

Nicanor Letti

— Bolsista do Laboratório Roche —
— Monitor de ensino de Fisiologia —

**Ação da hipófise, pâncreas e fígado sôbre a glicemia e o
glicogênio na tartaruga "Phrynops Hilarii" sob a influência
de injeção contínua de glicose.**

Comissão:

Prof. Paulo Tibiriçá
Prof. Carlos de Britto Velho
Prof. Carlos Candal dos Santos
Prof. Pery Riet Côrrea
Prof. José Martins Job

TÉSE DE DOUTORAMENTO

Aprovada com grau 8.

L 651 a

988

MED
T
QU75 L551u 1958

05300270

[000146501] Letti, Nicanor. Acao da hipofise, pancreas e figado sobre a glicemia e glicogenio da tartaruga phrynops hilarii sob a influencia de injeçao continua de glicose. 1958. 55 p. : il.

A

Minha noiva

PREÂMBULO

O estudo da fisiologia dos hidratos de carbono passa, nos últimos anos, por enorme transformação, pois enquanto se esclarecem as funções desconhecidas dos hormônios pancreáticos, os isótopos radioativos permitem acompanhar a glicose em seus caminhos metabólicos, precisando com exatidão os locais de ação destes hormônios e no sistema enzimático correlato.

Desde que se conseguiu uma molécula de insulina radioativa, foi estudada a sua degradação e acompanhada pormenorizadamente o seu percurso no organismo e, por outro lado, o glucagônio produto das células alfa do pâncreas está sendo exaustivamente estudado nos laboratórios experimentais do mundo inteiro.

Neste mesmo assunto, inúmeros são os trabalhos publicados e em andamento; o Instituto de Fisiologia Experimental também possui um grupo de investigadores que se dedica ao problema da fisiologia dos hidratos de carbono e ao do diabetes. Pertencendo a este grupo, como monitor de ensino, tivemos ocasião de realizar este modesto trabalho que estuda a **influência da hipófise e do pâncreas** em animais sujeitos a injeção contínua de glicose.

Agradecemos de modo especial ao Dr. Moisset y Espanés, diretor do Instituto de Investigação Mercedes y Martín Ferrera de Córdoba na Argentina que foi o **inspirador deste trabalho**, quando de sua estada em nosso meio como colaborador no acordo firmado com o grupo do Prof. Houssay.

Ao Prof. Riet Corrêa, diretor do Instituto de Fisiologia que com seu empenho e dedicação tornou possível o término dêste trabalho. Pelos seus conselhos e orientação agradecemos aos Drs. Edgar M. Wagner, Eduardo Krieger, Joaquim Osório e Jaime Schling.

Ao técnico Sr. Pedro Santos e a desenhista Srta. Helena Henke, nossa gratidão pela sua boa vontade e capacidade postos em relêvo na execução dêste trabalho.

O autor.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradecemos ao Prof. Elyseu Paglioli, Reitor Magnífico da U.R.G.S., que permitiu e patrocinou a impressão gratuita dêste trabalho na Imprensa Universitária, sem cujo auxílio seria impossível sua publicação.

O Autor

AÇÃO DA HIPÓFISE, PÂNCREAS E FÍGADO SÔBRE A GLICEMIA E O GLICOGÊNIO NA TARTARUGA "PHRYNOPS HILARII" SOB A INFLUÊNCIA DE INJEÇÃO CONTÍNUA DE GLICOSE.

INTRODUÇÃO

Em 1945, Riet Corrêa (1) utilizando injeção intermitente de glicose hipertônica em sapos *Bufo Arenarum* Hensel, verificou que o glicogênio hepático após a administração de glicose, estava muito mais baixo do que antes, enquanto a hipofisectomia sensibilizava êstes animais que vinham a morrer com concentração menor que aquela necessária para matar os testemunhos. A queda do glicogênio não se mostrou significativa entre os animais normais e hipofisoprivos.

Houssay, Martinez e Cardeza (2), em 1947 com injeções peitoneais de glicose preveniram o diabete no rato pancreatoprivo parcial, tendo verificado hipertrofia das ilhotas do pâncreas restantes.

Krahl e Park (3), em 1948, trabalhando com a preparação de Gemmil (4) verificaram em diafragmas de rãos que o "uptake" de glicose era muito maior no grupo hipofisoprivo que no grupo normal.

Também Houssay e Rietti (5), em 1950, demonstraram que a injeção endovenosa de glicose em sapos não aumenta o glicogênio hepático e muscular, aconselhando a repetição da experiência com isótopos radioativos.

Perlmutter e Greep (6), em 1948, estudando "in vitro"

a ação da insulina sobre a utilização da glicose, concluíram ser maior nos ratos hipofisoprivos do que nos normais.

Em 1954, Lundsgaard (7) verificou que não existe diferença na quantidade de glicose captada pelo fígado sob a ação da insulina entre os animais normais, hepatectomizados e eviscerados.

Finalmente, De Duve (8), em 1956, não encontrou em cães os mesmos resultados de Lundsgaard que trabalhara com gatos; depois de analisar criticamente ambos os trabalhos, De Duve conclui que os resultados diferentes se verificaram em consequência da anestesia empregada e da espécie animal.

O presente trabalho tem por finalidade estudar a evolução da glicemia durante a injeção contínua de glicose e a deposição de glicogênio no músculo, fígado e coração no fim de um certo tempo, sob a influência da hipofise, do pâncreas e do fígado.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 96 tartarugas "Phrynops Hilarii" (Fig. 1), de ambos os sexos, que estavam no viveiro do Departamento de Medicina Experimental da Faculdade de Medicina de Pôrto Alegre, alimentando-se de peixes. Os pêsos variaram de 900g até 5000g.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: normais, hipofisectomizados de 5 a 60 dias, hepatectomizados, hipófiso-hepatectomizados, pancreatectomizados; ainda temos animais craniotomizados, injetados com H₂O destilada e com ligadura dos vasos hépato-pancreáticos.

No dia anterior ao da experiência o animal era transferido para o laboratório onde era deixado numa gaiola à temperatura do ambiente e em jejum completo; vinte e quatro horas após era realizada a experiência.

A tartaruga era inicialmente pesada e após colocada numa caixa especial afim de conter os membros anteriores e a cabeça. (Fig. 2). Em seguida com uma serra elétrica realiza-

va-se uma abertura no plastrão, tendo como limites um cm na parte anterior do istmo, que une a carapaça ao plastrão, e, dois e meio cms. na parte posterior, deixando um limite lateral de cada lado de mais ou menos um cm. (Fig. 3). O plastrão assim cortado era levantado por uma de suas extremidades e destacados os músculos que tinham nele os seus pontos de inserção. Após eram identificados e ligados ambos os ureteres com ligadura simples o mais próximo possível do polo renal.

Em seguida era executada a intervenção (ver técnicas), ou somente manobras nos animais testemunhos. Terminada a cirurgia ou as manobras, era retirado o músculo da pata posterior esquerda do animal, mergulhado em KOH e levado ao banho-maria para a dosagem do glicogênio. Imediatamente após, eram preparadas as duas jugulares, sendo uma delas excisada e recolhidos 0.2 ml de sangue para a glicemia inicial e a outra conectada com um aparelho especial de injeção contínua (Fig. 2), onde estava uma solução de glicose de 10 mg/Kg/minuto (do pêso da tartaruga), sendo o tempo da injeção de 180 minutos e as amostras retiradas de trinta em trinta minutos da jugular preparada com tal finalidade.

A solução de glicose tinha um volume de 100ml. Terminada a injeção contínua era seccionado o pescoço da tartaruga com uma manobra rápida e retirado o músculo do membro posterior direito. O fígado era retirado e pesado, mergulhados junto com o coração, em KOH e levados ao banho-maria para a dosagem de glicogênio.

Dosagem da glicemia — Realizada pelo método de Somogyi e Nelson (9,10,11): Com uma pipeta colhem-se 0.2 ml de sangue diluindo-se em 3 ml de H₂O destilada, defecando em seguida com 0.4 ml de sulfato de cobre mais 0.4 ml de tungstato de cobre. Agita-se e centrifuga-se. Toma-se após 1.0 ml do sobrenadante e junta-se com 1.5 do reativo de Somogyi, agita-se e leva-se ao banho-maria fervente durante 10 min. Deixa-se esfriar e, após, junta-se 1.5 ml de reativo de Nelson, acrescenta-se 3.5 ml de H₂O destilada e lê-se no fotolorímetro com filtro 540. Compara-se os resultados com uma série de testemunhos previamente preparados.

