

## Tesis de Posgrado

# Efecto del glucagón sobre el metabolismo de los hidratos de carbono

Rathgeb, Isabel Brígida

1965

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Rathgeb, Isabel Brígida. (1965). Efecto del glucagón sobre el metabolismo de los hidratos de carbono. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1266\\_Rathgeb.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1266_Rathgeb.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Rathgeb, Isabel Brígida. "Efecto del glucagón sobre el metabolismo de los hidratos de carbono". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1965.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1266\\_Rathgeb.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1266_Rathgeb.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Efecto del glucagon sobre  
el metabolismo de los hidratos de carbono**

**Isabel Brigida Rathgeb**

**Tesis presentada para optar al**

**Título de Doctora en Química,**

**Orientación Química Analítica**

**Año 1965**

1208

**Agradesco el consejo y orientacion de los Drs.  
Richard C. de Bedo, Norman Altsuler y Robert Steele  
en el curso de este trabajo y muy especialmente agradezco  
al Dr. Altsuler por su paciente y constante preocupacion  
en todas las fases de este estudio. Ademase agradezco la  
ayuda y el apoyo de mi hermana Susana tan generosamente  
brindados.**

## INDICE

	<b>Página</b>
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Propiedades químicas</b>	<b>2</b>
<b>Origen del glucagón en el organismo</b>	<b>3</b>
<b>Acción del glucagón sobre el glucógeno hepático</b>	<b>4</b>
<b>Efecto del glucagón sobre la gluconeogénesis</b>	<b>5</b>
<b>Efecto del glucagón sobre la captación de la glucosa por los tejidos</b>	<b>7</b>
<b>Acción anti-insulínica del glucagón</b>	<b>9</b>
<b>Inactivación del glucagón</b>	<b>10</b>
<b>Planteo del problema</b>	<b>12</b>
<b>Consideraciones preliminares</b>	<b>12</b>
<b>Producción y utilización de la glucosa durante periodos de glucemia constante</b>	<b>13</b>
<b>Producción de la glucosa y utilización de la glucosa durante periodos de variación de glucemia</b>	<b>15</b>
<b>Material y métodos</b>	
<b>Animales</b>	<b>17</b>
<b>Aparatos</b>	<b>17</b>
<b>Detalles experimentales</b>	<b>18</b>
<b>Resultados</b>	<b>20</b>
<b>Discusión y conclusiones</b>	<b>26</b>
<b>Resumen</b>	<b>30</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>33</b>
<b>Tablas I y II</b>	
<b>Figuras 1 - 14</b>	

## **INTRODUCCION**

Poco tiempo despues de que Banting y Best (1) lograron el aislamiento de extractos hipoglucemiantes de las celulas beta de los islotes del pancreas, varios investigadores (2,3) observaron que al administrar ciertos preparados insulínicos a conejos normales, la hipoglucemia producida estaba precedida por un aumento transitorio de la glucemia. Murlin et al. (4) estudiando los efectos de extractos acuosos de pancreas en perros pancreatoprivos, obtuvieron los mismos resultados. Tratando de mejorar los procesos de aislamiento de la insulina, estos mismos autores encontraron, que al agregar acetona a un extracto acuoso de pancreas, precipitaba una sustancia con propiedad hiperglucemiante. Esta sustancia la denominaron glucagon.

Inmediatamente se plantea el problema si esa sustancia era realmente una hormona con funcion fisiologica o si era un producto del proceso de extraccion de la insulina.

Cuando Abel (5) obtuvo insulina en forma cristalina, se noto que este preparado no producía una hiperglucemia inicial al ser inyectado en forma endovenosa a perros y conejos (6). Por consiguiente, algunos autores pensaron que el efecto hiperglucemiante producido por los anteriores preparados de insulina podía deberse a simples impurezas (6). Otros investigadores opinaban que se trataba de un producto fisiológico del pancreas y sugirieron que el aumento de la glucemia observada podía ser debido a glucogenolisis hepática (7,8).

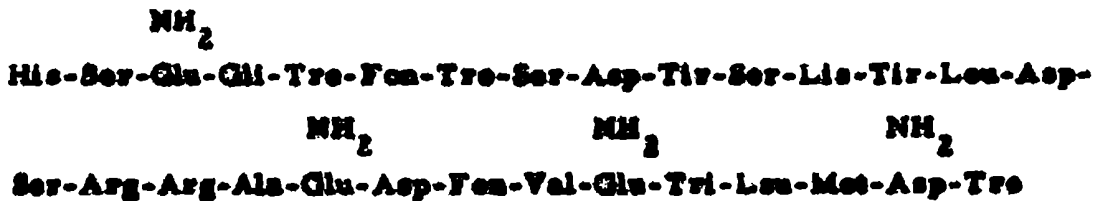
En trabajos mas recientes se ha encontrado una sustancia hiperglucemiante en la sangre venosa pancreática del perro (9,10), pero queda por determinarse si esta sustancia es idéntica al material hiperglucemiante encontrado en los primeros preparados insulínicos.

**PROPIEDADES QUIMICAS**

**Lepp (11) fue quien primero sugirio que el glucagon es una proteina, siendo el quien logro aislar un material proteico de propiedades fisiologicas similares a las del glucagon. Mas adelante se obtuvieron preparados mas puros del glucagon por fraccionamiento quimico (12).**

**Staub et al. (13) obtuvieron glucagon cristalino, partiendo de una fraccion amorfa aislada durante el proceso de purificacion de la insulina para uso comercial. Una precipitacion inicial a pH 6.7 rindió un material de actividad glucemica apreciable y relativamente libre de inulina. Mayor pureza fue obtenida por fraccionamiento con acetona y sucesivas precipitaciones a pH controlado. La inyeccion venosa de este material, producía en el gato un aumento de la glucemia de 30mg/100ml, por cada 0.05 microgramos administrados por kilo de peso del animal. Bromer et al. (14) hallaron el orden de los amino acides del glucagon por hidrolisis acida de la proteina, fraccionamiento de los amino acides así obtenidos por un metodo cromatografico y subsecuente analisis de los grupos terminales.**

**Estos estudios indicaron que la molecula del glucagon esta constituida por 29 amino acides en el siguiente orden:**



**Los 29 amino acides que constituyen la molecula del glucagon hacen sospechar un peso molecular minimo de 3485, que esta de acuerdo con determinaciones fisicas de peso molecular. Las fracciones peptidicas obtenidas despues de tratar el glucagon con distintas enzimas proteoliticas, hacen suponer que los amino acides que componen el glucagon forman una unica cadena peptidica.**

**Comparando la composicion y el orden de los amino acides del glucagon y de la insulina, se observan notables diferencias. El glucagon**

contiene metionina y triptofano, los cuales no se encuentran en la insulina. Prolina, cistina e isoleucina se encuentran en la insulina pero no en el glucagon. La ausencia de cistina es de especial significado, pues sin cistina el glucagon no puede tener las uniones disulfuro que permiten la estructura ciclohexapeptidica que se observa en la insulina, la vasopresina y la ocitocina.

Estos estudios quimicos sugieren que el glucagon no esta relacionado con la insulina, sino que es sintetizado separadamente en el pancreas y no es derivado de la insulina durante los procesos quimicos de aislamiento de esta.

### ORIGEN DEL GLUCAGON EN EL ORGANISMO

La sintesis, el almacenamiento y la liberacion del glucagon por las celulas  $\alpha$  de los islotes de Langerhans, fueron comprobados, aunque en forma indirecta, de la siguiente manera: 1) la destruccion de las celulas  $\beta$  por alexano, no disminuye la cantidad de glucagon extraible del pancreas (15), 2) al ser destruido el tejido acinar por ligacion de los conductos de secrecion, el pancreas queda rico en glucagon (15) y 3) al ser destruidas por cloruro de cobalto la mayoria de las celulas  $\alpha$ , puede extraerse poco glucagon (16).

Tambien hay indicios que celulas argentafinas del tubo gastrointestinal segregan glucagon (17). Estas celulas no son citologicamente iguales a las celulas  $\alpha$  del pancreas (18).

Sutherland et al (19) obtuvieron un extracto glucogenolitico de la mucosa gastrica del perro. Sin embargo no ha sido demostrado que esta sustancia fuese glucagon.

Sirek et al. (20) comprobaron que en el animal pancreatoprivo se puede provocar la secrecion de un factor hiperglucemiante, mediante la administracion de hormona de crecimiento. Sin embargo, no se penso que esta sustancia fuese glucagon, ya que su accion pudo ser bloqueada por la dihidroergotamina (21). En fecha mas reciente estos

investigadores han sugerido que el efecto hiperglucemiante se debía a la liberación de serotonina. Dando por aceptado que el glucagón es una hormona, queda por determinar su función fisiológica. Hasta la fecha no ha sido posible inducir un síndrome de deficiencia, en forma experimental, por falta de un sistema seguro de extirpación de células  $\alpha$ , con células  $\beta$  activas. Aunque Thoregood et al. (23) informaron que el animal tratado con alorano, con sus células  $\alpha$  intactas, requiere menos insulina para mantener una normogluceemia que el animal pancreatotómico, esta observación no ha sido confirmada.

Sin embargo, ha sido ampliamente documentada la liberación de una sustancia hiperglucemiante del páncreas, bajo determinadas circunstancias. Experimentos de anastomosis realizados por Foa et al. (24) mostraron que sangre venosa pancreática del perro dador, al cual se le había inducido una hipogluceemia por inyección de insulina, produjo un aumento de la gluceemia en el perro receptor. Fedden (10) ha aislado del plasma venoso del páncreas de perro, una sustancia hiperglucemiante activadora de la fosforilasa. Posteriormente, Mahman et al. (25) describieron un método de fraccionamiento de la sangre por medio del cual pudieron recuperar glucagón que había sido agregado a la sangre entera. Usando este método, los autores han demostrado la presencia de una sustancia indistinguible del glucagón en la sangre periférica del hombre y en la sangre periférica y pancreática del perro. También demostraron que al inyectar glucagón en la vena porta del perro, el glucagón puede ser recuperado de la sangre venosa femoral, quedando establecido en esta forma, que si el glucagón es segregado por el páncreas, puede aparecer en la sangre periférica.

En estudios más recientes, Ungar et al. (26, 27) describieron un método radioinmunológico para la determinación del glucagón, e informaron sobre variaciones de concentraciones del glucagón en plasma en diferentes condiciones experimentales. Estos autores encontraron que las concentraciones del glucagón en plasma estaban aumentadas en



perros con hipoglucemia cronica inducida por la flovidsina. Tambien demostraron que las concentraciones plasmaticas de glucagon eran elevadas durante periodos de hipoglucemia insulinica. En ambos casos la administracion endovenosa de glucosa producia un descenso de la concentracion plasmatica de glucagon a valores iniciales.

#### **ACCION DEL GLUCAGON SOBRE EL GLUCOGENO HEPATICO**

La inyeccion endovenosa del glucagon produce un aumento transitorio de la glucemia, similar a la producida por la adrenalina. El origen de la glucosa es aparentemente el higado, ya que no se observa el efecto hiperglucemiante en animales con hepatectomia funcional (28) ni en animales eviscerados (29), y se reduce por el ayuno (30). En ratas tratadas con glucagon se observa un descenso inmediato de glucogeno hepatico; en animales normales el glucogeno ascendio luego a valores mayores que los iniciales. En cambio, en ratas tratadas con alexano, el glucogeno no excedio los niveles iniciales (31, 32). Contrariamente al efecto de la adrenalina, el glucagon no disminuye el glucogeno muscular (32), ni aumenta los valores del lactato en el plasma (33).

Shipley et al. (34) han demostrado que preparados comerciales de insulina incubados in vitro con cortes de higado de rata de alto contenido de glucogeno, producen una mayor cantidad de glucosa que incubando los cortes de higado sin agregado de insulina. Se comprobó que, destruyendo las propiedades hipoglucemiantes de los preparados insulinicos, no quedaba afectada la accion glucogenolitica.

Posteriormente Sutherland et al. (35) comprobaron que la actividad de la fosforilasa era el factor que limitaba la degradacion del glucogeno hepatico. Tambien demostraron estos autores que el higado contenia un sistema enzimatico que mantenia el equilibrio entre la forma activa e inactiva de la fosforilasa, y que probablemente este sistema enzimatico estaria bajo control hormonal (36). Ha sido demostrado mas tarde, que el glucagon desplaza el equilibrio de este sistema hacia

una mayor producción de fosforilasa activa. Usando preparados triturados de hígado libre de células, se demostró que la acción de la hormona podía describirse en dos etapas: 1) la formación, en presencia de la hormona, de un factor activo en la fracción de partículas, 2) la activación de la fosforilasa hepática, por este factor, en el sobrenadante del preparado, en el cual la hormona en sí no tiene efecto. Se ha encontrado que este factor activante es la 3-5adenosinamono-fosfato cíclica y su síntesis se cataliza por un sistema enzimático, el cual a su vez es activado por el glucagón (38).

Aunque este sistema enzimático está ampliamente distribuido en los tejidos de origen animal, el glucagón solamente activa la ciclase hepática y no tiene efecto sobre la ciclase muscular, a diferencia de la adrenalina que puede activar a ambos sistemas enzimáticos (39, 40).

La acción del glucagón sobre la glucemia depende también de otras hormonas. El glucagón, a igual que la adrenalina, no tiene efecto hiperglucemiante en el perro hipofisoprivo sin tratamiento (41). Suponiendo que perros hipofisoprivos en buen estado de salud tienen concentraciones normales de glucógeno hepático, no es probable que la falta del efecto hiperglucemiante del glucagón sea debido a bajos niveles de glucógeno. El efecto del glucagón se restablece, tratando al animal con cortisona, demostrándose de esta forma, que la acción del glucagón depende de la presencia de esteroides suprarrenales.

#### **EFECTO DEL GLUCAGON SOBRE LA GLUCONEOGENESIS**

Se ha sugerido que el glucagón también puede aumentar la gluconeogénesis. Tyberghien (42) observó un aumento de excreción de nitrógeno urinario en conejos después de administrar glucagón. Salter et al. (43) demostraron que dosis de glucagón suficientemente elevadas como para producir diabetes en ratas a régimen de alimentación forzada, producen una disminución inmediata en la concentración de

los amino ácidos en sangre y un gran aumento de excreción de urea, indicando un aumento de gluconeogénesis. Como el glucagón produce estos efectos en el animal suprarrenoprivo, el aumento en la gluconeogénesis no depende de la glándula suprarrenal. Issa et al. (44) observaron una acción catabólica sobre las proteínas en ratas mantenidas en ayuno. Esta acción no fue suprimida por la administración de andrógenos (45). El glucagón también produjo un aumento de producción de urea in vitro, según ha sido demostrado en experimentos de perfusión de hígado de rata (46). Al agregar glucagón a la sangre perfusora del hígado aislado, proveniente de un animal normal, se produjo un aumento de producción de urea; también se observa en el transcurso del experimento una disminución del contenido de glucógeno en el hígado.

