hormone Research, 5, 441, 1950.
- SUTHERLAND, E. W., HAYNES, R. y OLSEN, N. S.—J. Biol. Chem., 180, 825, 1950.
- SUTHERLAND, E. W.—“Phosphorus metabolism”, 53. Baltimore, 1951 (a).
- SUTHERLAND, E. W.—Ann. N. York Acad. Sci., 54, 693, 1951 (b).
- SUTHERLAND, E. W. y CORI, C. F.—J. Biol. Chem., 188, 531, 1951.
- THOROGOOD, E. y ZIMMERMANN, B.—Endocrinology, 37, 191, 1945.
- TYBERHEIN, J.—Arch. Intern. Physiol., 60, 105, 1952.
- VAN ABEELE, F. R. y CAMPBELL, E. D.—Fed. Proc., 10, 263, 1951.
- VAN CAMPENHOUT, E. y CORNELIS, G.—C. R. Soc. Biol., 145, 933, 1951 (a).
- VAN CAMPENHOUT, E. y CORNELIS, G.—Acad. Med. Belg., 16, 382, 1951 (b).
- VOLK, B. W., LAZARUS, S. S. y GOLDNER, M. G.—Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 82, 406, 1953.
- VUYLESTECKE, C. A., DE DUVE, CH. y NYS, A.—Arch. Intern. Physiol., 57, 445, 1950.
- VUYLESTECKE, C. A., CORNELIS, G. y DE DUVE, CH.—Arch. Intern. Physiol., 60, 105, 1951.
- VUYLESTECKE, C. A. y DE DUVE, CH.—Arch. Intern. Physiol., 61, 107, 1953.
- WATERS, E. T.—Bull. N. York Acad. Med., 25, 32, 1949.
- WAUGH, D. F.—J. Am. Chem. Soc., 68, 247, 1946.
- WEISBERG, H. F., CAREN, R., HUDDLESTON, B. y LEVINE, R.—Amer. J. Physiol., 159, 98, 1949.
- WEISBERG, H. F. y SCHAEFER, G. L.—Amer. Jour. Clin. Path., 22, 1,169, 1952.
- YOUNG, F. G.—Acta Med. Skand., 135, 275, 1949.
- ZIMMERMANN, B. y DONOVAN, T. J.—Amer. J. Physiol., 153, 197, 1948.