Dosagem do glicogênio — Realizada pelo método de Pflüger (12): Tomam-se 2 a 5 g de tecido no qual se quer dosar o glicogênio mergulhando-o numa solução de KOH a 60% e

leva-se imediatamente ao banho-maria fervente durante duas horas. Após, verte-se num vaso de precipitação e trata-se com 30 ml de uma solução de álcool a 96%. Deixa-se, depois, precipitar e filtra-se, lavando o filtrado com uma solução de álcool a 96% e KOH. Filtra-se novamente e lava-se o filtrado com álcool a 66%. Coloca-se, após, num vaso com 4 ml de HCL e leva-se ao banho-maria fervente por mais três horas. Neutraliza-se com NaOH a 40% e completa-se o volume até 30 ml com H₂O. Recolhe-se 0.2 ml de cada amostra dosando a glicose pelo método de Somogyi-Nelson. Para o cálculo usamos a seguinte fórmula:

$$G = \frac{0.927 \cdot v \cdot g}{p}$$

Onde:

G = glicogênio contido no órgão

v = volume da amostra

g = glicemia

p = pêso do órgão

0.927 = coeficiente de transformação de glicogênio em glicose (14).

Unidade: mg% g de órgão.

Técnica da Hipofisectomia — Foi usada a Técnica de Wagner (13).

Técnica da Hepatectomia — Depois de aberta a janela no plastrão do animal excisávamos na linha mediana a massa muscular e gordurosa aí existente e colocávamos bem amostra o fígado. Pinçávamos e ligávamos os vasos que entram de cada lado oriundos das patas posteriores e carapaça. (Fig. 4). Após, descolávamos lentamente todo o bordo esquerdo do fígado pinçando e ligando os vasos até encontrar a região do cárdias, neste ponto penetra um vaso que ligávamos. Em seguida pinçávamos e ligávamos todos os vasos gastro-hepáticos.

Fazíamos as mesmas manobras do lado direito até encontrar o seio venoso. Exteriorizávamos o fígado ligando então a veia porta e o canal colédoco (Fig. 5). Elevávamos o fígado e passávamos uma ligadura conservando o lóbulo mais posterior por onde penetra a veia cava que o atravessa desembocando no seio venoso. Esta massa restante que nun-

ca foi superior a 10% da massa total do fígado não tem conexões vasculares com o resto do animal, sendo que a veia cava atravessa-o simplesmente não dando ramos, apenas recebendo alguns, que não apresentam importância alguma, como bem demonstrou Schilling (15) em nosso laboratório usando Azul de metileno.

Técnica da Pancreatectomia — Aberta a janela no plastrão e depois de excisada a massa muscular e gordurosa, um auxiliar afastava o fígado em direção à região cervical com dois afastadores Farabeuf, era então pinçado o duodeno e repuxado até os bordos da janela. Identificado o pâncreas era limitado e ligados os dois pontos do duodeno onde êle terminava. Após, era ligada a veia e artéria hepática que atravessam o pâncreas e o colédoco. Era em seguida seccionado o duodeno e retirado conjuntamente com a massa pâncreática. (Fig. 6).

Cálculos estatísticos — Afim de interpretar e analisar os resultados destas experiências, os diversos dados obtidos foram submetidos aos cálculos estabelecidos pela Estatística Aplicada à Biologia.

1. — **Média aritmética ou termo médio (TM)** — E' a relação entre a soma algébrica dos dados, e o número total dos dados em estudo. Pode-se usar, pois, para êste fim a seguinte fórmula:

$$TM = \frac{Sx}{n}$$

onde: TM = termo médio
x = dados individuais
Sx = soma dos dados individuais
n = número total de dados

2. — **Desvio padrão da média (s)** — Esta constante estatística nos dá os desvios prováveis do termo médio. Seu cálculo costuma ser realizado pela fórmula (16):

$$s = \sqrt{\frac{Sd^2}{n(n-1)}}$$

onde: s = desvio padrão da média

$$d = TM - \bar{x}$$

Sd^2 = soma dos quadrados das diferenças

n = número total de dados

Porém Mantel (17) propõe para o cálculo do desvio padrão da média, quando o número de dados for menor do que 15, uma expressão muito mais simples. Como em nossas experiências o número de animais usados em cada grupo era menor do que 15, preferimos usar a fórmula de Mantel que é a seguinte:

$$s = \frac{x_{\max} - x_{\min}}{n}$$

onde: x_{\max} = dado individual de maior valor

x_{\min} = dado individual de menor valor

n = número total de dados

3. — **Diferença significativa (t)** — A comparação entre dois resultados obtidos, em condições experimentais diferentes, é feita segundo estabelece a estatística, pelo que se chama diferença significativa. A fórmula usada foi a seguinte:

$$t = \frac{TM_1 - TM_2}{\sqrt{s_1^2 + s_2^2}}$$

onde: t = diferença

TM_1 = termo médio do primeiro grupo

TM_2 = termo médio do segundo grupo

s_1 = desvio padrão da média do primeiro grupo

s_2 = desvio padrão da média do segundo grupo

Segundo Günther (16) "t" é uma diferença estatisticamente significativa se seu valor for igual ou maior que 3, pois que neste caso as probabilidades