#### **EFFECTO DEL GLUCAGON SOBRE LA CAPTACION DE LA GLUCOSA POR LOS TEJIDOS**

La hiperglucemia producida por la administración de glucagón puede ser debida tanto a una disminución de la captación de la glucosa como a un aumento de la producción de glucosa hepática. Drury et al. (47) estudiaron la velocidad de transporte de la glucosa del compartimento extracelular al intracelular en conejos eviscerados y encontraron que la velocidad de transporte era menor en los animales tratados con insulina y glucagón, que en los tratados con insulina solamente. Basaron sus cálculos en la cantidad de glucosa que hubo que administrar a fin de mantener una glucemia normal antes y después de la administración de las hormonas. Pincus et al. (48) estudiaron el efecto del glucagón sobre la fijación de glucógeno en músculo de perro pancreático, e informaron que, mientras que el glucagón solo no tenía efecto sobre los niveles de glucógeno, había un pequeño, pero estadísticamente significativo descenso en

la fijación de glucógeno muscular inducida por la insulina. Rodríguez - Candela et al. (49) concluyeron de sus experimentos in vitro y de la interpretación estadística de sus resultados, que en el diafragma aislado de rata, el glucagón inhibe la captación de la glucosa inducida por la insulina. En experimentos similares, Randlo (50) no pudo detectar ninguna acción inhibitoria del glucagón sobre la captación de glucosa por los tejidos. Comparando diferencias de concentración de glucosa arterial y venosa en perros normales y pancreatoprivos, Elrick et al. (51) observaron un mayor incremento de la captación de glucosa, durante e inmediatamente después de una hiperglucemia provocada por la inyección de glucagón, que el aumento de captación de glucosa observado durante una glucemia similar, producida por administración de glucosa. Como este efecto también fue observado en animales pancreatoprivos, fue sugerido que la acción estimulante del glucagón sobre la captación de glucosa en la periferia no dependía de la liberación de insulina. Tomando como índice de la utilización de glucosa, la diferencia de la glucemia en los vasos capilares y venosos del antebrazo del hombre normal, también se notó, a concentraciones de glucosa similares, una mayor captación después de administrar insulina con glucagón, que dando cualquiera de estas hormonas por separado.

En experimentos similares, Van Itallie et al. (52) no observaron efecto significativo sobre la captación de glucosa por los tejidos. Midiendo diferencias de concentración de glucosa arterial y venosa a través del antebrazo del hombre normal, compararon la captación de glucosa durante y después de una hiperglucemia inducida por glucagón, y durante y después de una hiperglucemia producida por la inyección de glucosa. Estos resultados fueron confirmados posteriormente por Bondy et al. (53). Usando la misma técnica, Tomisawa et al. (54) no encontraron indicios de estimulación de captación de glu-

cosa en la periferia por el glucagon en perros pancreatizados. Sin embargo sugirieron el uso de otra tecnica para obtener resultados mas consistentes al respecto en experimentos in vivo.

### ACCION ANTI-INSULINICA DEL GLUCAGON

Numerosos estudios revelan que el metabolismo de los hidratos de carbono esta regido por la accion de numerosos factores hormonales. La unica hormona de accion hipoglucemiante, descubierta hasta la fecha, es la insulina. Se ha comprobado que su efecto se produce por un aumento de la utilizacion de la glucosa por ciertas tejidos, como por ejemplo: musculo (55), tejido adiposo (56). Ademas, se ha demostrado que la insulina inhibe la produccion de glucosa por el higado (57). Otras hormonas, como la hormona de crecimiento, corticosteroides suprarrenales, prolactina y adrenalina tienen un efecto contrario a la insulina, debido a que reducen la eficacia de la insulina como agente hipoglucemiante. El glucagon puede considerarse un agente fisiologico antagonista de la insulina, en el sentido de que sus efectos sobre el metabolismo de hidratos de carbono son opuestos a los de la insulina. De esta manera, al aumentar el glucagon, la produccion de glucosa hepatica podria contribuir a contrarrestar la hipoglucemia inducida por la insulina. Esto lo sugirieron los trabajos de Fen et al. (24) en experimentos de anastomosis, los cuales demostraron que la disminucion de la glucoemia producida por la insulina dio lugar a la aparicion de un agente hiperglucemiante en la vena pancreatica del dador.

En trabajos mas recientes, Unger et al. (27), usando un metodo radioinmunologico, observaron un aumento en los niveles de glucagon en sangre durante una hipoglucemia insulinica. Se ha intentado producir diabetes con la administracion de glucagon, sin embargo, se vio que en animales normales el efecto hiperglucemiante del glucagon

se regula facilmente mediante una mayor secrecion de insulina, aunque el glucagon puede aumentar el efecto diabetogeno de otras hormonas, como por ejemplo la cortisona, produciendo de esta manera una diabetes transitoria (58). Se hallo que la administracion diaria de glucagon a ratas normales por un periodo de hasta 164 dias, no producía cambios significativos en la tolerancia de glucosa, tolerancia de la insulina, glucogeno hepatico y numero y apariciencia de células  $\alpha$  y  $\beta$  de los islotes (59). Se ha demostrado que, aun dosis altas de glucagon producian unicamente hiperglucemia y glucosuria transitorias (60). Sin embargo, administrando a ratas dosis altas de glucagon, suspendido en aceite de maiz, Salter et al. (61) observaron una marcada accion diabetogena del glucagon. En estos animales se producía glucosuria intensa, y glucemia elevada y perdida de peso, pero dado que dosis altas de glucagon son sumamente toxicas, el tratamiento no pudo prolongarse por mas de diez dias. No obstante, en los animales sobrevivientes, la hiperglucemia y glucosuria persistieron durante seis dias despues de suspenderse todo tratamiento.

#### INACTIVACION DEL GLUCAGON

El glucagon es muy susceptible a la accion hidrolitica del plasma humano, mientras que la insulina es resistente a dicha accion (62). Goldner et al. (63) demostraron que, preparados insulínicos contaminados con glucagon pierden su accion hiperglucemiante despues de ser perfundidos a traves de higado de rana. La actividad hipoglucemica de los preparados insulínicos no fue afectada por este proceso. No se encontro actividad hiperglucemica en los extractos de los higados de rana perfundidos. Esto esta de acuerdo con experimentos realizados in vitro con insulina I<sup>131</sup> y glucagon I<sup>131</sup> que evidenciaron una degradacion metabolica mas rapida del glucagon que de la insulina (64). En este respecto, el higado y el rinon parecen ser los tejidos de mayor

actividad. En estudios mas recientes, se aialo, en el proceso de purificacion de la glutatton-insulina-tranahidrogenasa, una fracion que degrada el glucagon(65).

### A. Planteo del Problema

En el presente estudio se han realizado experimentos con el fin de investigar los efectos del glucagon inyectado, sobre ciertos parámetros del metabolismo de los hidratos de carbono, en el perro normal no anestesiado y en ayuno de 18 horas. Además, se han comprobado los efectos producidos por el glucagon con los obtenidos por una infusión de glucosa y una infusión de insulina. También se ha investigado la influencia de la insulina sobre la acción del glucagon. Los parámetros del metabolismo de los hidratos de carbono que se han determinado fueron: la velocidad de liberación de la glucosa hepática y la velocidad de captación de la glucosa por los tejidos. Esto se realizó por medio de una técnica de dilución de isótopo, usando glucosa  $C^{14}$ . El fundamento teórico y una descripción de la técnica usada se detalla a continuación.

### B. Consideraciones Preliminares

Es posible determinar el pool de la glucosa del perro y las velocidades de producción de la glucosa y de captación de la glucosa por los tejidos mediante el uso de glucosa  $C^{14}$ .

Se define como pool de la glucosa a aquella cantidad de glucosa que diluye a la glucosa  $C^{14}$  administrada. Se supone que el volumen de líquido en el cual está contenido el pool de la glucosa, a una concentración igual a la del plasma, permanece constante. Como en el estado de ayuno el hígado es la única fuente de glucosa, la dilución posterior de la glucosa  $C^{14}$  administrada, por glucosa  $C^{12}$ , es una medida de la producción de la glucosa hepática. La desaparición de la glucosa del plasma, en ausencia de glucosuria, se debe a la captación de la glucosa por los tejidos. A glucemia constante, la velocidad de captación de la glucosa es igual a la velocidad de producción de la glucosa y se define como la velocidad de turnover de la glucosa.



Cuando la glucemia varia, es necesario tener en cuenta tambien otros factores para el calculo de la utilizacion de la glucosa. El fundamento teorico para el calculo de la captacion y produccion de la glucosa hepatica durante periodos de glucemias variables sera dado mas adelante.

1. Produccion y utilizacion de la glucosa durante periodos de glucemia constante

En la tecnica de dilucion de isotopo empleada en el presente estudio se utiliza la administracion de una inyeccion inicial de una determinada cantidad de glucosa  $C^{14}$ , seguida inmediatamente por una infusion constante de glucosa  $C^{14}$ . La inyeccion inicial establece una determinada relacion entre la glucosa  $C^{14}$  y la glucosa  $C^{12}$  (actividad especifica) y la infusion constante sirve para mantener esta relacion. La distribucion uniforme de la inyeccion inicial de glucosa  $C^{14}$  a traves del pool de glucosa, lleva aproximadamente 45 minutos. Por este motivo, valores de actividad especifica obtenidos durante la primer hora no se utilizan para los calculos.

Las variaciones de actividad especifica durante este periodo se expresan por la siguiente ecuacion:

$$\frac{dx}{dt} = F - (g/C_0) x$$

donde  $x$  representa el total de  $C^{14}$  en el pool al tiempo  $t$ ,  $F$  es la velocidad de infusion de glucosa  $C^{14}$ ,  $g$  es igual a la velocidad con la cual aparece y desaparece la glucosa en el plasma, expresada en miligramos de carbono por minuto y  $C_0$  es el pool de la glucosa expresado en gramos de carbono. Se determina la constante integracion, al tiempo  $t = 0$ , cuando  $x = p$  (actividad de la dosis inicial) y reemplazando  $x/C_0$  por su equivalente  $\Delta A_t$ , se obtiene la siguiente ecuacion:

$$SA_t = F/g + (P/Co - F/g) e^{-g^2 t/Co} \quad (I)$$

donde:  $SA_t$  = actividad específica de la glucosa del plasma en microcurias de  $C^{14}$  por gramo al tiempo  $t$ .

$t$  = tiempo en minutos después de la inyección inicial

$F$  = velocidad de infusión de la glucosa  $C^{14}$  en microcurias por minuto

$g$  = velocidad con la cual aparece y desaparece la glucosa en el plasma en miligramos de carbono por minuto

$P$  = actividad de la inyección inicial en microcurias

$Co$  = magnitud del pool de glucosa en gramos de carbono

Para el cálculo de  $SA_t$  se han usado valores obtenidos entre los 60 y 180 minutos después del comienzo del experimento, ya que los valores obtenidos antes de los 60 minutos están afectados por el proceso de distribución de la glucosa  $C^{14}$ .

Sobre papel milimetrado, y representando en abscisa el tiempo y en ordenadas la radioactividad específica de la glucosa del plasma, se traza una curva a través de los puntos obtenidos experimentalmente. Extrapolando la curva así obtenida, al tiempo cero, se obtiene un valor provisorio de  $P/Co$ . El valor que adquiriría la actividad específica de la glucosa en el plasma después de un largo período de infusión es  $F/g$ . Como  $P$  y  $F$  son datos, se puede calcular  $Co$  y  $g$ . Sustituyendo estos valores en la ecuación (I) se puede calcular los valores teóricos de la actividad específica de la glucosa plasmática,  $SA_t$ , a distintos valores de  $t$  comprendidos entre 60 y 180 minutos. Si los valores usados de  $P/Co$  y  $F/g$  son los que corresponden, los valores teóricos de actividad específica coinciden con los valores experimentales. En caso que esto no suceda, se tomarán distintos valores de  $P/Co$  y  $F/g$ .

y se repite este proceso hasta obtener los valores correctos, que permitirán el cálculo subsiguiente de la magnitud del pool y de la velocidad de captación de la glucosa por los tejidos y la velocidad de liberación de la glucosa hepática.

Para tener en cuenta todos los aspectos de la distribución en los cálculos de la magnitud del pool de glucosa y la velocidad de turnover de la glucosa, se ha derivado un método más complejo de cálculo (66). Se supone que el proceso de distribución se realiza entre un compartimento central plasmático y compartimentos periféricos de los líquidos intersticiales. El número de los compartimentos periféricos, la magnitud de cada uno de ellos y la aparición y desaparición de la glucosa de estos compartimentos pueden ser deducidos por la forma de la curva, obtenida del gráfico de la actividad específica de la glucosa plasmática en función del tiempo. También se puede calcular la curva teórica de las actividades específicas en función del tiempo, para cada uno de los compartimentos. El resultado de estos cálculos indica que la mejor representación del pool de la glucosa es la que supone que el pool consiste de un compartimento central plasmático y dos compartimentos periféricos, de los cuales uno intercambia glucosa rápidamente con el compartimento central, haciendo posible de esta forma, una distribución rápida de glucosa  $C^{14}$  inyectada.

## 2. Producción de la glucosa y utilización de la glucosa durante periodos de variación de la glucemia

Un descenso de la glucemia puede ser debido ya sea a una disminución de la producción hepática o a un aumento de la utilización de la glucosa, o a ambos procesos. Si la producción hepática de la glucosa  $C^{12}$  fuese disminuida, se observaría un aumento de la actividad específica de la glucosa en el plasma, ya que la velocidad de infusión de glucosa  $C^{14}$  permanece constante durante el transcurso

del experimento. De esta manera, un descenso de la glucemia durante un periodo de actividad especifica constante, indicaria un aumento de la captacion de la glucosa por los tejidos, ya que los tejidos utilizan la glucosa  $C^{14}$  y la glucosa  $C^{12}$  en forma indistinta. Inversamente un aumento de la glucemia acompañado por un descenso de la actividad especifica indicaria un aumento de la produccion de la glucosa. Por otra parte, un aumento de la glucemia sin variacion de la actividad especifica de la glucosa, indicaria una disminucion de la utilizacion de la glucosa por los tejidos. Los calculos para la produccion y utilizacion de la glucosa durante glucemias variables se hacen en base a la suposicion de que los cambios observados son representativos de la mitad del pool de la glucosa unicamente, ya que se ha encontrado que el 50 por cien restante del pool, intercambia glucosa lentamente con el plasma. Se supone que el volumen de los liquidos tisulares y del plasma que contienen el pool de glucosa permanece constante. Si este volumen se representa por  $V$ , el total de gramos de glucosa en el pool al tiempo  $t$  es  $B_t$ , el total de microcurias de glucosa  $C^{14}$  en el pool al tiempo  $t$  es  $A_t$ , las microcurias de glucosa  $C^{14}$  administradas por minuto, por una infusion constante, es  $F$ , y  $R_1$  y  $R_2$  son los gramos de carbono de glucosa que entran y salen del compartimento al tiempo  $t$ , respectivamente, entonces, la actividad especifica del compartimento que se observa, al tiempo  $t$  es  $i_t = A_t/B_t$ , como  $A_t = i_t B_t$ :

$$1) \quad dA_t/dt = B_t di_t/dt + i_t dB_t/dt$$

La ecuacion(1) expresa la velocidad de variacion de la radioactividad con el tiempo.

$$2) \quad dB_t/dt = R_1 - R_2$$

expresa la velocidad de variacion del total de glucosa presente en el compartimento y depende de la diferencia de las velocidades  $R_1$  y  $R_2$ .