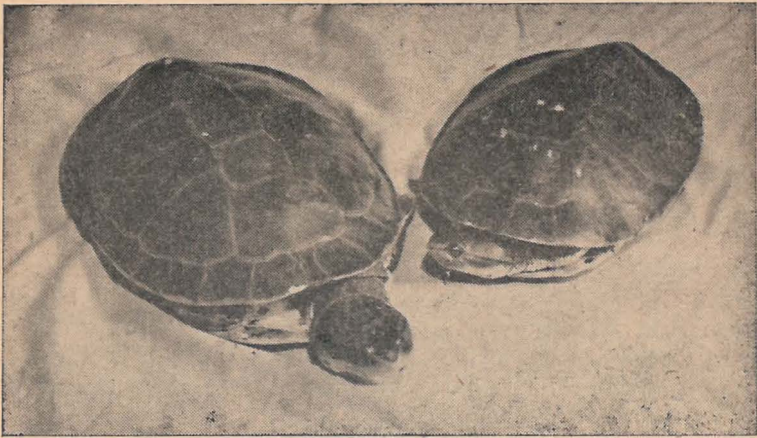


Fig. 1

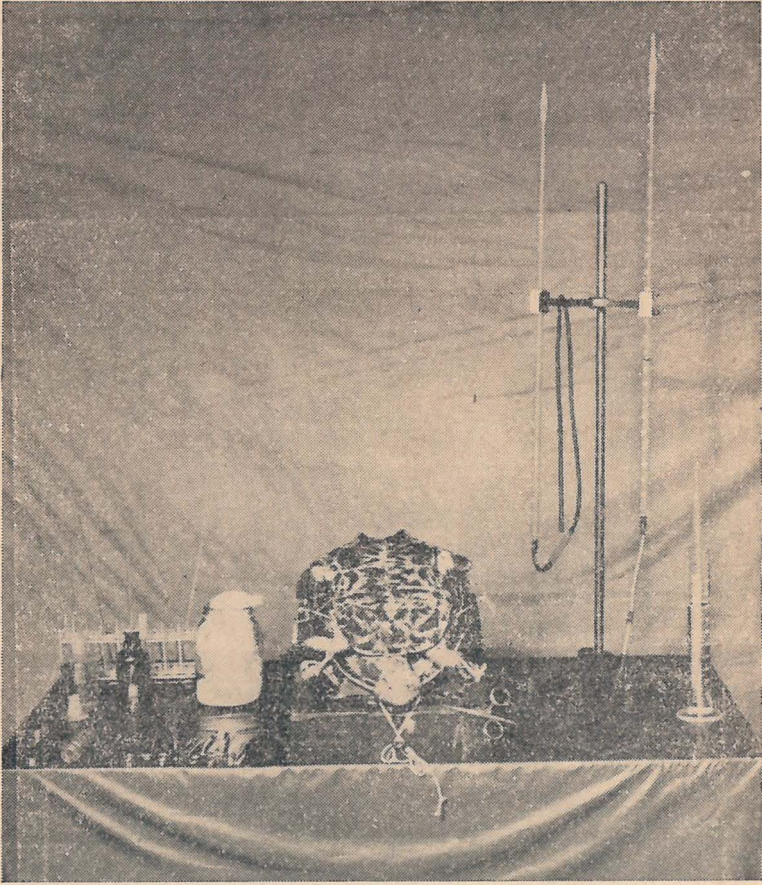


Fig. 2

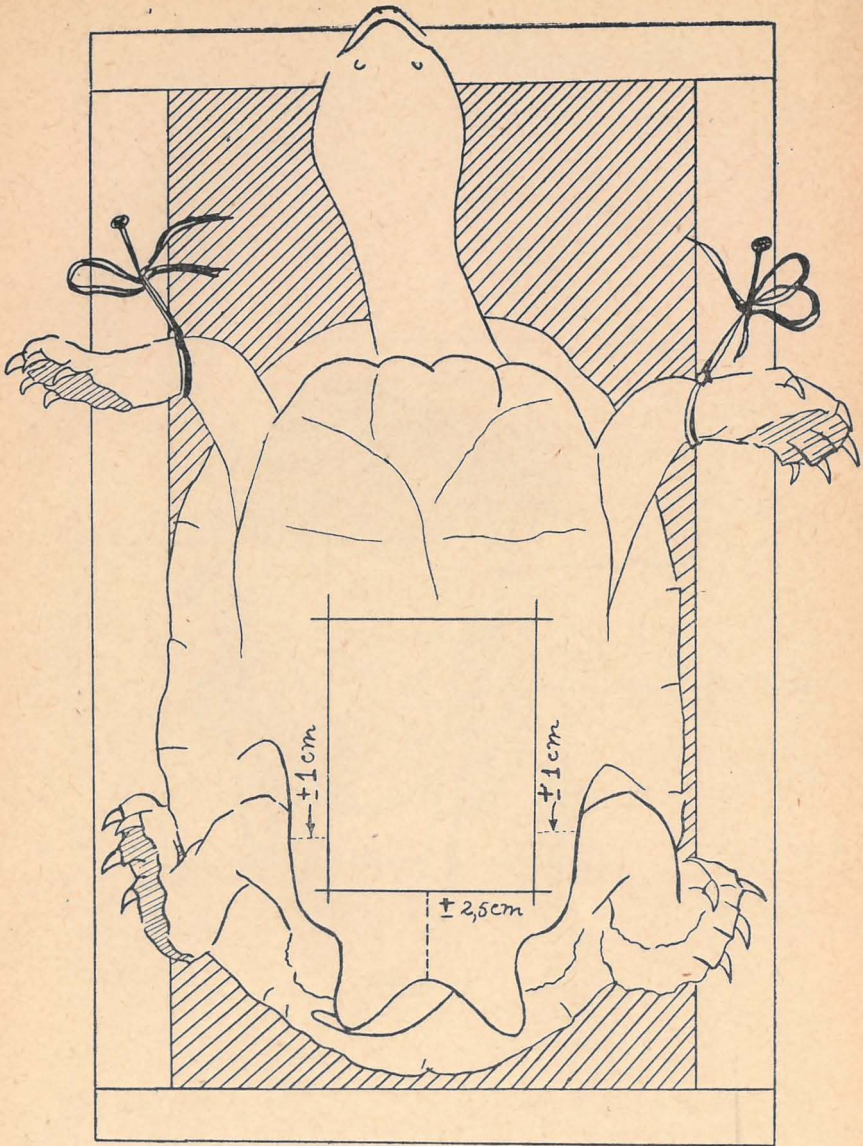


Fig. 3

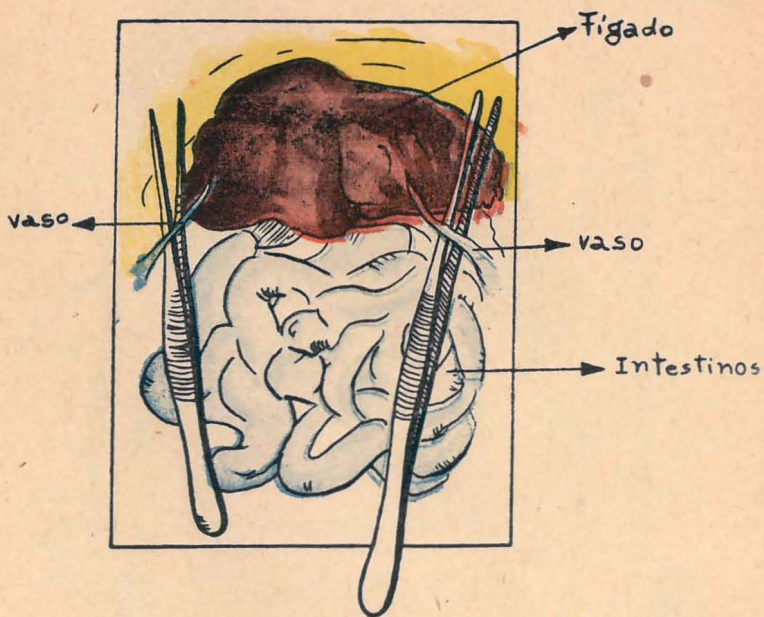


Fig. 4



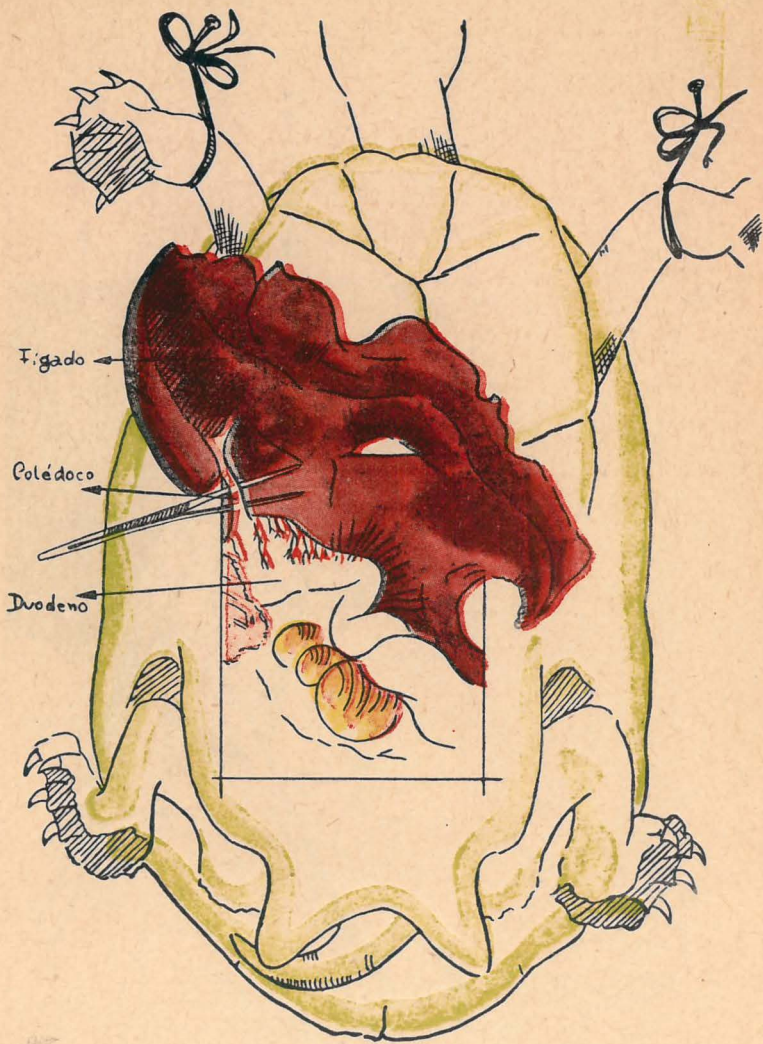


Fig. 5

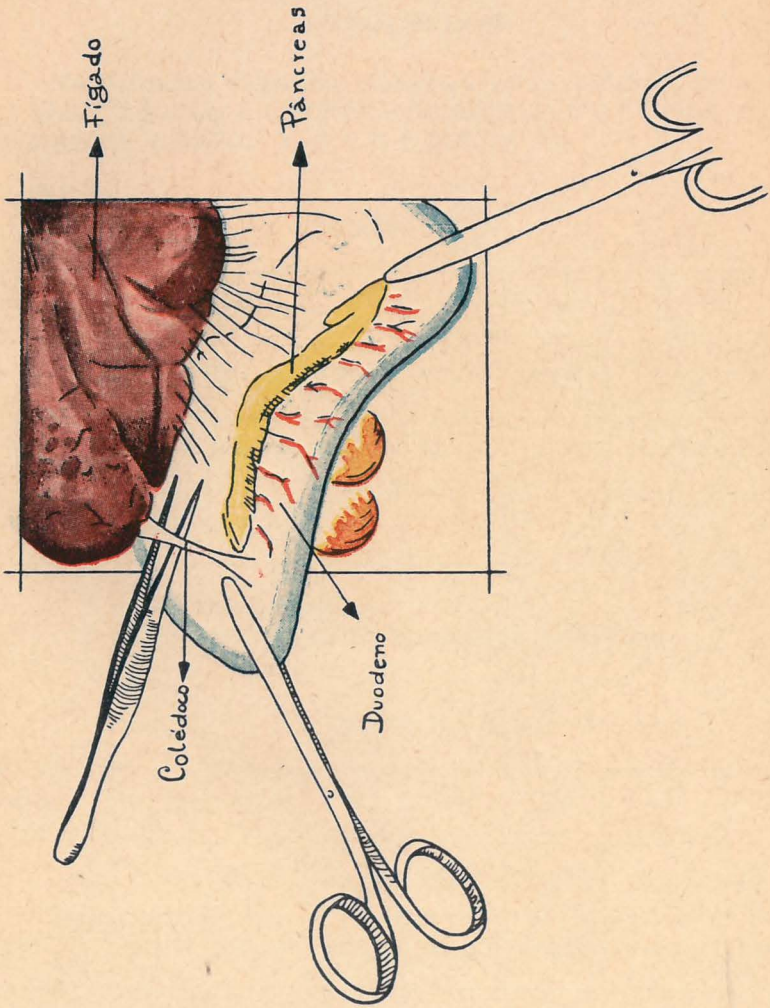


Fig. 6

de que a diferença seja real são maiores de que .. 99.7%. No caso de $t = 2$ a probabilidade é de apenas 95.4%.