Comparando:

$$3) \quad dA_t/dt = F - R_2 i_t$$

que depende de la velocidad de infusión  $F$  y de la velocidad de desaparición de glucosa  $C^{14}$ .

Combinando estas tres ecuaciones, se obtiene un valor para  $R_1$ , es decir la velocidad de entrada de la glucosa al compartimento; y  $R_2$  la velocidad de salida de la glucosa:

$$R_1 = \frac{F - B_t \, di_t/dt}{i_t} \qquad R_2 = R_1 + dB_t/dt$$

Como cambios rápidos de la actividad específica y de la glucemia ocurren únicamente en el cincuenta por cien del pool, se debe introducir un factor de corrección  $V/2$  en las ecuaciones que se acaban de describir. Se calcula la producción de la glucosa hepática y captación de la glucosa por los tejidos sustituyendo en estas ecuaciones los valores correspondientes de glucemia y actividad específica de la glucosa en plasma(67).

### C. Material y Método.

1. Animales: Los experimentos descritos en esta tesis fueron realizados en perros normales, no anestesiados y en ayuno de 17 a 18 horas. Los perros fueron amaestrados previamente a permanecer acostados inmóviles sobre una mesa, durante todo el período experimental. La composición calórica de la ración alimenticia que recibían los animales, era la siguiente: 38% del total de las calorías fue contribuido por hidratos de carbono, el 39% por grasa y el 23% por proteína.

2. Aparatos: La figura 1 muestra los detalles del aparato usado para un experimento de dilución de isótopo. La cabeza del perro se encierra en una máscara respiratoria cilíndrica de plástico transparente. Un collar ancho de goma circunda el cuello del perro y asegura el cierre

hermetico con la mascara respiratoria. Una abertura en cada una de las bases de la mascara permite el pasaje de aire. Por medio de una bomba de succion el aire es aspirado a razon de 30 litros por minuto a traves de la mascara. A la salida de la mascara respiratoria el aire burbujea en un recipiente de 20 litros que contiene una solucion de hidroxido de sodio al 10%, a fin de absorber el anhídrido carbonico exhalado por el perro (68).

3. Detalles experimentales: Se coloco al perro de costado sobre una mesa con la cabeza dentro de la mascara respiratoria. En una vena cateterizada con un tubo de polietileno se inyecto una dosis inicial de glucosa  $C^{14}$ , uniformemente marcada, de aproximadamente 30 microcurias, disueltas en 10 mililitros de solucion fisiologica. A traves de la misma canula se administro seguidamente y en forma continua, una solucion de glucosa  $C^{14}$  de aproximadamente 0.5 microcurias por mililitro a razon de unos 0.5 mililitros por minute. La velocidad de infusion de esta solucion se mantuvo constante durante el transcurso del experimento. La glucosa contenida en las soluciones radioactivas administradas en el curso del experimento era de unos 5mg, de modo que no tenia efecto sobre el metabolismo del animal. Se tomaron muestras de sangre por medio de un tubo de polietileno implantado en la vena juglar. Las muestras de sangre se recogieron en tubos con heparina y luego de centrifugar se separo el plasma para la determinacion de la glucemia y de la actividad especifica de la glucosa.

El dosaje de glucosa se hizo por el metodo de Hagedorn-Jensen (69) sobre partes alicuotas de filtrados de zinc y bario de Somogyi (70). Para la determinacion de la actividad especifica, de la glucosa, se mezcló 15 mililitros de cada filtrado con una cantidad de glucosa  $C^{12}$  exactamente medida. Se preparo la fenileesazona que luego fue transformada a glucosotriazol. Se pesaron 10 miligramos de este ultimo derivado y se disolvieron en 5 mililitros de alcohol etilico que contenian 130 mg

de ácido bórico y se agregaron luego 15ml de una solución de 0.3% de Fenilbifeniloxadiazol en xileno (71). La determinación de la radioactividad se efectuó en un contador de centelleo de la Packard Instrument Company.

Las concentraciones de insulina en plasma fueron determinadas por un método inmunológico (72), basado en la reacción entre la insulina marcada con  $I^{131}$  y anticuerpos específicos que producen un complejo de anticuerpo y antígeno marcado. La insulina sin marcar compete con la insulina marcada por el anticuerpo, reduciendo la cantidad de complejos de antígeno marcado con anticuerpo. La proporción entre insulina  $I^{131}$  fijada (F) e insulina  $I^{131}$  libre (L), decrece a medida que aumenta la concentración de insulina sin marcar. Por consiguiente, usando cantidades constantes de insulina  $I^{131}$  y concentraciones variables de insulina sin marcar, se puede trazar una curva standard de la concentración de insulina en función de la relación F/L. Comparando la proporción F/L obtenida con una muestra con la de la curva standard, se puede determinar la concentración de insulina en la muestra. La separación de la insulina  $I^{131}$  fijada de la insulina  $I^{131}$  libre, se hace mediante electroforesis en papel. La insulina libre queda en el origen, mientras que el complejo anticuerpo - insulina migra hacia el anodo junto con las proteínas del plasma. Se determinó la radioactividad cortando las tiras de papel en las zonas correspondientes y midiendo la radioactividad con un detector de centelleo (Baird Atomic, Modelo 707).

El glucógeno hepático fue determinado en muestras obtenidas por biopsia percutánea. El dosaje del glucógeno se realizó por un método de precipitación alcohólica y subsecuente hidrólisis ácida. Se determinó la concentración de glucosa en partes alícuotas de la solución obtenida. Los valores se expresaron en miligramos de glucosa por cien miligramos de hígado (73).

**D. Resultados**

En el grafico 2 se han detallado los efectos típicos de una infusión de glucagón sobre el perro normal, no anestesiado, observados en numerosos experimentos. La glucemia y la actividad específica de la glucosa plasmática se ven en la parte superior de la figura. Los valores de la utilización de la glucosa por los tejidos y la producción hepática de la glucosa, se hallan en la mitad inferior del gráfico. La infusión de glucosa  $C^{14}$ , precedida por la inyección inicial de glucosa  $C^{14}$ , fue comenzada 120 minutos antes de la infusión de glucagón. Dejando transcurrir una hora para asegurar la distribución uniforme de la glucosa  $C^{14}$  a través del pool de glucosa, se obtuvieron muestras de plasma durante la segunda hora para determinar los valores normales de la captación de la glucosa por los tejidos y de la liberación de la glucosa hepática. A 120 minutos de comenzado el experimento se inició la infusión de glucagón a razón de 1  $\mu$ /Kg/Hr. Se puede ver que la glucemia aumentó rápidamente durante el período de infusión de glucagón, llegando a un valor de 140 mg/100 ml en 40 minutos y disminuyendo luego ligeramente. La actividad específica de la glucosa plasmática disminuye rápidamente después de iniciada la infusión de glucagón y permaneció baja, indicando un aumento de la producción de la glucosa el cual persistió durante la infusión de glucagón. La utilización de la glucosa por los tejidos también aumentó por encima de los valores iniciales.

En algunos perros los efectos del glucagón sobre la producción y la utilización de la glucosa no persistieron a pesar de la continua infusión de glucagón, como queda señalado en el grafico 3. Se puede observar que la infusión de glucagón, 1 $\mu$ /Kg/Hr, produjo la hiperglucemia anticipada. La producción hepática de glucosa aumentó inmediatamente después de comenzada la infusión, permaneciendo elevada



per 40 minutos, pero declinando hacia los valores base antes de terminada la infusion de glucagon. La captacion de la glucosa por los tejidos aumento ligeramente.

En la figura 4 se observan los resultados de un experimento en el cual se ha administrado una dosis de glucagon mas alta, ( $2\text{V/Kg/Hr}$ ). En este experimento la glucemia volvio a aumentar por encima de los valores iniciales y permanecio por encima de  $135\text{mg}/100\text{ml}$  durante todo el transcurso de la infusion de glucagon. Al comiense de la infusion la produccion de glucosa aumento rapidamente, volviendo con marcadas fluctuaciones, a valores normales, antes de finalizada la infusion de glucagon. La captacion de la glucosa por los tejidos fue incrementada por la mayor parte hasta el doble del valor inicial durante la infusion de glucagon. Al suspender la infusion, la glucemia disminuyo rapidamente, alcanzando aproximadamente su valor inicial. La utilizacion de la glucosa por los tejidos tambien disminuyo, alcanzando lentamente el valor hallado previamente a la infusion de glucagon.

La figura 5 detalla los resultados de un experimento tipico, en el cual glucagon fue administrado a razon de ( $4\text{V/Kg/Hr}$ ) durante 210 minutos. Se observa que la glucemia aumento mas rapidamente y a valores mayores que en los experimentos de las figuras 2 y 3, en los cuales se ha dado dosis menores de glucagon. La glucemia permanecio elevada durante todo el periodo de la infusion de glucagon. El mayor incremento de produccion de la glucosa se observo al comiense de la infusion, permaneciendo elevada durante el resto del periodo experimental, aunque tendiendo a disminuir hacia el final del periodo de la infusion. Los valores de utilizacion de la glucosa fueron marcadamente elevados. Sin embargo, debe hacerse notar que los valores hallados, aunque fueron tres a cuatro veces superiores a los normales, se observaron cuando la glucemia era del orden de  $275\text{mg}$  por  $100\text{ml}$ .

El contenido de glucogeno en el higado tambien fue determinado, obteniendose a intervalos muestras de higado por biopsia percutanea, durante el transcurso del experimento. Se puede observar que el glucogeno hepatico disminuye desde un valor inicial normal de 5.8% a un 0.8% a 165 minutos de iniciada la infusion de glucagon. Sin embargo, esta marcada perdida de glucogeno fue observada unicamente con la dosis alta (4V) de glucagon.

Para permitir una mejor evaluacion del efecto del glucagon sobre la utilizacion de la glucosa, fue necesario compararla con la utilizacion observada durante periodos de glucemias similares inducidas por infusion de glucosa solamente. En el experimento que se muestra en la figura 6 un perro normal recibio glucosa, 364 mg/Kg/Hr, lo cual produjo una glucemia semejante a la inducida por una infusion de glucagon en el mismo animal. La glucosa dada fue marcada con  $C^{14}$  de manera tal que tuviese la misma actividad especifica que la glucosa plasmatica, para evitar errores de interpretacion debido al proceso de distribucion de una cantidad elevada de glucosa sin marcar. Se puede observar que la captacion de glucosa fue incrementada notablemente durante el periodo de infusion de glucosa. La produccion de glucosa disminuye por debajo del valor inicial.

Comparando el aumento de la captacion de glucosa durante una infusion de glucagon (detallado en la figura 2) con la captacion de glucosa durante una infusion de glucosa (figura 6), es evidente que la utilizacion de la glucosa fue significativamente menor en los estudios realizados con infusiones de glucagon. La comparacion de los valores hallados, se puede ver claramente en las figuras 7 y 8. Si se comparan experimentos con aumentos de glucemias similares, es evidente que el aumento de utilizacion de la glucosa es menos marcada en el animal al cual se ha dado una infusion de glucagon, segun detallado en la fig. 7. Cuando las glucemias no eran similares, los valores hallados para la utilizacion de

la glucosa, fueren corregidos en base a una glucemia de 100/mg/100ml. Con esta modificacion fue factible hacer comparaciones mas extensas. En el experimento que se muestra en la figura 8, las glucemias durante la infusion de glucagon, eran alrededor de 250mg/100ml, sin embargo, el aumento de la captacion de glucosa era mucho menor que durante una infusion de glucosa que produjo un ascenso de la glucemia de aproximadamente 130mg/100ml.

A fin de precisar el mecanismo por el cual una infusion de glucagon inhibe la captacion de glucosa se investigaron varias posibilidades, en base al siguiente razonamiento: el glucagon puede inhibir la captacion de glucosa, ya sea por interferir con el aumento de secrecion de la insulina que normalmente es provocado por una hiperglucemia, o por reducir la eficacia de la insulina de aumentar la utilizacion de la glucosa. Para investigar la primera posibilidad se compararon las concentraciones de insulina producidas ya sea con una infusion de glucosa o con una infusion de glucagon. A perros normales se administro una infusion de glucosa (300mg/Kg/Hr) y se determinaron las glucemias y las concentraciones de insulina en plasma en muestras obtenidas a intervalos regulares en el transcurso del experimento. La tabla 1 muestra los resultados de ocho experimentos de este tipo. Las concentraciones de glucosa en plasma se hallan en la parte superior de la tabla. En la parte inferior de la tabla se detallan los valores obtenidos para las concentraciones de insulina plasmatica. Para cada intervalo de tiempo, se ha calculado ademas el promedio de las glucemias y valores de insulina para todos los experimentos. El desaje de insulina se efectuó por el metodo radioinmunologico, segun descripcion en la seccion Material y Metodos. La figura 9, muestra una curva standard tipica, obtenida con distintas concentraciones de insulina.

En experimentos similares se dio una infusion de glucagon a cinco perros para producir una hiperglucemia de magnitud comparable a la

hiperglucemia inducida por la infusion de glucosa. Las concentraciones de glucosa e insulina plasmatica se hallan en la tabla II, ademas, los promedios de las concentraciones de glucosa e insulina de todos los experimentos correspondientes a los distintos intervalos de tiempo.

Para poder observar con mayor claridad la diferencia entre la respuesta insulinica producida por una hiperglucemia inducida por el glucagon y la respuesta obtenida con una hiperglucemia producida por una infusion de glucosa, se han presentado los datos de estas tablas en forma de grafico (figura 10). En la parte inferior de la figura se observan los valores promedios de las concentraciones de glucosa e insulina en plasma obtenidos durante una infusion de glucosa (datos de tabla I), y la parte superior muestra los resultados obtenidos durante una infusion de glucagon (datos de tabla II). Se observa que en ambos casos el aumento de la concentracion de insulina es paralelo al aumento de la glucemia. Es evidente que el glucagon no impide el aumento de concentracion de insulina en el plasma. Por consiguiente, no es muy probable que los efectos del glucagon anteriormente mencionados pueden ser atribuidos a una disminucion de secrecion insulinica.

Por consiguiente, se realizaron experimentos para determinar si el glucagon interferia con la accion de la insulina. Con este proposito, una infusion de insulina fue administrada junto con el glucagon y se determinaron los efectos sobre la utilizacion y la liberacion de la glucosa. La figura 11 muestra los resultados de un experimento de este tipo. Se puede ver que el aumento de la glucemia es mucho menor que con glucagon solamente. Se puede observar que el mayor incremento de la captacion de la glucosa se halla durante infusiones combinadas de insulina y glucagon, y este efecto disminuye durante la infusion de glucagon solamente.