RESULTADOS

Na primeira experiência comparamos animais de ambos os sexos, normais e hipofisectomizados de 5 e 60 dias respectivamente. (quadros 1, 2 e 3 e gráfico 1).

Quadro n.º 1

Animal	Nº	0'	30'	60'	90'	120'	150'	180'
N *	7	100	277 ± 63	344 ± 74	412 ± 89	438 ± 84	487 ± 72	514 ± 70
H5d.**	6	100	739 ± 120	698 ± 125	736 ± 105	740 ± 116	804 ± 139	830 ± 131
"t"	—	—	3.4	2.4	2.3	2.1	2.0	2.0

* = Animais normais

** = Animais hipofisectomizados de 5 dias.

Quadro n.º 2

Animal	Nº	0'	30'	60'	90'	120'	150'	180'
N	7	100	277 ± 63	344 ± 74	412 ± 89	438 ± 84	487 ± 72	514 ± 70
H2***	3	100	477 ± 529	783 ± 189	792 ± 384	958 ± 574	1043 ± 634	1296 ± 854
"t":	—	—	0,4	2,2	1,0	0,9	0,9	0,9

*** = Animais hipofisectomizados de 2 meses.

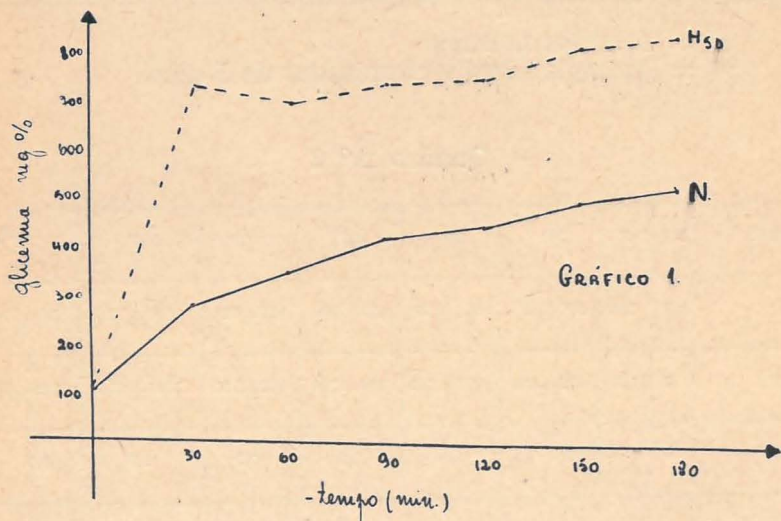
Quadro n.º 3

Animal	Nº	0'	30'	60'	90'	120'	150'	180'
H5d.**	6	100	739 ± 120	698 ± 125	736 ± 105	740 ± 116	804 ± 139	830 ± 131
H2m.***	3	100	477 ± 529	783 ± 1893	792 ± 384	958 ± 574	1043 ± 634	1296 ± 854
"t":	—	—	0,5	0,4	0,1	0,4	0,2	0,5

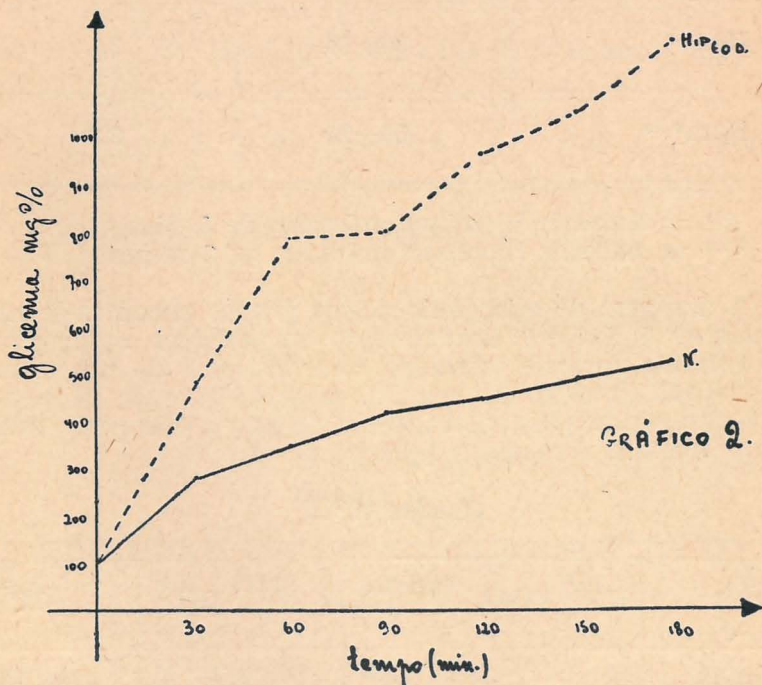
** = Animais hipofisectomizados de 5 dias.

*** = Animais hipofisectomizados de 2 meses.

A glicemia no grupo normal sobe gradativamente, enquanto que nos hipofisectomizados sobe abruptamente na primeira meia hora (gráfico 1), sendo a diferença significativa neste momento, para manter-se, após, até o fim da experiência num planalto, não sendo, então, significativa a diferença.



Nos hipofisectomizados de 60 dias a elevação não é tão abrupta como nos operados de 5 dias (Quadro n.º 2 e 3), o que se pode verificar pelo "t", no primeiro é 3.4 e no segundo 0.4, (Gráfico 2).



No quadro n.º 3 comparamos a glicemia dos animais hipofisectomizados de 5 dias e 60 dias no qual verificamos que não há diferença entre os dois grupos.

O aumento da glicemia é dado em percentagem. A glicemia inicial dos grupos pode ser vista no quadro n.º 4.

Quadro n.º 4

Animal	Glicemia	"t"
Normal	132±14	
H5d**	80±14	3,1
H2m***	56±20	3,2

** = Animais hipofisectomizados de 5 dias

*** = Animais hipofisectomizados de 2 meses

A dosagem de glicogênio destes grupos encontra-se nas tabelas n.º 5, 6, 7 e 8. Inicialmente comparamos o glicogênio dos animais normais injetados com glicose e de um grupo testemunho (quadro 5) que foi deixado durante 24 horas em jejum sendo após sacrificado e dosado o glicogênio muscular, hepático e cardíaco (quadro n.º 9).

Quadro n.º 5

Animal	Nº	GMA	GMD	GH	GC
Testemunhos	5	172±31	232±25	403±284	121±34
N. injetados	7	228±97	490±206	1154±459	188±90
"t"	—	0.5	1.2	1.4	0.7

GMA = Glicogênio muscular antes da experiência

GMD = Glicogênio muscular depois da experiência

GH = Glicogênio hepático

GC = Glicogênio cardíaco

Quadro n.º 6

Animal	Nº	GMA	GMD	GH	GC
Normais	7	288±57	490±206	1154±457	188±90
H5d*	6	234±75	343±151	842±309	135±81
“t”	—	0.05	0.6	0.6	0.4

* = Animais hipofisectomizados de 5 dias.

Quadro n.º 7

Animal	Nº	GMA	GMD	GH	GC
Normais	7	228±57	490±206	1154±457	188±90
H 2m	3	103±27	20±15	144±62	31±10
“t”	—	1.2	2.3	2.2	1.7

Quadro n.º 8

Animal	Nº	GMA	GMD	GH	GC
H 5d	6	234±75	343±151	842±309	135±81
H 2m	3	103±27	20±15	144±62	31±10
"t"	—	1.6	2.1	2.2	1.3

Quadro n.º 9

Nº	Pêso	Glicemia	GH	GC	GM*
5	1530±1350	62±29	403±284	121±34	172±31

* GM = Glicogênio muscular

Como testemunho do glicogênio muscular depois da injeção contínua de glicose (GMD) foi utilizado um outro grupo injetado com água destilada e nas mesmas condições experimentais que todos os outros animais (quadro n.º 10 e 11).

Quadro n.º 10

Animal	Nº	0'	30'	60'	90'	120'	150'	180'
Normais	6	132±14	338±51	420±59	512±69	536±64	590±47	689±39
c/H2O	3	70±23	80±13	57±41	93±16	55±20	74±65	105±70
"t":	—	2.3	4.9	5.0	5.0	7.2	6.5	9.8

Quadro n.º 11

Animal	Nº	GMA	GMD	GH	GC
Normal	6	228±97	490±206	1154±457	188±90
c/H ₂ O	3	956±297	232±25	1050±360	178±115
“t”	—	2.3	1.2	0.2	0.1

Enquanto que a glicemia do grupo injetado com água destilada permanece até o fim da experiência sem diferença com o nível inicial, no grupo injetado com glicose sobe gradativamente, sendo significativa a diferença entre os grupos a partir da primeira meia hora de injeção contínua. O glicogênio não sofre alteração como pode ser visto no quadro n.º 11, o mesmo acontece com os grupos hipofisectomizados de 5 e 60 dias como se pode verificar nos quadros n.º 6 e 7.

O grupo craniotomizado testemunho comporta-se como o normal (Quadro n.º 12 e 13).

Quadro n.º 12

Animal	Nº	0'	30'	60'	90'	120'	150'	180'
Normal	7	132 ± 14	338 ± 51	420 ± 59	512 ± 69	536 ± 64	590 ± 47	698 ± 39
Ct*	2	57 ± 5	162 ± 55	235 ± 40	322 ± 85	380 ± 10	402 ± 5	455 ± 30
“t”:	—							

Ct * = Craniotomizados

Quadro n.º 13

Animal	Nº	GMA	GMD	GH	GC
Normal	7	228±97	490±206	1154±457	188±90
Ct	2	465±93	44±88	257±110	275±40
“t”	—				

Na segunda experiência comparamos a ação da hepatectomia e hipófise-hepatectomia sobre a glicemia e o glicogênio.

No primeiro grupo verificamos (quadro n.º 14 e gráfico 4) que já na primeira meia hora há uma elevação maior da glicemia nos hepatectomizados comparados com os normais, não sendo significativa a diferença. A hipofisectomia de 5 dias não tem efeito algum sobre os resultados da hepatectomia, como podemos verificar no quadro 15. E ambos os grupos hepatectomizados e hipófise-hepatectomizados se evidenciam. (quadro 16).

Quadro n.º 14

Animal	Nº	0'	30'	60'	90'	120'	150'	180'
Normais	7	100	277±63	344±74	412±89	438±84	487±72	514±70
Hp*	7	100	592±108	619±82	677±89	714±90	708±86	801±92
“t”	—	—	2.5	2.5	2.1	2.2	2.0	2.5

Hp* = Hepatectomizados

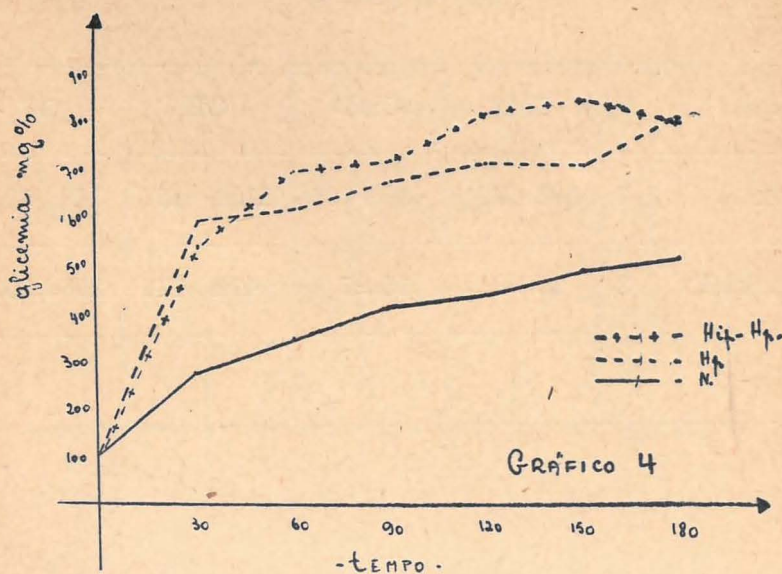
Quadro n.º 15

Animal	Nº	0'	30'	60'	90'	120'	150'	180'
Normais	7	100	277 ± 63	344 ± 74	412 ± 89	438 ± 84	487 ± 72	514 ± 70
H. H. 5d.*	6	100	540 ± 182	694 ± 161	718 ± 155	816 ± 172	849 ± 168	802 ± 188
"t"	—	—	1.7	2.0	1.7	1.9	2.0	1.4

* = Animais Hipofiso-hepatectomizados

Quadro n.º 16

Animal	Nº	0'	30'	60'	90'	120'	150'	180'
Hep.	7	100	592 ± 108	619 ± 82	677 ± 89	714 ± 90	708 ± 86	801 ± 92
H.H	6	100	540 ± 182	694 ± 161	718 ± 155	816 ± 172	849 ± 168	802 ± 188
"t"	—	—	0.2	0.4	0.2	0.5	0.7	0.005



O grupo testemunho era constituído de animais nos quais se ligaram todos os vasos hépato-pancreáticos, pois esta região   ricamente vascularizada, parecendo até que todo o sangue drena do pâncreas em dire o ao fígado. O resultado pode ser visto no quadro 17 e 18. A glicemia inicial dêstes animais pode ser vista no quadro 19.

Quadro n.é 17

Animal	N�	0'	30''	60'	90'	120'	150'	180'
Normal	7	100	277 \pm 63	344 \pm 74	412 \pm 89	438 \pm 84	477 \pm 72	514 \pm 70
Lig. VHP	2	100	241 \pm 82	540 \pm 267	257 \pm 75	306 \pm 101	364 \pm 364	424 \pm 425
"t"	—	—						

Quadro n.é 18

Animal	N�	GMA	GMD	GH	GC
Normal	7	288 \pm 97	490 \pm 206	1154 \pm 457	188 \pm 90
Lig. VHP	2	39 \pm 8	15 \pm 7	472 \pm 174	256 \pm 303
"t"	—				

Quadro n.º 19

Animal	Glicemia	"t"
Normal	132±14	—
Hepatectom.	100±22	1.2
Hipof.-Hep.	74±9	3.6

O glicogênio destes dois grupos (quadros 20, 21 e 22) também não apresenta diferença com o grupo normal, possivelmente devido à grande variação do grupo normal (E.S. 206 e 90) embora nos animais normais o desvio padrão da média não ser grande (E.S. 25 e 44).

Quadro n.º 20

Animal	Nº	GMA	GMD	GH	GC
Normal	7	228±97	490±206	1154±457	188±90
Hep.	7	202±83	95±25	—	83±44
"t"	—	0.2	1.9	—	1.0

Quadro n.º 21

Animal	Nº	GMA	GMD	GH	GC
Normal	7	228±97	490±206	1154±457	188±90
Hip. - Hep.	6	296±89	66±18	—	60±13
“t”	—	0.5	2.1	—	1.4

Quadro n.º 22

Animal	Nº	GMA	GMD	GH	GC
Hep.	7	202±83	95±25	—	83±44
Hipof.-Hep.	6	296±89	66±18	—	60±13
“t”	—	0.8	1.0	—	0.5

Podemos verificar no quadro 23 a correspondência percentual entre massa corporal total e peso do fígado; a hepatectomia corresponde, portanto, a uma retirada de mais ou menos 10% da massa corporal total.

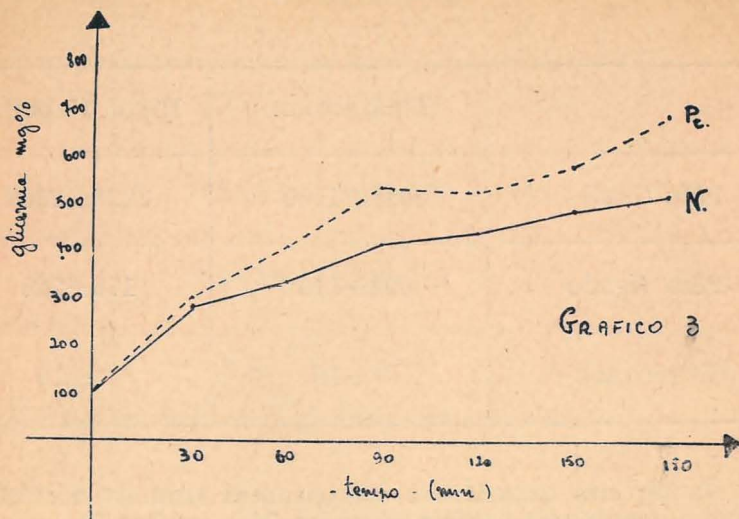
Quadro n.º 23

	Hepatectom.	Hipof. Hepatect.
Pêso total	2016±1100	3225±2650
Pêso fígado	692±110	170±240
% retirado	±10	±10

Na terceira experiência comparamos animais normais e pancreatectomizados totais (Quadro 24 e gráfico 3).

Quadro n.º 24

Animal	Nº	0'	30'	60'	90'	120'	150'	180'
Normal	7	100	277 ± 63	344 ± 74	412 ± 89	438 ± 84	487 ± 72	514 ± 70
Pancreat.	6	100	293 ± 54	405 ± 64	535 ± 58	525 ± 59	576 ± 61	686 ± 54
"t"	—	—	0.2	0.6	1.2	0.8	0.9	1.9



Observando o quadro e o gráfico verificamos que a evolução da glicemia é perfeitamente idêntica não só pela curva de elevação glicêmica como também o teste de significância é baixo em todas as tomadas.