Para poder apreciar mejor el efecto de la insulina dada junto con una infusion de glucagon, los valores de captacion de glucosa observa-

des en uno de estos experimentos fueron comparados con los obtenidos al administrar glucagon solo, lo cual se observa en la figura 12. Estos valores de captación de la glucosa fueron corregidos a una glucemia standard, según ha sido descrito en la figura 8. Se puede apreciar que la insulina sigue siendo eficaz en producir un aumento de la captación de la glucosa. Sin embargo, esta comparación no indica si la insulina administrada fue capaz de superar completamente la inhibición de la utilización de la glucosa producida por el glucagon.

La eficacia de la insulina en este sentido, fue estudiada comparando la captación de glucosa durante una infusión de insulina (0.12 U/Kg/Hr) dada conjuntamente con glucagon (4V/Kg/Hr), con la captación de glucosa durante una infusión de insulina (0.1 U/Kg/Hr) combinada con una infusión de glucagon (325mg/Kg/Hr). Los valores experimentales hallados fueron corregidos a una glucemia de 100mg/100ml y los resultados se detallan en las figuras 13 y 14. La figura 13 indica la menor diferencia y la figura 14 la mayor diferencia obtenida entre valores de utilización de glucosa hallados con infusiones de insulina con glucagon e insulina con glucosa. Es evidente que, aunque la insulina sigue siendo eficaz en aumentar la utilización de la glucosa, este efecto es disminuido por el glucagon. Debe hacerse notar que la glucosa fue administrada únicamente en cantidad suficiente para evitar un descenso de la glucemia. Si se hubiese dado una cantidad suficiente de glucosa como para obtener una glucemia semejante a la obtenida durante la infusión de insulina con glucagon, el valor de la utilización de glucosa hubiese sido mucho más elevado y el contraste con el glucagon hubiera sido mayor aun.

### **E. Discusion y Conclusiones**

La propiedad hiperglucemiante del glucagon inyectado ha sido ampliamente documentada. El aumento de la glucemia que se observa podría deberse tanto a una mayor produccion de glucosa hepatica, como a una disminucion de la utilizacion de la glucosa por los tejidos, o ambos. Los estudios que aqui se presentan indican que ambos factores contribuyen al aumento de la glucemia. Se ha demostrado que la infusion de glucagon produce un incremento inmediato de la liberacion de glucosa. Este efecto se produce con dosis muy pequenas de glucagon  $IV/Kg/Hr$ , que es del mismo orden de magnitud que la dosis minima efectiva de la insulina ( $0.025 U/Kg/Hr$  e  $IV/Kg/Hr$ ). La mayor produccion de glucosa esta acompañada por una pérdida acentuada de glucogeno hepatico, y esta es probablemente la mayor fuente de la glucosa liberada. Con la administracion prolongada de glucagon, la reserva de glucogeno puede ser agotada completamente, no obstante, el glucagon sigue produciendo una mayor liberacion de glucosa, posiblemente por su accion estimulante sobre la gluconeogenesis.

Los efectos sobre la utilizacion de la glucosa siguen siendo discutidos en la literatura. El problema surge por la dificultad de estudiar este proceso metabolico y la dificultad de interpretar los resultados. La mayoria de los estudios sobre la utilizacion de la glucosa in vivo, fueron realizados determinando diferencias de glucemia en distintas condiciones experimentales (51, 52, 53). Las conclusiones sobre los efectos del glucagon in vitro tambien han sido contradictorias (49, 50). Mediante el uso de la glucosa radiactiva fue posible obtener datos mas directos sobre la captacion de glucosa plasmatica (utilizacion de glucosa).

Este trabajo demuestra que la infusion de glucagon aumenta la utilizacion de glucosa a valores mayores que los normales. Sin embargo, como este aumento de la captacion esta asociado con una hipergluceemia, pareceria mas apropiado comparar estos valores con la captacion de

glucosa durante una glucemia similar producida por una infusion de glucosa.

Comparaciones hechas en estas condiciones han demostrado que la utilizacion de glucosa era significativamente menor en los animales que recibian glucagon, que en los que recibian glucosa. De modo que es evidente que el glucagon produjo una inhibicion relativa de la utilizacion de la glucosa. Se ha tratado de explicar el mecanismo por el cual el glucagon produce una inhibicion relativa de la captacion de la glucosa. Una posibilidad seria que el glucagon impida el aumento de secrecion de insulina, normalmente inducida por una hipoglucemia. Tambien seria factible que el glucagon inhiba la eficacia de la insulina de aumentar la utilizacion de la glucosa y de esta manera limitar la utilizacion de glucosa por una accion anti-insulinica. Ambas posibilidades han sido investigadas.

Las concentraciones de insulina en plasma, durante glucemias similares, producidas, ya sea por glucosa o glucagon, indican que el glucagon no interfiere con el aumento de secrecion de insulina. Por consiguiente, es mas probable que el glucagon ejerza su influencia sobre la captacion de la glucosa por medio de una disminucion de la eficacia de la insulina de aumentar la captacion de glucosa. Se han obtenido pruebas mas directas en favor de esta conclusion, comparando los efectos de una infusion de insulina y glucagon con los de insulina y glucosa. La infusion de insulina con glucagon produjo un mayor aumento de utilizacion de glucosa que el aumento observado con glucagon solamente. Sin embargo, el incremento obtenido por la infusion combinada de insulina y glucagon era menor que el observado durante la infusion de insulina con glucosa. Aunque es evidente que el glucagon no es un antagonista muy potente de la insulina, es capaz de disminuir la eficacia de la insulina de aumentar la utilizacion de glucosa.

Conviene considerar ahora los posibles sitios donde la insulina

y el glucagon ejercen su antagonismo. Debe notarse la accion que ejercen estos dos agentes sobre el higado, ya que sus efectos sobre algunos de los procesos metabolicos son opuestos. Estudios recientes (57) han revelado que una infusion de insulina dada junto con una cantidad suficiente de glucosa para evitar un descenso de la glucemia, disminua la liberacion de glucosa hepatica. Ademas, se ha observado (73) que esta infusion de insulina con glucosa resultaba en un aumento significativo de la incorporacion de glucosa plasmatica al glucogeno hepatico. Esta incorporacion representaba un 14% a 17% del aumento total de la captacion de glucosa. Sin duda estos valores son bajos, ya que es poco probable que la totalidad de glucosa captada por el higado fuese incorporada al glucogeno hepatico. En estudios anteriores se ha encontrado (74) que aproximadamente el 45% del total de la glucosa captada se convierte rapidamente a anhidrido carbonico. Suponiendo que la misma fraccion de la glucosa captada por el higado fue oxidada a anhidrido carbonico y que la glucosa incorporada al glucogeno hepatico represente el 55% restante, entonces la captacion de glucosa por el higado durante una infusion de insulina con glucosa representaria aproximadamente el 30% del total de la utilizacion de glucosa. Como el glucagon activa la glucogenolisis, se podria razonar que este efecto impediria la accion de la insulina de aumentar la captacion de glucosa por el higado. Por consiguiente, esta accion antagonista en el higado quedaria reflejada por una disminucion del total de la captacion de glucosa por los tejidos observada durante la infusion de glucagon solamente y durante la infusion de insulina con glucagon. Esta posibilidad puede ser comprobada determinando la incorporacion de glucosa plasmatica al glucogeno hepatico durante una infusion de glucagon, pero todavia no se han obtenido datos al respecto. Tambien seria factible que el antagonismo entre la insulina y el glucagon ocurra en otros puntos, pero todavia no hay pruebas concluyentes.

Una explicacion bioquimica del antagonismo entre el glucagon y la



insulina resulta mas dificil. Esto fue un problema evidente en los estudios de Miller (75), sobre el higado aislado perfundido. Aunque este autor observe que la inhibicion del glucagon sobre la oxidacion della glucosa fue anulada por la insulina, resulta dificil interpretar estos efectos en terminos bioquimicos que explicarian los cambios observados en la utilizacion de la glucosa.

Queda por establecerse el papel fisiologico del glucagon. Como ha sido demostrado que un descenso de la glucemia estimula la secrecion del glucagon (27), resulta logico suponer que el glucagon actue como un agente que moviliza rapidamente las reservas de glucosa. En este respecto glucagon se asemeja a la adrenalina.

Sin embargo, en estudios de perfusion de higado se ha encontrado que el glucagon produce glucogenolisis en concentraciones fisiologicas, mientras que la adrenalina produce glucogenolisis solamente a concentraciones mucho mayores que las encontradas en mamiferos (76). La propiedad del glucagon de disminuir la eficacia de la insulina contribuiria a limitar la accion de la insulina, y de esta manera proteger el organismo de una hipoglucemia mas severa. Otras hormonas, como la cortisona y la hormona de crecimiento tambien sirven para limitar la eficacia de la insulina pero son mas lentas en la iniciacion de su efecto. Es posible que el glucagon tenga un papel de significado mayor, pero hasta la fecha su accion sobre el metabolismo de la glucosa parece ser el mas logico.

*Grabel Roth gel*

**TABLA 1****Concentracion de Glucosa en Plasma mg/100ml**

Tiempo(min)	0	<u>Infusion de glucosa 300mg/Kg</u>						
		10	20	30	45	60	75	90
<b>Perro 1</b>	102	129	132	130	127	129	112	111
" 2	103	125	125	123	118	114	95	97
" 3	100	124	134	132	132	134	107	103
" 4	105	127	131	134	131	126	104	103
" 5	98	122	125	125	122	117	103	100
" 6	85	98	101	102	101	106	94	92
" 7	89	115	127	134	133	127	97	95
" 8	101	115	119	122	124	123	103	102
<b>Promedio</b>	98	119	124	125	124	122	102	100

**Concentracion de Insulina en Plasma  $\mu$ U/ml**

Tiempo(min)	0	<u>Infusion de glucosa 300mg/Kg</u>						
		10	20	30	45	60	75	90
<b>Perro 1</b>	17	40	38	43	36	22	18	10
" 2	29	67	67	75	50	38	15	22
" 3	8	26	88	40	37	32	14	12
" 4	51	61	67	77	86	82	45	47
" 5	14	35	28	37	38	27	9	12
" 6	29	31	32	28	32	43	37	35
" 7	6	22	30	31	31	48	2	8
" 8	16	20	48	28	36	51	21	9
<b>Promedio</b>	22	39	50	45	43	42	20	20

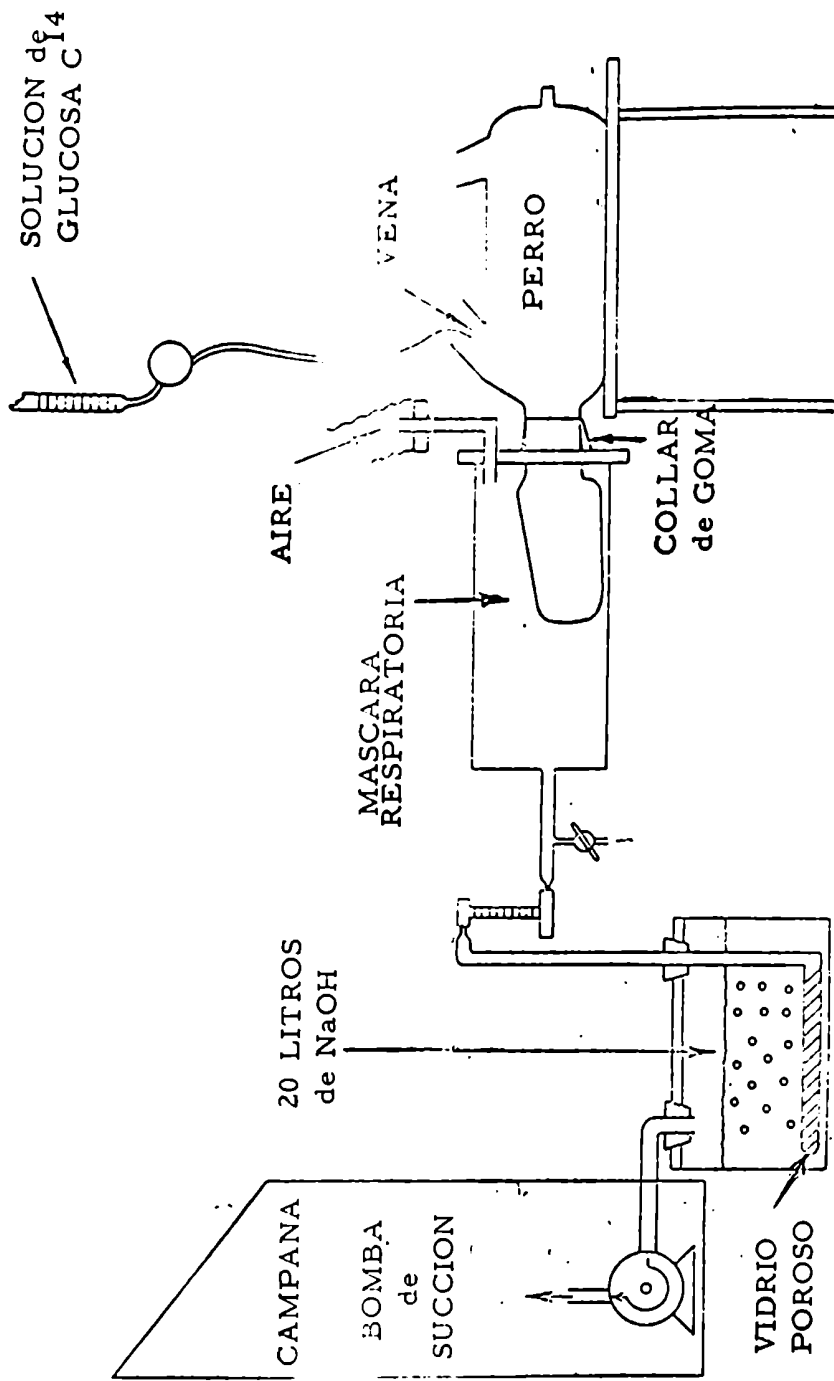
**TABLA II****Concentracion de Glucosa en Plasma mg/100ml**

Tiempo(min)	0	<u>Infusion de glucagon 1µg/Kg</u>						
		10	20	30	45	60	75	90
<b>Perro 1</b>	107	132	145	148	143	135	110	108
" 2	107	132	150	161	152	145	116	111
" 3	103	123	141	147	154	136	99	95
" 4	91	118	122	113	102	88	83	90
" 5	105	125	121	139	127	119	102	103
<b>Promedio</b>	103	126	136	142	136	125	102	101

**Concentracion de Insulina en Plasma µU/ml**

Tiempo(min)	0	<u>Infusion de glucagon 1µg/Kg</u>						
		10	20	30	45	60	75	90
<b>Perro 1</b>	21	61	40	73	52	43	7	25
" 2	30	23	53	59	67	41	29	27
" 3	7	26	48	49	81	40	14	16
" 4	30	78	116	146	80	55	17	13
" 5	41	40	62	25	33	23	12	8
<b>Promedio</b>	26	46	64	70	65	40	16	18