O glicogênio deste grupo também não apresenta diferença com os normais (Quadro 25), embora neste grupo a variação foi maior que em todos os outros, o que podemos verificar pelo desvio padrão da média que é bastante elevado em todos os valores obtidos.

Quadro n.º 25

Animal	Nº	GMA	GMD	GH	GC
Normal	7	288±97	409±206	1154±457	188±90
Pancreat.	6	355±696	143±370	344±550	52±95
"t"	—	0.2	0.1	1.1	1.0

DISCUSSÃO

Analisando os resultados encontrados em nosso trabalho e, relacionando-os com as experiências realizadas por diversos investigadores, podemos inicialmente eliminar o fator anestésico como causa de erro, pois trabalhamos com animais despertos. De Duve (8) e Lundsgaard (7) utilizando cães e gatos respectivamente injetados com infusão contínua de glicose verificaram uma nítida diferença de captação desta hexose pelo fígado sob a ação da insulina, considerada por De Duve como devida à anestesia e espécie animal.

Tôdas as experiências foram realizadas durante os meses de maio, junho e julho. Devido à diferença de temperatura nesta época do ano, procuramos determinar tanto a do animal (retal) como a do ambiente que sempre oscilou dentro de uma diferença de 2 a 3 graus centígrados, mantendo-se no decorrer dos diversos meses da experimentação.

A quantidade de glicose injetada durante os 180 minutos não é tóxica para o animal, pois ainda conservamos três exemplares em nosso viveiro em perfeito estado.

A curva glicêmica não atinge os níveis de saturação, pois tenderia a se elevar sempre até o final da experiência, sobe entretanto na primeira meia hora atingindo um máximo, para em seguida, fazer um planalto até o final. Por outro lado verifica-se que no animal injetado com água destilada conserva-se constante a diluição do meio circulante.

O que sucede com a glicemia não é acompanhado na deposição de glicogênio, pois enquanto aquela se eleva paulatinamente, o glicogênio nos animais submetidos a glicose e água destilada não sofre diferença significativa. Isto demonstra que não é o tipo de injeção que altera os níveis de glicogênio e sim a alteração em outros sistemas orgânicos que direta ou indiretamente atuam na deposição ou quebra do glicogênio.

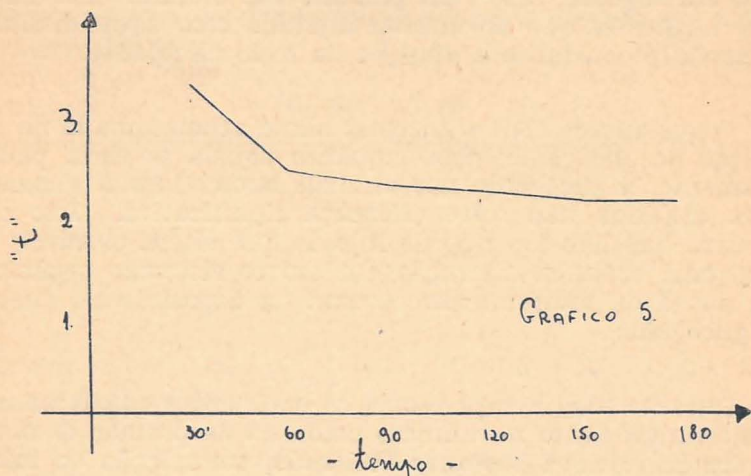
Durante toda a experiência os batimentos cardíacos não se alteraram tanto no número como na amplitude. O ritmo respiratório estava bastante acelerado, em relação ao início

da experiência, quando atingíamos os 180 minutos de injeção contínua.

Ao invés de ligar os ureteres, como procedemos, Ingle (18,19,20,21,22,23) usa o método da nefrectomia bilateral em tôdas as suas experiências com injeção contínua, tanto de glicose como de esteroides da suprarrenal, e, nunca verificou variações nos resultados. Pensamos que através de nosso processo o traumatismo operatório seja bem menor, além de conseguirmos a supressão da filtração renal.

Eliminada a filtração renal, teremos um animal com leito vascular constante e, portanto com uma quantidade de glicose conhecida.

Nos animais em que praticamos a hipofisectomia verificamos que tanto naqueles de 5 dias como de 60 dias, a operação é suficiente para nos dar um abaixamento significativo da glicemia de jejum, confirmando os trabalhos de Foglia e col. (24) e Wagner (25) no mesmo animal por nós utilizado. A glicemia atinge na primeira meia hora uma elevação acentuada sendo significativa a diferença com os normais, para em seguida, a curva formar um **planalto** e conservar-se até o fim, enquanto que a dos normais eleva-se paulatinamente diminuindo no decorrer de 180 minutos, como podemos ver na projeção gráfica do "test" de Fischer, onde a abcissa representa tempo e a ordenada o valor de "t" (gráfico 5).



Apresenta o gráfico, em primeiro lugar, uma queda da curva quase vertical, para em seguida, tornar-se mais ou menos paralela e finalmente com a abcissa, indicando inicialmente uma passagem rápida da glicose do meio circulante para o compartimento extracelular, e após uma passagem constante.

O animal estando com o pâncreas íntato, o aumento de concentração de glicose aumenta a produção de insulina, como o comprovaram Foglia (26) e Andersen e Long (27 e 28). Houssay (29 e 30) demonstrou que a hipofisectomia não é seguida da involução das ilhotas de Langerhans em várias espécies e que estas ilhotas estão com sua capacidade funcional conservada. Wagner (25) demonstrou que na tartaruga a hipofisectomia de 1 ano não produz alteração no peso do pâncreas. Goldner e Volk (31) demonstraram que a hipofisectomia de 4 e 5 meses em ratos não altera as ilhotas de Langerhans. Por êstes motivos acreditamos que ação da alta concentração de glicose principalmente na primeira meia hora desencadeou uma produção acentuada de insulina que realizou a passagem desta glicose para o meio intersticial, o que está de acôrdo com o tipo de curva que obtivemos. Entretanto, esta produção de insulina devia-se acompanhar de um aumento na deposição de glicogênio nos tecidos, a que não aconteceu com os nossos animais, confirmando as experiências de Riet Corrêa (1) e de Houssay e Rietti (5), aconselhando êstes últimos autores que se realizassem estudos com isótopos para verificar o destino desta glicose. Por outro lado, Russel e col. (32,33,34,35,36,37,38,39,40 e 41), verificaram a ação glicostática dos extratos hipofisários e do hormônio de crescimento (STH) puro sôbre o glicogênio de ratos hipofisectomizados. Na nossa experiência a manutenção dos níveis de glicogênio só se deu, em primeiro lugar pela injeção contínua de glicose e em segundo lugar pela insulina produzida pelo pâncreas sob o estímulo da concentração glicêmica do sangue.

Esta ação glicostática dos hormônios hipofisários exaustivamente estudada por Russel e col. está de acôrdo com o que demonstrou Képinow (42 e 43) de só se produzir a glicogenólise no fígado em presença de extratos hipofisários.

Desde os estudos de Gemmil (4 e 44) que o diafragma isolado do rato demonstrou ser um excelente meio de estudo "in vitro" do metabolismo hidrocarbonado. Foi empregado

por Gemmil (45), Hechter, Levine e Soskin (46), Stadie e Zapp (47) e Verzár e Wenner (48) para estudar o efeito da insulina sôbre a formação de glicogênio, e, por Krahl e Cori (49) para estudar o efeito do desaparecimento de glicose do meio, sob influência da insulina.

Villee e Hastings (50) usando a mesma preparação estudaram a ação da insulina na formação de glicogênio e na transformação de glicose em CO_2 , empregando glicose com carbono radioativo (C_{14}), em animais normais, diabéticos, adrenalectomizados, hipofisectomizados, diabético-adrenalectomizados, e adreno-hipofisectomizados. Em primeiro lugar, em todos os animais a adição de insulina ao meio aumentou o desaparecimento de glicose do mesmo. Quando não se adicionou insulina ao meio verificou-se que a formação de glicogênio e de CO_2 era deficiente no diafragma do rato diabético e, por outro lado, esta formação era maior do que o normal nos ratos adrenalectomizados e hipofisectomizados. A síntese de glicogênio no meio onde não havia insulina foi baixa nos animais diabéticos e adrenalectomizados, enquanto foi alta nos hipofisectomizados.

Krahl e Park (51), verificaram mais tarde que o hormônio hipofisário e a hipofisectomia levam ao normal a deposição em glicogênio e a transformação em CO_2 que estava baixa nos ratos diabéticos.