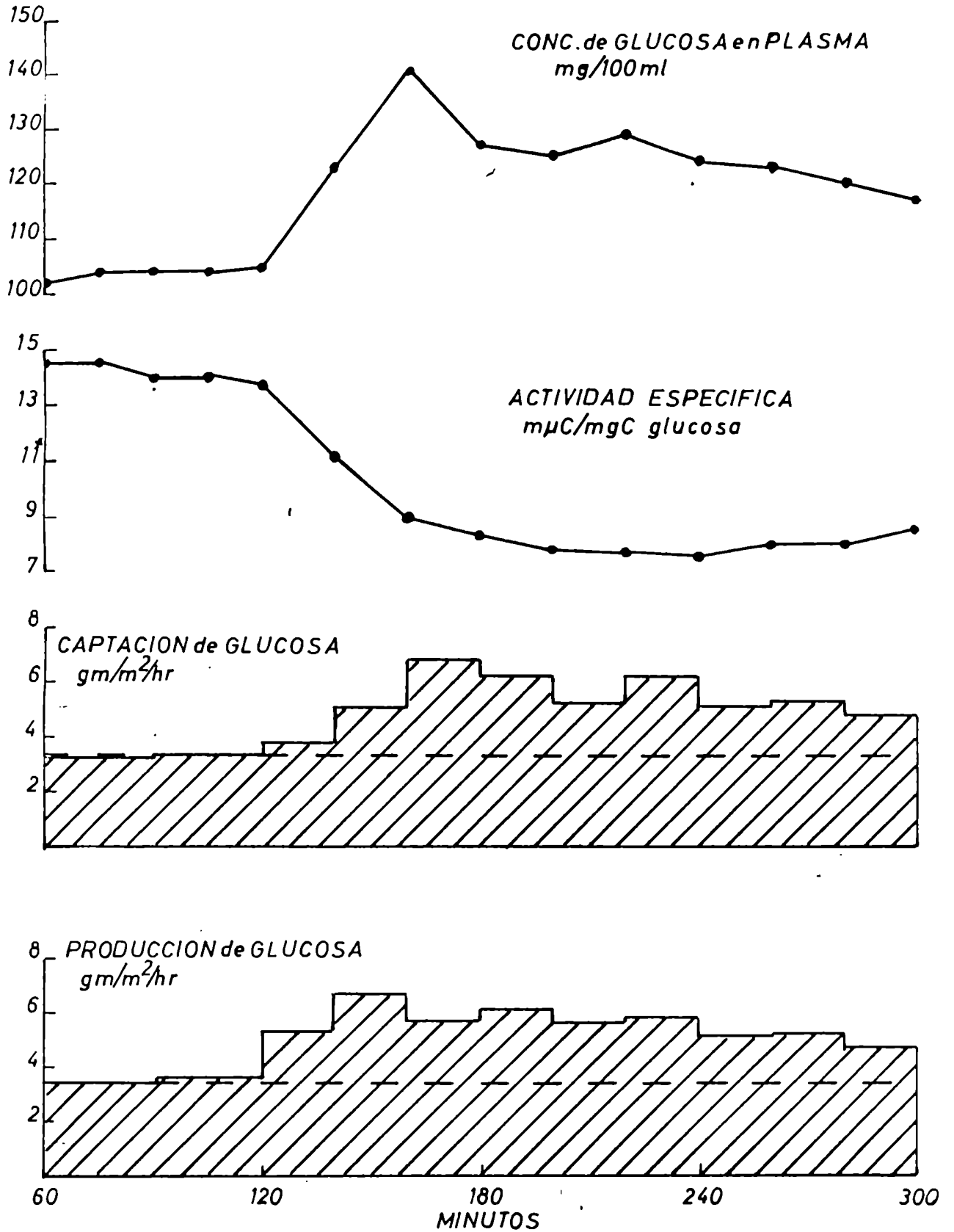
FIG. 1



**FIGURA 2. Efectos de una infusion continua de glucagon (1γ/Kg/Hr) sobre la glucemia, la actividad especifica de la glucosa plasmatica, la captacion de glucosa por los tejidos y la produccion de glucosa hepatica. A cero minutos se dio una inyeccion de glucosa C<sup>14</sup> de suficiente actividad como para marcar el pool de glucosa. Al mismo tiempo fue iniciada una infusion de glucosa C<sup>14</sup> para mantener constante la actividad especifica de la glucosa en plasma. La linea de puntos a traves del grafico representa valores de control de la produccion y de la captacion, respectivamente, obtenidos durante el periodo de dos horas anteriores a la iniciacion de la infusion de glucagon.**

FIG. 2

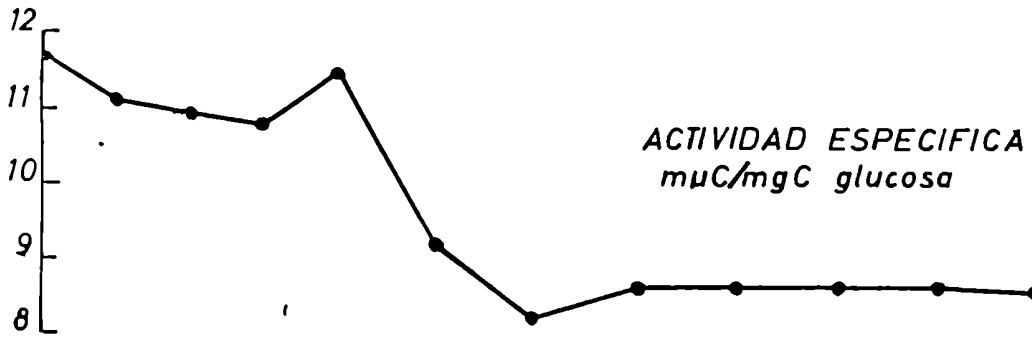
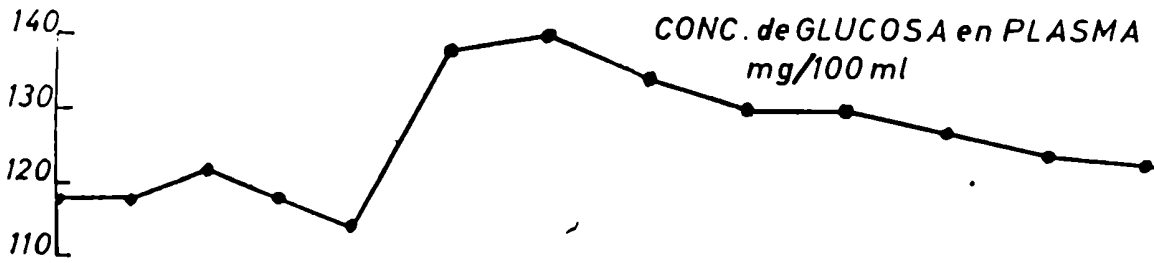
GLUCAGON



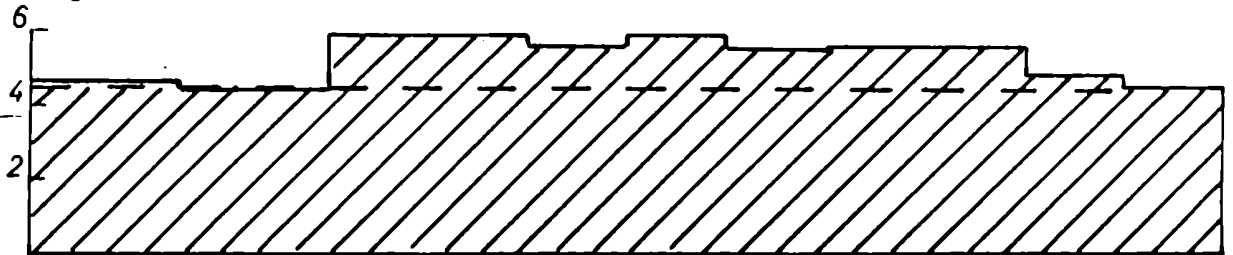
**FIGURA 3. Concentracion y actividad especifica de la glucosa plasmatica y captacion y produccion de glucosa observados en el curso de una infusion de glucagon administrada durante 180 minutos a razon de (1 $\gamma$ /Kg/Hr).**

FIG. 3

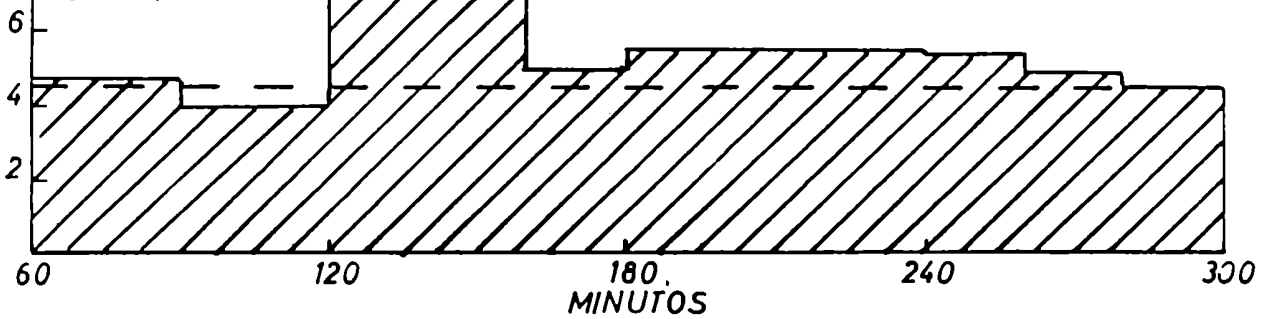
GLUCAGON



CAPTACION de GLUCOSA  
gm/m<sup>2</sup>hr



PRODUCCION de GLUCOSA  
gm/m<sup>2</sup>hr

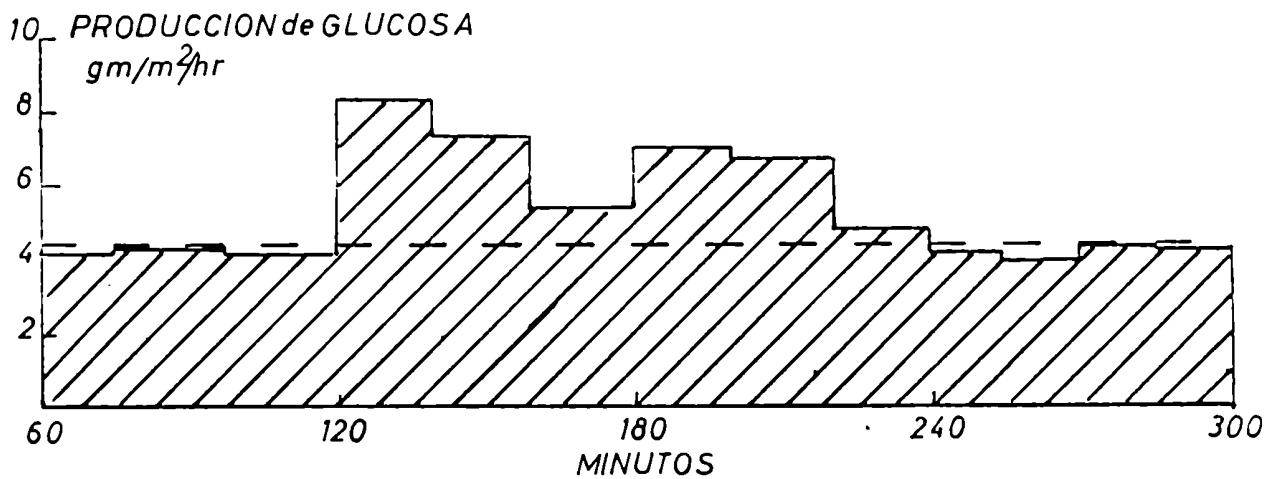
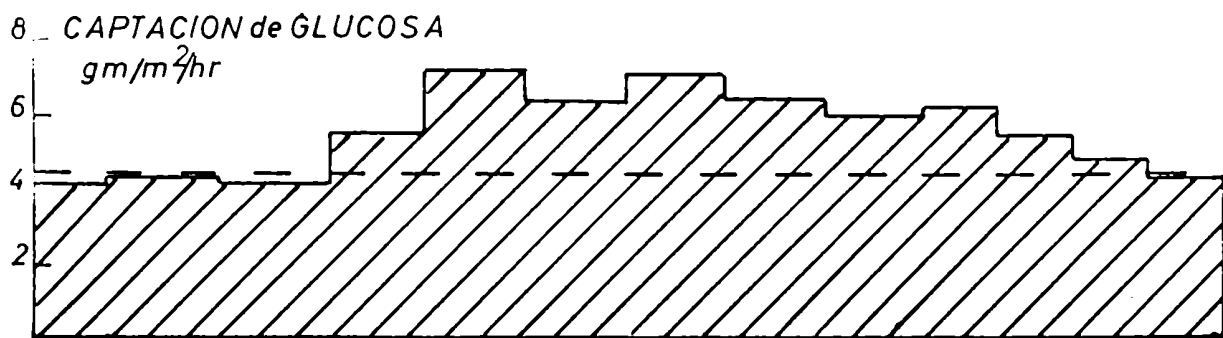
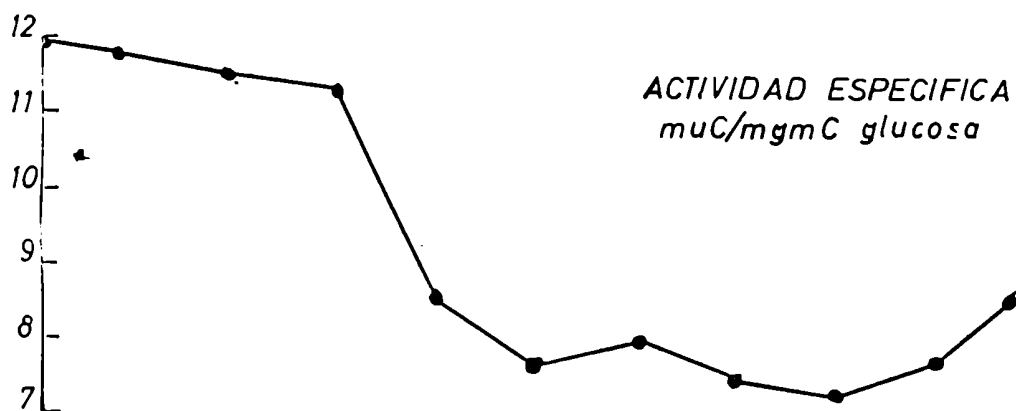
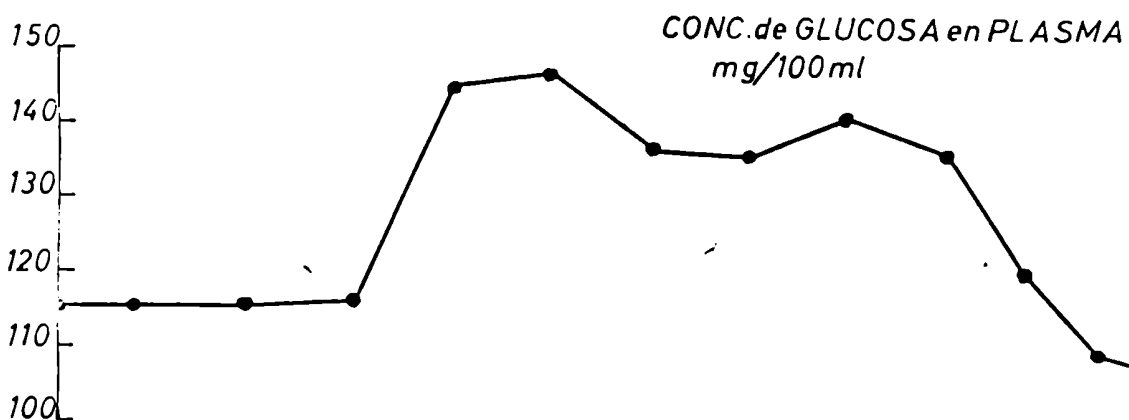




**FIGURA 4. Concentraci3n y actividad especifca de la glucosa plasmatica y captaci3n y producci3n de glucosa observados en el curso de una infusi3n de glucagon administrada durante 120 minutos a rasi3n de (2 $\mu$ g/Hr).**

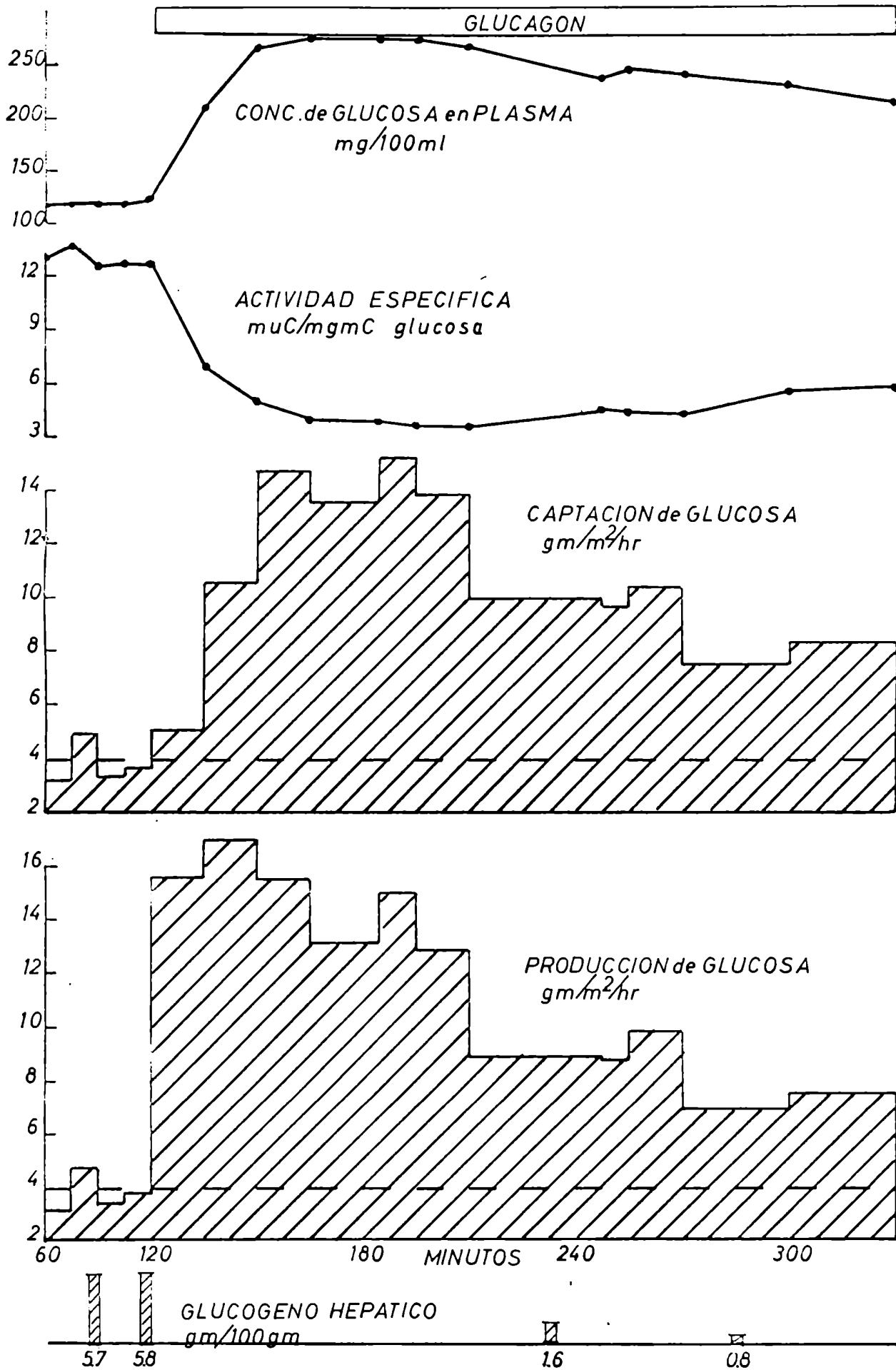
FIG. 4

GLUCAGON



**FIGURA 5. Efectos que produce una infusion de glucagon, administrada a rason de (4 $\mu$ /Kg/Hr) sobre la gluemia y la actividad especifica de la glucosa, y las variaciones producidas en la liberacion y la captacion de la glucosa. La variacion del contenido de glucogeno hepatico durante el transcurso de la infusion de glucagon, tambien ha sido detallada.**

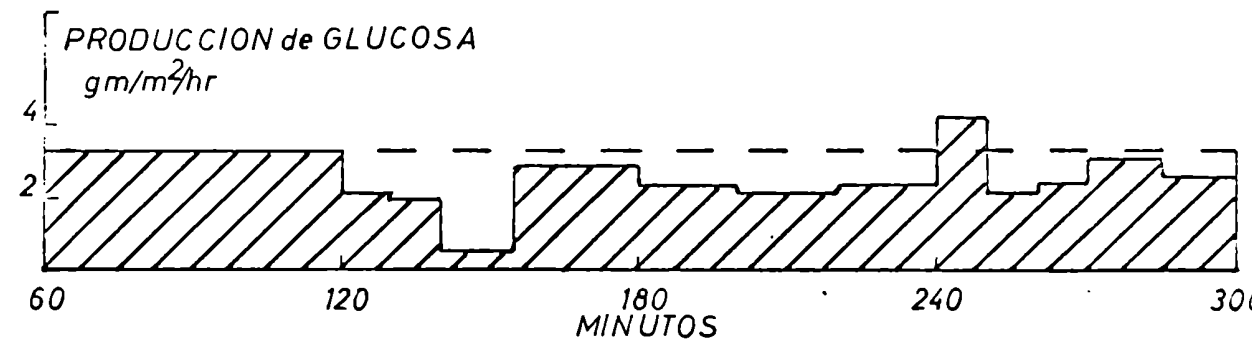
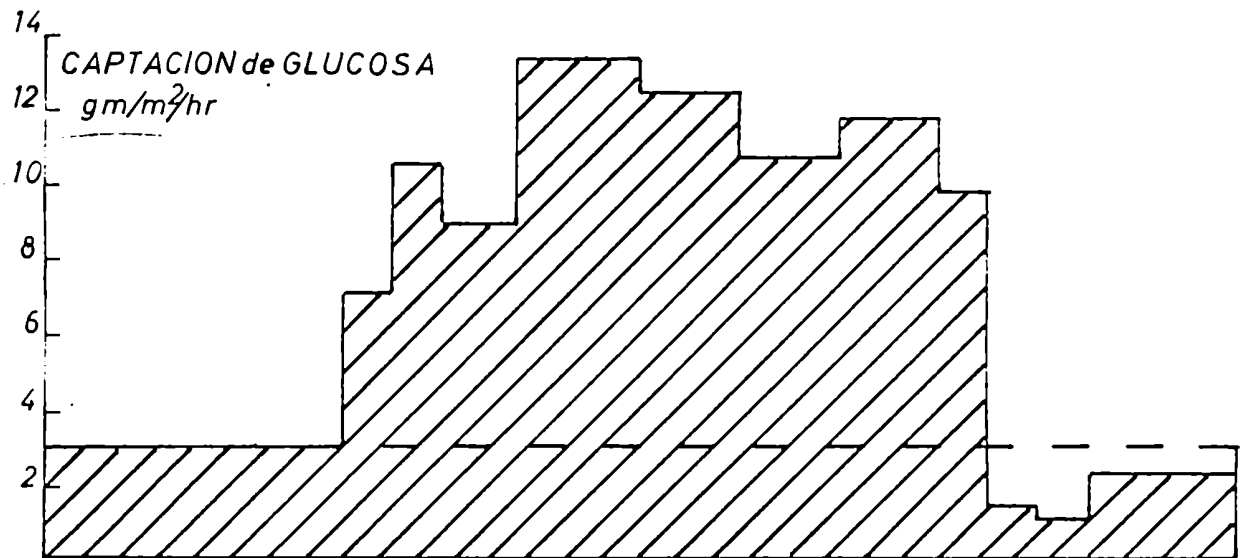
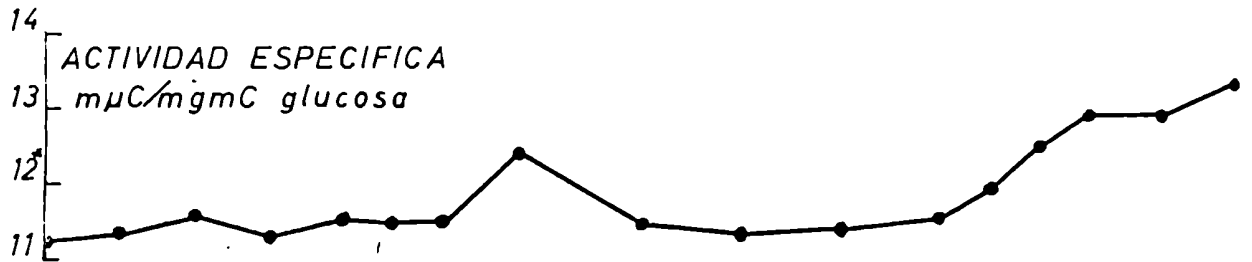
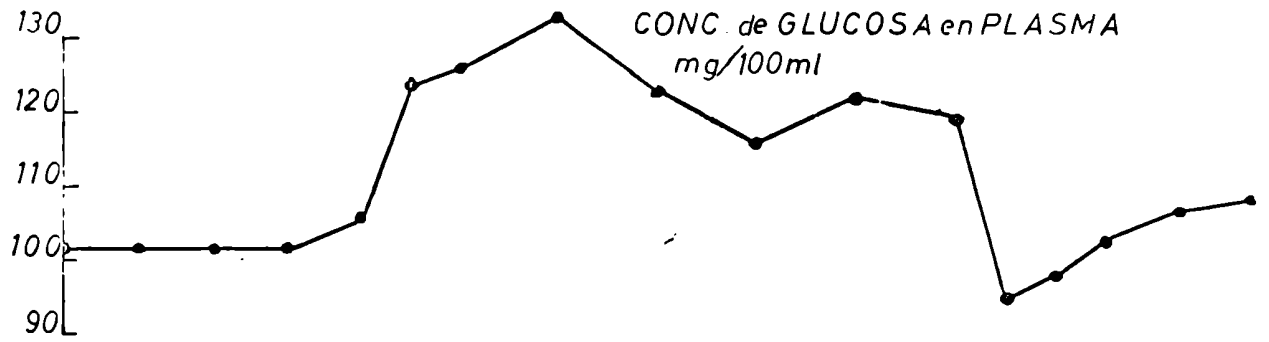
FIG. 5



**FIGURA 6. Valores de glucemia y actividad específica de la glucosa, y captación y producción de glucosa, observados en el transcurso de una infusión de glucosa dada a razón de 364mg/Kg/Hr. La glucosa administrada fue de la misma actividad específica que la glucosa plasmática.**

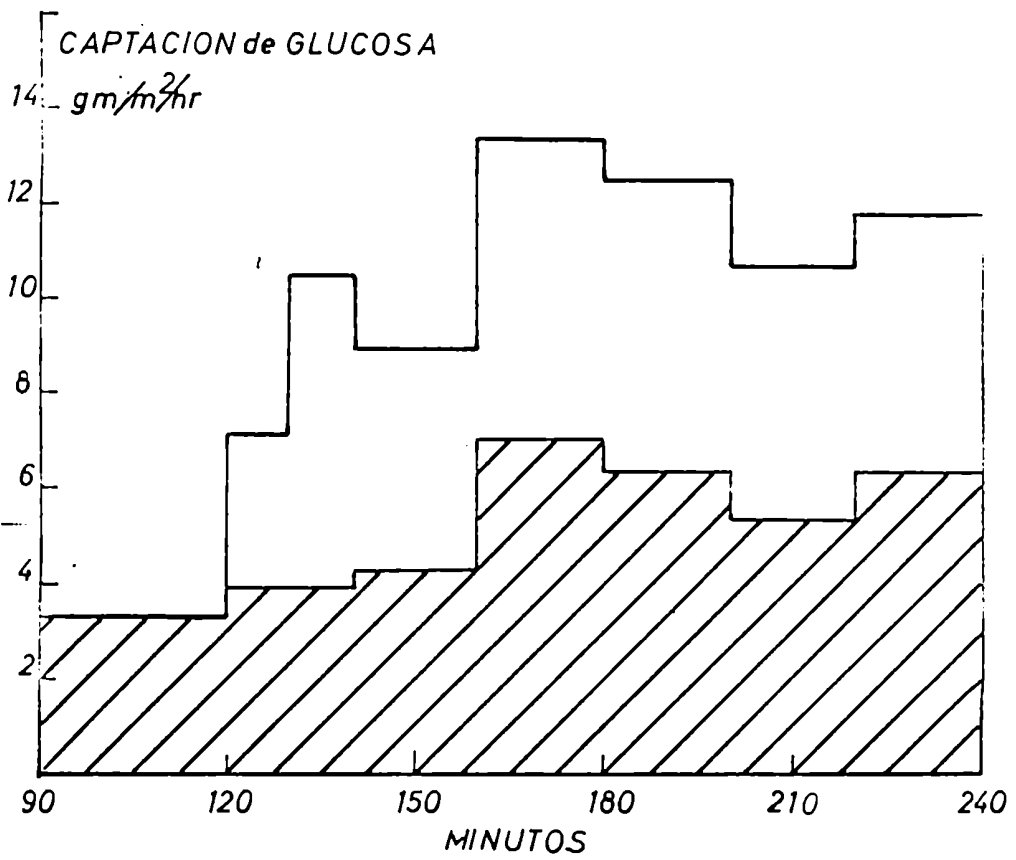
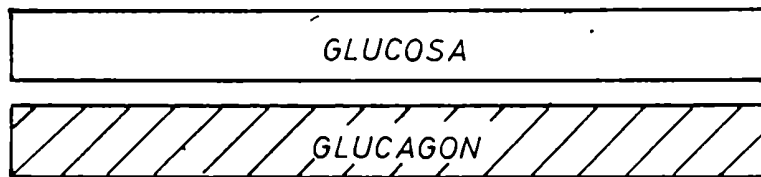
FIG. 6