Blechen e Fisher (52), estudando numa preparação com coração isolado verificaram a ação da insulina na utilização da glicose por êste coração, e viram que a insulina aumenta significativamente o "uptake" de glicose do perfusado para o tecido miocárdico. Estas experiências foram confirmadas em 1956 por Fisher e Lindsay (53) e demonstraram mais, que êste "uptake" é devido a transferência maior da glicose para os espaços intersticiais sob a ação da insulina.

Orias (54) demonstrou no sapo que a hipofisectomia diminui significativamente o glicogênio cardíaco, acompanhado de uma redução nos batimentos e de um aumento da cronaxia.

Charalampous e Hegsted (55) estudaram a ação da insulina na transformação direta do piruvirato e lactado em glicose e verificaram o aumento da acetilização nos ratos diabéticos quando se injetava insulina.

Chernick e Chaikoff (56 e 57) estudando a ação da insulina na lipogênese hepática verificaram que existe uma ação grande deste hormônio nesta lipogênese, mas principalmente verificaram a grande capacidade que possui o rato diabético de transformar a glicose marcada com carbono radioativo (C_{14}) em CO_2 sob a ação da insulina. Enquanto que nos animais sem insulina não só a lipogênese está baixa como também a transformação em CO_2 .

Stadie (58) revisando os conceitos existentes sobre a ação da insulina concluiu que um de seus principais papéis era aumentar o "uptake" de glicose do meio vascular para o extra-celular. Por um lado colocaram-se Cori e seus col. (59 e 60) afirmando que o mecanismo de ação da insulina era principalmente o de acelerar a reação da hexocínase, e por outro lado, Levine e col. (61 e 62) demonstraram que a insulina facilita a transferência da glicose do meio circulante para o meio intersticial e que esta ação é completamente independente da ação sobre a hexocínase.

Winck, Drury e Mackay (63 e 64) determinaram o espaço glicose em coelhos com injeções repetidas de pequenas doses do glicose marcada com carbono radioativo (C_{14}), encontrando que o espaço glicose corresponde a 31% do peso do animal sendo após a evisceração de 26%. Levine e Goldstein (61) verificaram que após injeção de insulina num animal eviscerado a espaço glicose aumenta para 70%. Trabalhando com sorbitol Wick e Drury (65) verificaram que enquanto a glicose e a galactose eram encontradas no interior das células o sorbitol não o era, e que a passagem da glicose era mais rápida em relação ao sorbitol, o que levou estes autores a admitir a existência de um mecanismo enzimático específico onde agiria a insulina, afim de realizar a transferência da glicose para o meio extra-celular. Estas experiências foram confirmadas por Hoft e Mirsky (66) e por Park e Borstein (67 e 68) trabalhando "in vitro" com diafragma de rato isolado.

Goldstein, Levine e col. (69 e 70) estudando melhor este assunto verificaram que só aquelas hexoses que tinham a mesma configuração da delta-glicose é que seriam ativamente transportadas vencendo a barreira vascular pela insulina. Os mesmos autores verificaram que o trabalho muscular tinha a mesma ação que a insulina aumentando o espaço glicose até 80%.

Este assunto foi amplamente revisado por Park e col. (71) concluindo-se que o transporte da glicose para o meio extra-celular é um processo ativo exigindo gasto energético, possivelmente uma fosforilação e que a insulina tem efeito preponderante neste processo.

Confrontando estes trabalhos com o resultado de nossos animais verificamos a fácil explicação do planalto que a curva apresentou a partir da primeira meia hora de injeção contínua de glicose.

Em relação à ação da hepatectomia verificamos que ela não traz modificações quanto a glicemia, embora desde o início se eleve bastante dando um "t" de 2.5 em relação com os normais, e, conservando-se com uma determinada elevação quando confrontada com o grupo testemunho. Os estudos de Lundsgaard (7) e De Duve (8), foram confirmados por nós, demonstrando uma ação da insulina mais extra-hepática do que hepática. Por outro lado vemos que a hepatectomia traz nos nossos animais uma redução de mais ou menos 10% da massa corporal, e, sendo o fígado um dos órgãos que apresentam maior labilidade a glicose, pensamos que a hepatectomia reduz consideravelmente o espaço glicose disponível, o que seria um dos fatores da acumulação vascular da glicose e a consequente elevação glicêmica que se observa.

A hipofisectomia não sensibiliza e muito menos altera os resultados da glicemia e do glicogênio neste grupo. O problema da hipofisectomia já foi discutido frente aos estudos de Russel e sua escola.

A região hepato-pancreática é ricamente vascularizada sendo ligados estes vasos por ocasião da hepatectomia, o que nos ocasionou dúvidas a respeito da circulação no pâncreas após esta operação. Fizemos, então num pequeno grupo ligadura destes vasos e realizamos a experiência verificando que o comportamento deste grupo foi idêntico ao testemunho.

Os estudos de Ross (72, 73, 74) demonstraram que a insulina e os hormônios da hipófise têm uma ação semelhante no que diz respeito a transferência da glicose para o meio extra-celular. Estes estudos de Ross foram realizados sobre o olho do coelho.

Nos nossos animais, os quais não tendo pâncreas e em

presença de hipófise intata, comportaram-se identicamente ao grupo testemunho, confirmando as experiências de Ross sobre a transferência da glicose. Por outro lado as experiências de Krahl (75) demonstraram, trabalhando com diafragmas de ratos que o hormônio de crescimento tem uma ação semelhante a da insulina sobre o "uptake" de glicose do meio para o tecido muscular.

De Bodo, Kurtz e Ankowitz (76, 77, 78) verificaram que o hormônio de crescimento injetado em cães agudamente pancreatectomizados tem um efeito hipoglicemiante, efeito êste, que não se acompanha de maior deposição de glicogênio. O mesmo encontraram Marx, Herring e Evans (79). Todos êstes resultados concordam com aqueles que obtivemos no nosso grupo pancreatectomizado.

Stadie, Haugaard e Hills (80) demonstraram que em músculos de gatos pancreatectomizados a hexocinase conserva-se normal.

O glicogênio dos animais pancreatectomizados conserva-se sem diferença com o grupo testemunho, o que confirma os estudos de Russel e colaboradores, sobre a ação glicostática dos hormônios hipofisários e os estudos de Krahl, Park e Ross.

SUMÁRIO

Foi estudada a influência da hipofisectomia, pancreatectomia total e hepatectomia sobre a evolução da glicemia e do glicogênio muscular, hepático e cardíaco de Tartarugas "Phrynos Hilarii" submetidas a injeção contínua de glicose. Em todos os grupos estudados a glicemia sobe na primeira meia hora abruptamente nos hipofisectomizados e hepatectomizados, enquanto que nos pancreatectomizados a subida é idêntica a do grupo normal. Depois da primeira meia hora as curvas fazem um planalto para se conservarem até o final sem diferença significativa com o grupo testemunho, que, sofre uma subida gradativa e contínua.

Somente o grupo hipofisectomizado apresenta na primeira meia hora diferença significativa com o normal ("t" = 3.4).

Este planalto realizado pela curva significa uma passagem da glicose para o meio extra-celular, sendo então discutida a ação da insulina e hormônios hipofisários neste processo. O glicogênio no final da experiência não apresenta diferença com os testemunhos em todos os grupos.

Foi discutida detalhadamente a ação que teria a hipofisectomia e pancreatectomia sobre a deposição glicogenética. Avaliou-se e discutiu-se, ainda, a relação entre massa de fígado, massa corporal total e espaço glicose disponível sendo discutida a influência da insulina e hormônios hipofisários sobre este espaço orgânico.

SUMMARY

It has been studied the influence of hipofisectomy, complete pancreatectomy and hepatectomy on the evolution of glicemy and of cardiac, hepatic and muscular glycogen of the "Phrynops Hilarii" turtles, which are submitted to a continue injection of glyucose. In all the groups, that were studied, the glicemy increases suddenly in the first half an hour on the hipofisectomized and hepatectomized animals, while on the pancreatectomized the increases is identical to the normal group. After the first half an hour the curves make a plateau and keep itself without any significative difference from the testimony group, which suffers a graded and continue increase.

Only the hipofisectomized group presents, during the first half an hour, a significative difference from the normal ("t" = 3.4).

This plateau realized by the curve means a passage of glyucose to the extra-celular mean, being then discussed the action of the insuline and hipofisary hormones on this process. The glycogen, at the final of the experience, doesn't present any difference from the testimonies in all the groups.

It has been discussed particularly the action, that should have the hipofisectomy and pancreatectomy on the glicogenetic disposition. On valued and discussed yet, the relation among the mass of the liver, the total mass of the body and the glyucose space disposable, being discussed the influence of the insuline and hipofisary hormones on this organic space.