GLUCOSA



**FIGURA 7. Comparacion de la utilizacion de la glucosa obtenida mediante una infusion de glucagon (FIG. 2) con la utilizacion observada durante la administracion de una infusion de glucosa (FIG. 6). Las glucemias fueron similares en ambos experimentos.**

FIG. 7

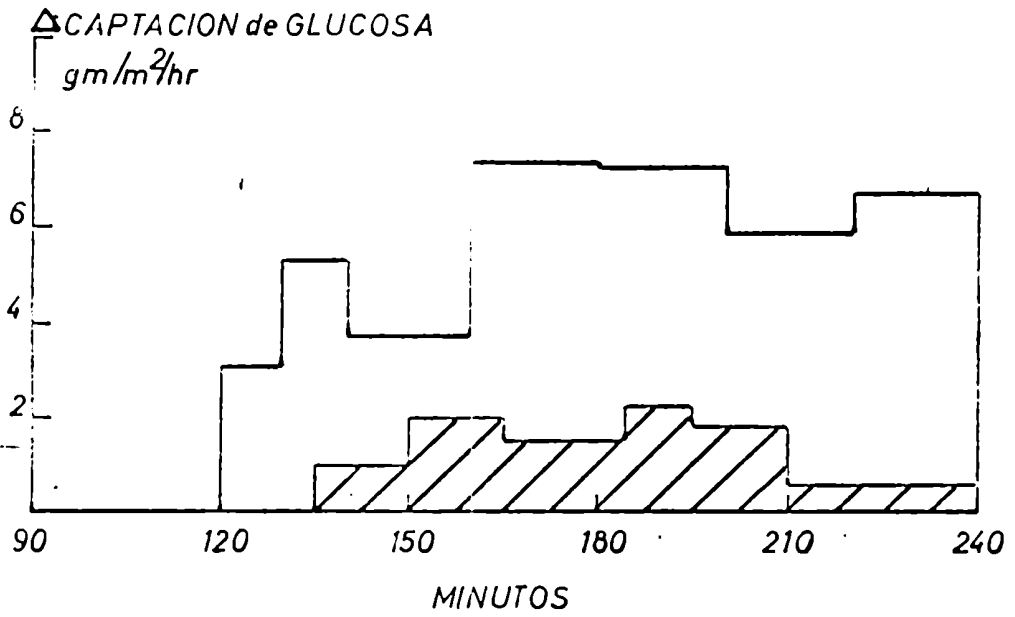
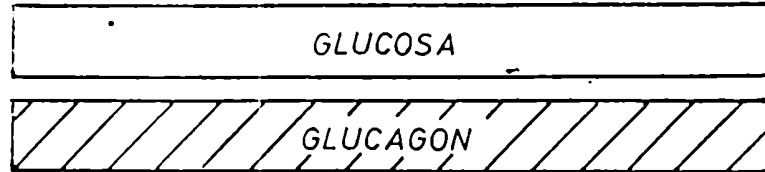




**FIGURA 8.** El incremento de la captación de glucosa, observado en el transcurso de una infusión de glucagón (4 $\mu$ /Kg/Hr) se compara con el aumento de la captación de glucosa observado en otro experimento en el cual se dio una infusión de glucosa (364mg/Kg/Hr). Los valores de captación han sido corregidos a una glucemia standard de 100mg per 100ml de plasma, en la siguiente forma:

$$\text{Captación a } 100\text{mg}/100\text{ml} = \frac{\text{captación observada}}{\text{glucemia}} \times 100$$

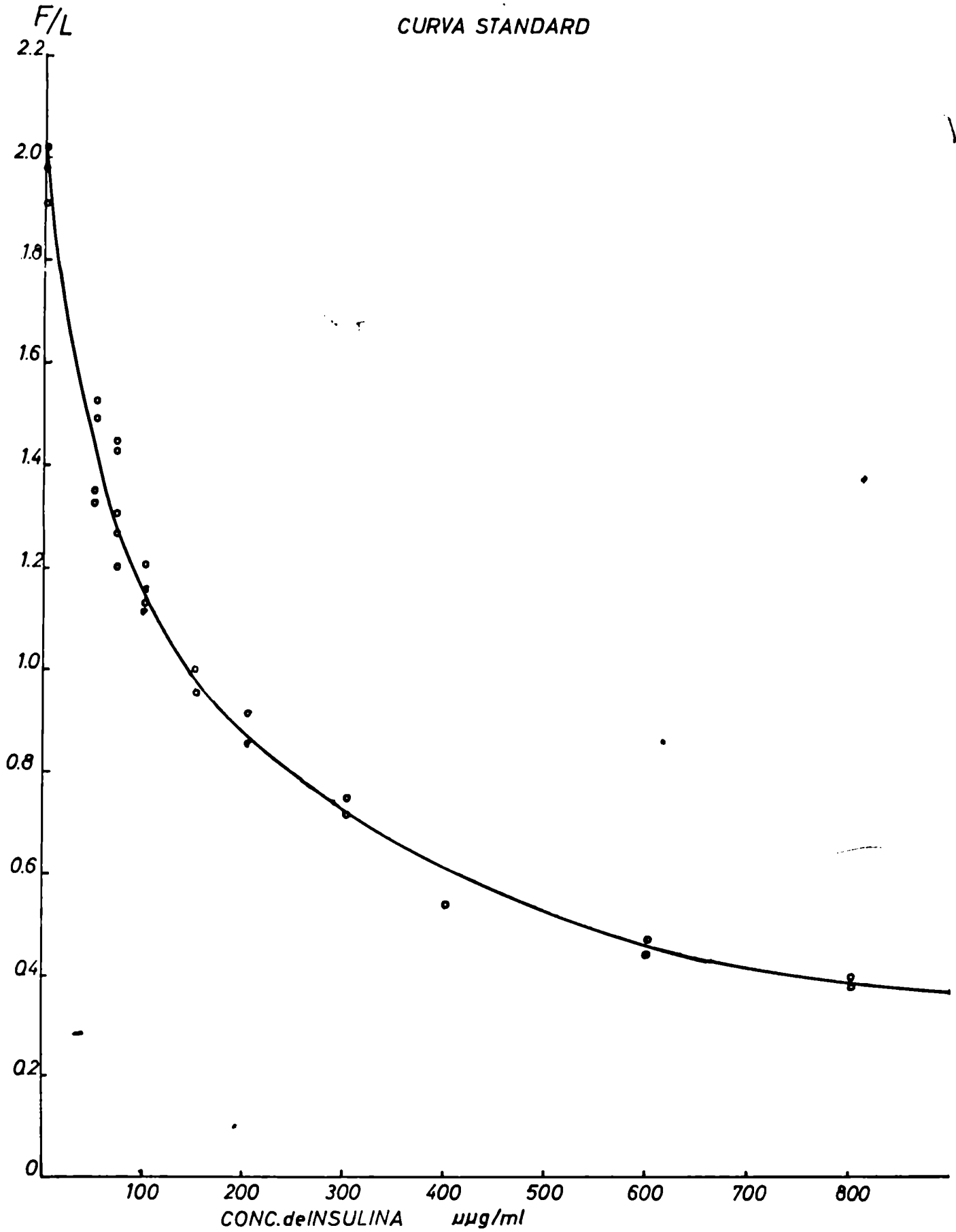
FIG. 8



**FIGURA 9.**  $F/L$  representa la relación entre insulina  $I^{131}$  fijada con anticuerpo ( $F$ ) e insulina  $I^{131}$  libre ( $L$ ). Se observa que al agregar cantidades conocidas de insulina sin marcar, la relación  $F/L$  varía. El dosaje de insulina en las muestras de plasma se efectúa según la descripción en la sección Métodos. La concentración de insulina se obtiene leyendo en abscisa el valor correspondiente al  $F/L$  de la muestra de plasma.

FIG. 9

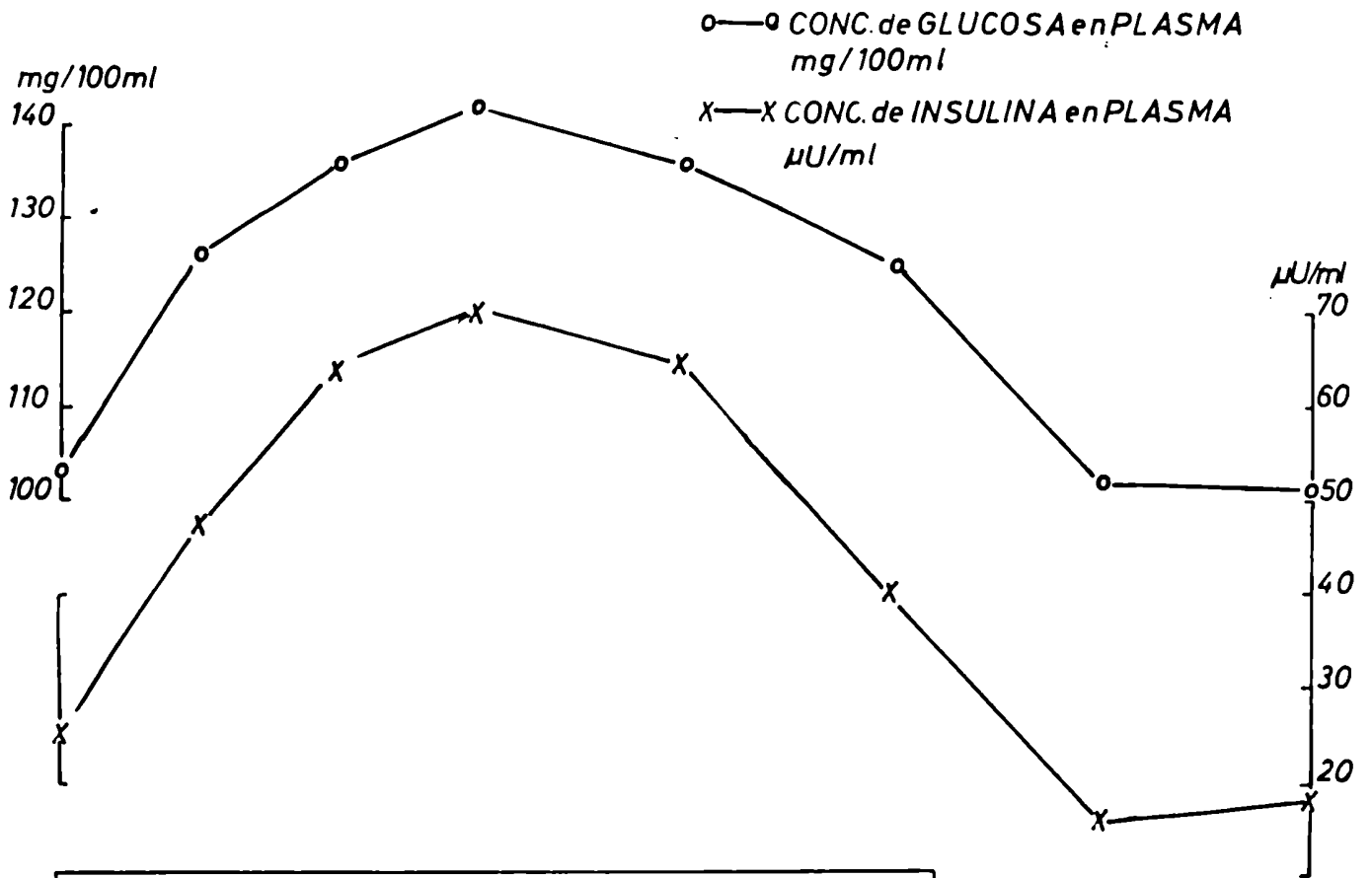
CURVA STANDARD



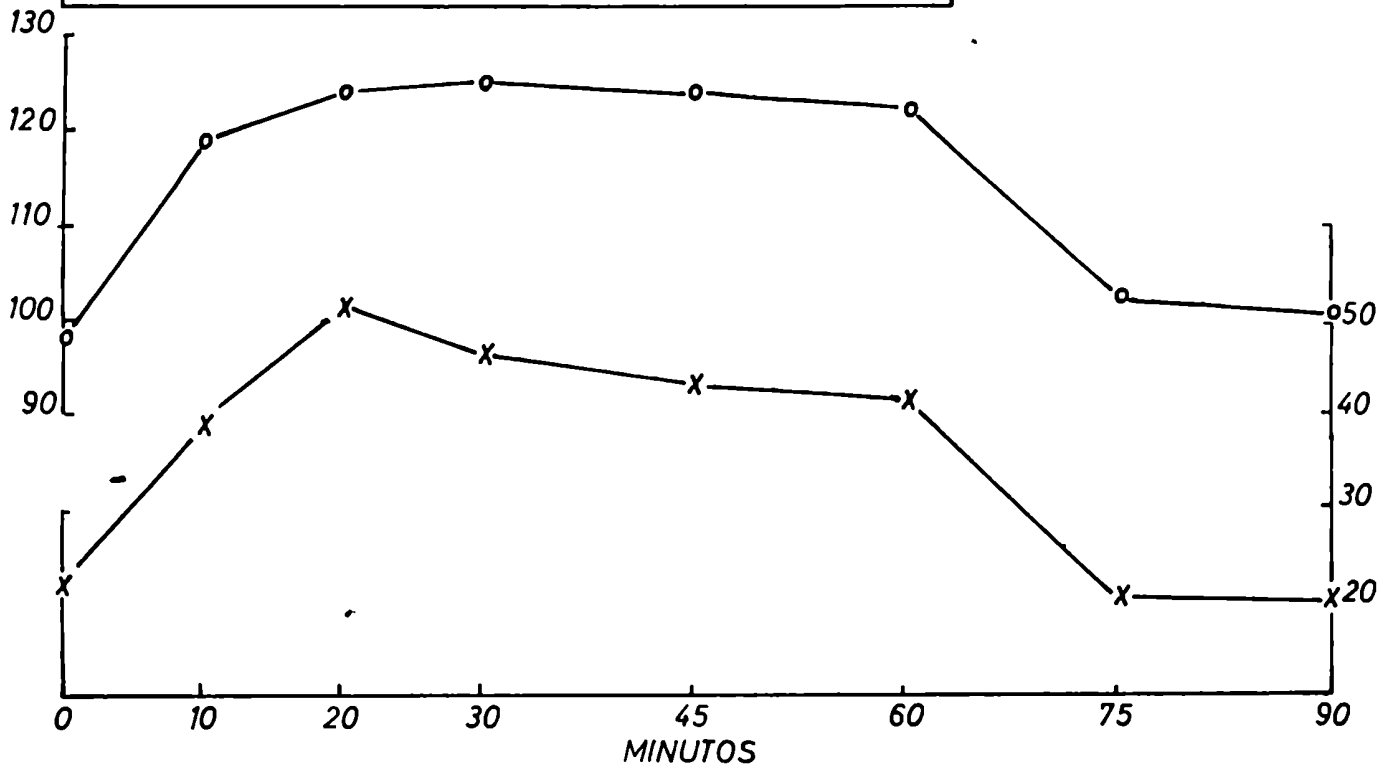
**FIGURA 9. F/L representa la relación entre insulina  $I^{131}$  fijada con anticuerpo (F) e insulina  $I^{131}$  libre (L) . Se observa que al agregar cantidades conocidas de insulina sin marcar, la relación F/L varía. El dosaje de insulina en las muestras de plasma se efectúa según la descripción en la sección Métodos. La concentración de insulina se obtiene leyendo en abscisa el valor correspondiente al F/L de la muestra de plasma.**