CONCLUSÕES

1. Em tôdas as experiências realizadas verificamos que a partir da primeira meia hora de injeção contínua há uma passagem ativa da glicose no meio circulante para o extra-celular.
2. A ausência de hipófise retarda em parte esta transferência, sendo significativa na primeira meia hora, para em seguida desaparecer a significância até o final da experiência.
3. A ausência de pâncreas não altera em absoluto a passagem da glicose injetada para o meio intersticial.
4. A retirada do fígado possivelmente afetou a evolução da glicemia devido a diminuição do espaço glicose disponível realizado pela extirpação dêste órgão.
5. Na transferência da glicose para o meio extra-celular parece que a hipófise tem papel mais preponderante que o pâncreas.
6. O glicogênio muscular, hepático e cardíaco não sofreu alteração nem pela injeção contínua de glicose e nem pela hepatectomia, hipofisectomia e pancreatectomia.

— () —

BIBLIOGRAFIA

1. Riet Corrêa, P. — *Rev. Soc. Argent. Biol.*, 21: 1, 1945.
2. Houssay, B. A., Martinez, C., Cardeza, F. A., *Rev. Soc. Argent. Biol.* 23:288, 1947.
3. Krahl, M.E., Park, C.R., *J. Biol. Chem.* 174:939, 1948.
4. Gemmil, C.L., — *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 66:232, 1940.
5. Houssay, B.A., Rietti, V.M., — *Rev. Soc. Argent.* 24:55, 1950.
6. Perlmutter, M., Greep, R.O., — *J. Biol. Chem.*, 175:915, 1948.
7. Lundsgaard, E., — *Acta Physiol. Scand.* 31:215, 1954.
8. De Duve, Christian de — *Ciba foundation Colloquia on Endocrinology*, 9:203, 1956.
9. Somogyi, M., — *J. Biol. Chem.* 160:61, 1945.
10. Somogyi, M., — *J. Biol. Chem.* 160:69, 1945.
11. Nelson, N., — *J. Biol. Chem.* 153:375, 1944.
12. Pflüger, E., — *Pflüger's Archiv für Physiol.* 103:169, 1904.
13. Wagner, E.M., — *An. Fac. Med. P. Alegre*, 15:134, 1955.
14. *Guia de trabajos Practicos de Quimica Biologica — Método de Pflüger* — pag. 276 — Ed. 7.^a — El Ateneo.
15. Schilling, J., — Inédito.
16. Gunther, B., — *Ciencia y Investigación* 1:407, 1945.
17. Mantel, N., — *Am. Statistician*, 5:26, 1951.
18. Ingle, Dwight J., — Meeks, Roberto C., — *Am. J. Physiol.*, 170:77, 1952.
19. Ingle, Dwight J., — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 69: 329, 1948.

20. Ingle, Dwight J., Nezamis, James E., — *Am. J. Physiol.*, 156:365, 1949.
21. Ingle, Dwight J., — *Ann. Internal Med.*, 35:652, 1951
22. Ingle, Dwight J., Nezamis, James E., — *Am. J. Physiol.*, 152:598, 1948.
23. Ingle, Dwight J., Nezamis, James E., Erwing, Marley, — *Am. J. Physiol.*, 165:419, 1951.
24. Foglia, V.G., Wagner, E.M., Barros, M., — *Rev. Soc. Argent. Biol.*, 31:87, 1955.
25. Wagner, E.M., — *Acta Physiol. Lat.-Amer.*, 5:219, 1955. 11:556, 1935.
26. Foglia, V.G., Fernandez, R., — *Rev. Soc. Argent. Biol.*
27. Anderson, Evelyn, Long, Joseph A., — *Endocrinology*, 40:92, 1947.
28. Anderson, Evelyn, Long, Joseph A., — *Endocrinology*, 40:98, 1947.
29. Houssay, B.A., — *Endocrinology*, 30:884, 1942.
30. Houssay, B.A., — *Endocrinology*, 35:158, 1944.
31. Goldner, Martin G., Volk, Bruno W., — *Ciba foundation Colloquia on Endocrinology*, 9:75, 1956.
32. Russel, J.A., — *Endocrinology*, 22:80, 1938.
33. Russel, J.A., — *Am. J. Physiol.*, 121:755, 1938.
34. Russel, J.A., — *Am. J. Physiol.*, 124:774, 1938.
35. Russel, J.A., — *Am. Physiol.*, 128:552, 1940.
36. Russel, J.A., — *Am. J. Physiol.*, 136:95, 1942.
37. Russel, J.A., Bennet, L.L., — *Am. J. Physiol.*, 138:196, 1937.
38. Illingworth, B.A., Russel, J.A., — *Endocrinology*, 48:423, 1951.
39. Russel, J.A., Wilhelmi, A.E., — *Endocrinology*, 47:26, 1950.
40. Milmann, A.E., Russel, J.A., — *Endocrinology*, 47:114, 1950.
41. Russel, J.A., — *Ciba foundation Colloquia on Endocrinology*, 6:193, 1953.
42. Képinov, L., — *J. Physiol.*, 46:709, 1954.

43. Képinov, L., — C. R. Acad. Sciencia, 204:1218, 1937.
44. Gemmil, C.L., Bull. Johns Hopkins Hosp, 68:329, 1941.
45. Gemmil, C.L., Hamman, L., Bull. Johns Hopkins Hosp., 68:50, 1941.
46. Hechter, O., Levine, R., Soskin, S., — Proc. Soc. Exp Biol. and Med., 46:390, 1941.
47. Stadie, W.C., Zapp, J.A.Jr., — J. Biol. Chem., 170:55, 1947.
48. Verzár, F., Wenner, V., — Biochem. J., 42:35, 1948.
49. Krahl, M.E., Cori, C.F., — J. Biol. Chem., 170:607, 1947.
50. Villee, Claude A., Hastings, A. Baird, — J. Biol. Chem., 179:673, 1949.
51. Krahl, M.E., Park, C.R., — J. Biol. Chem., 181:247, 1949.
52. Blechen, N.M., Fisher, R.B., — J. Physiol., 123:260, 1954.
53. Fisher, R.B., Lindsay, D.B., — J. Physiol., 131:526, 1956.
54. Orias, O., Séance, 67:59, 1934.
55. Charalampous, C. Frixos, — Hegsted, M., — J. Biol. Chem., 180:623, 1949.
56. Chernick, S.S., Chaikoff, I.L., — J. Biol. Chem., 186:535, 1950.
57. Chernick, S.S., Chaikoff, I.L., — J. Biol. Chem., 188:389, 1951.
58. Stadie, W.C., — Physiol. Rev., 34:52, 1954.
59. Price, W.H., Slein, M.W., Colowick, S.P., Cori, G.T., — J. Biol. Chem., 168:583, 1947.
60. Price, W.H., Slein, M.W., Colowick, S.P., Cori, G.T., — J. Biol. Chem., 160:633, 1945.
61. Levine, R., Goldstein, M.S., Huddleston, B., Klein, S.P., — Am. J. Physiol., 163:70, 1950.
62. Goldstein, M.S., Henry, L., Huddleston, B., Levine, R. — Am. J. Physiol., 173:207, 1953.
63. Wick, A., Drury, D., MacKay, E., — A. J. Physiol., 163:224, 1950.
64. Wick, A., Drury, D., MacKay, E., — A. J. Physiol., 166:421, 1951.
65. Wick, A., Drury, D., MacKay, E., — A. J. Physiol., 166:165, 1951.

66. Hoft, D., Mirsky, A., Perisutti, G., — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 82:60, 1953.
67. Park, C.R., Bornstein, J., Post, R.L., — A. J. Physiol., 182:12, 1955.
68. Park, C.R., Johnson, L.H., — Am. J. Physiol., 182:17, 1955.
69. Goldstein, M. S., Whester, H., Huddleston, B., Levine, R., — Am. J. Physiol., 173:207, 1953.
70. Goldstein, M. S., Whester, H., Huddleston, B., Levine, R., — Am. J. Physiol., 173:212, 1953.
71. Park, C.R., Post, R.L., Kalman, C.F., Wright, J.H.Jr., Johnson, L.H., Morgan, H.E., — Ciba foundation Colloquia on Endocrinology, 9:240, 1956.
72. Ross, E.J., — J. Physiol., 112:229, 1951.
73. Ross, E.J., — P. Physiol., 116:414, 1952.
74. Ross, E.J., — J. Physiol., 127:247, 1955.
75. Krahl, M.E., — Ann. N. Y. Acad. Sci., 54:649, 1951.
76. De Bodo, R.C., Kurtz, M., Ancowitz, A., Kiang, S.P., — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 74:524, 1950.
77. De Bodo, R.C., Kurtz, M., Ancowitz, A., Kiang, S.P., — Am. J. Physiol., 162:310, 1950.
78. De Bodo, R.C., Kurtz, M., Ancowitz, A., Kiang, S.P., — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 76:21, 1951.
79. Marx, W., Herring, V.V., Evans, H.M., — Am. J. Physiol. 141:88, 1944.
80. Stadie, W.C., Haugaard, N., Hills, G., — J. Biol. Chem., 184:617, 1950.