FIG. 10

GLUCAGON 1 $\mu$ g/Kg/Hr

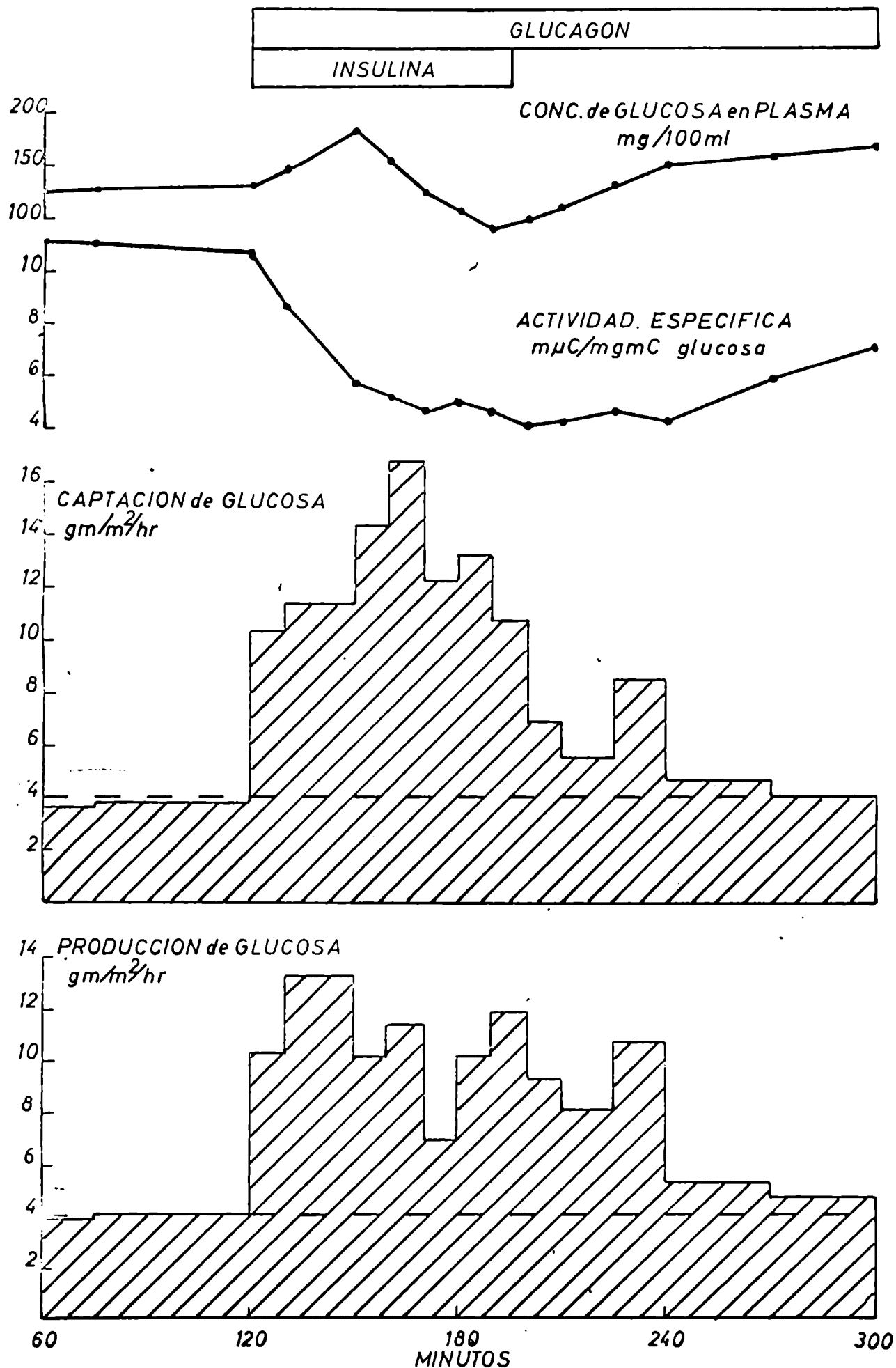


GLUCOSA 300 mg/Kg/Hr



**FIGURA 11. Efectos que produce una infusion de insulina (0.12 U/Kg/Hr) dada simultaneamente con una infusion de glucagon (4 $\mu$ /Kg/Hr) sobre la glucemia, actividad especifica de la glucosa plasmatica, captacion y produccion de glucosa.**

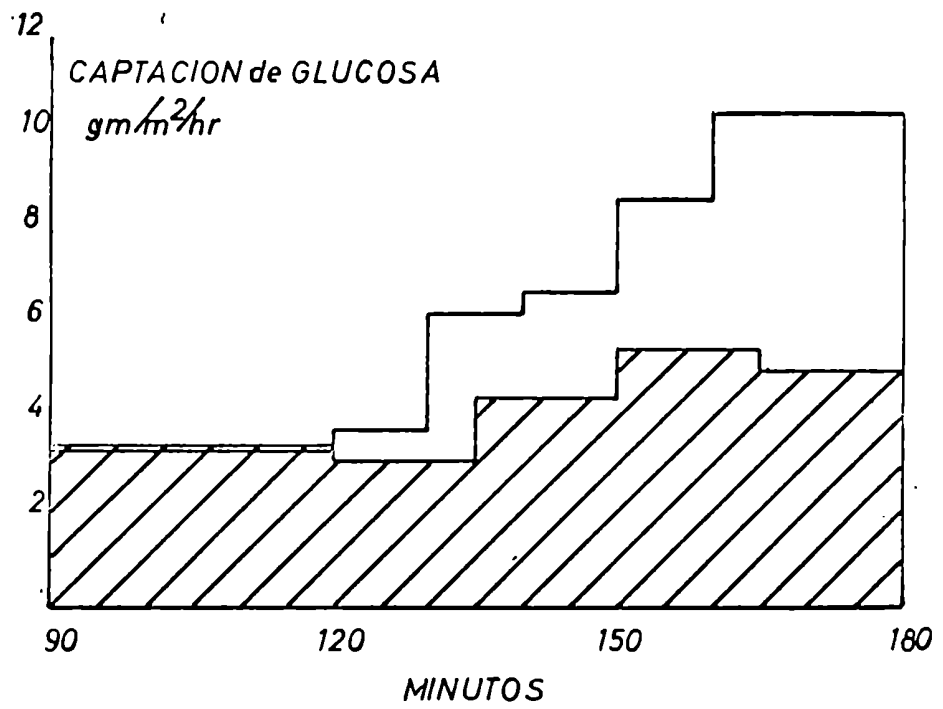
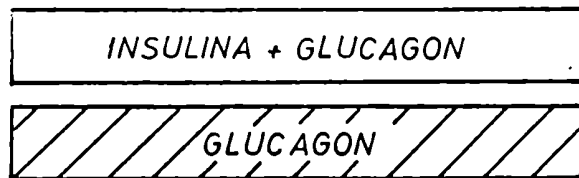
FIG. 11





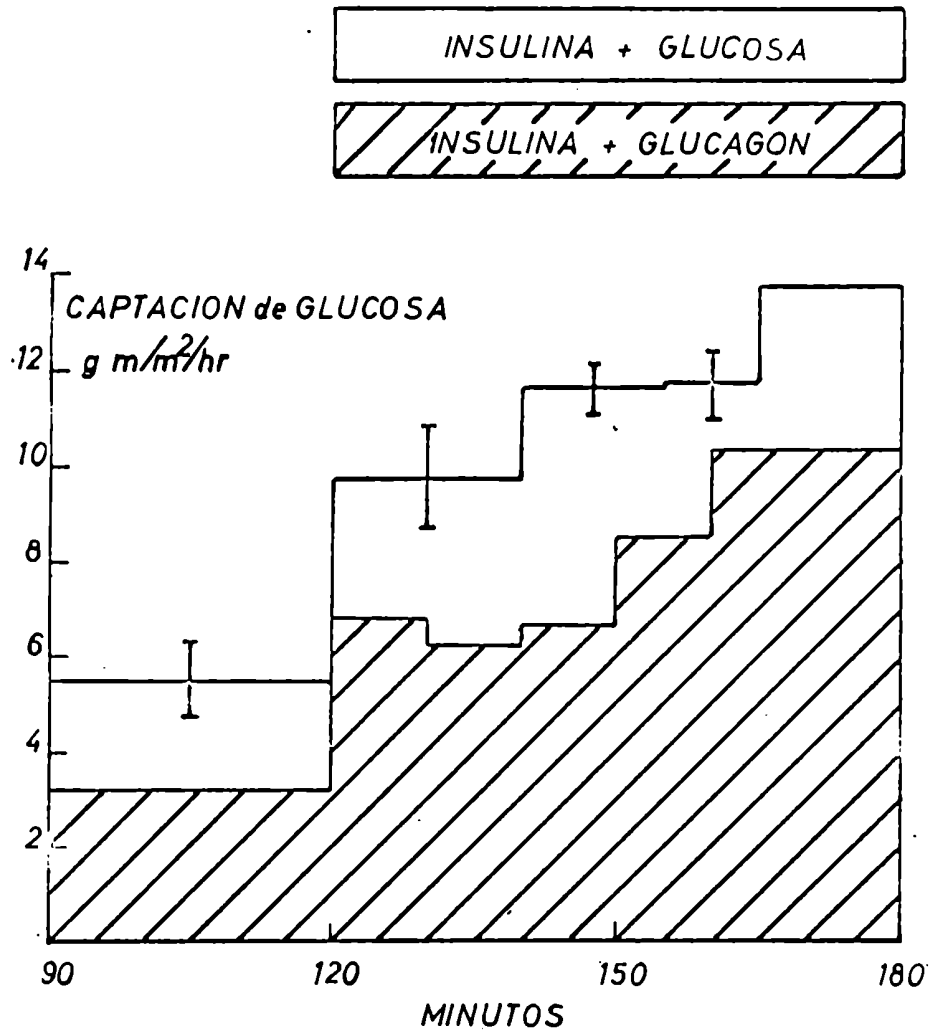
**FIGURA 12. Valores de captación obtenidos durante una infusión de glucagón (4 $\mu$ /Kg/Hr) se comparan con los hallados durante infusiones simultáneas de glucagón (4 $\mu$ /Kg/Hr) e insulina (0.1U/Kg/Hr). Los valores han sido corregidos para una glucemia estándar de 100mg/100ml de plasma, igual que en la FIG. 8.**

FIG. 12



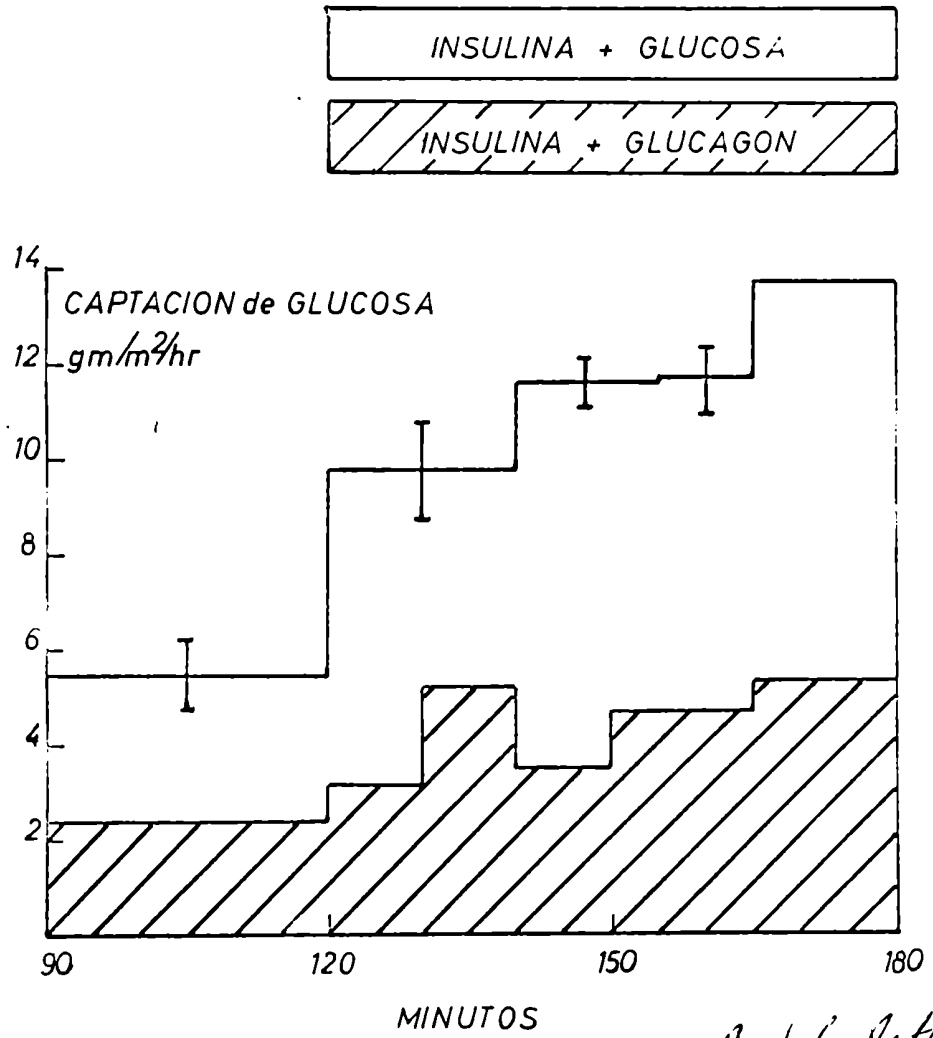
**FIGURA 13. Comparacion de valores de utilizacion de glucosa obtenidos en dos tipos de experimentos, en uno se dio infusiones simultaneas de insulina (0.12 U/Kg/Hr) y glucagon (4 $\gamma$ /Kg/Hr) y en otro, se administraron infusiones combinadas de insulina (0.1 U/Kg/Hr) y glucosa (315mg/Kg/Hr). Los valores de utilizacion fueron corregidos para una glucemia standard de 100mg/100ml.**

FIG.13



**FIGURA 14. Comparación de valores de utilización de glucosa obtenidos en dos tipos de experimentos, en uno se dio infusiones simultáneas de insulina (0.12 U/Kg/Hr) y glucagón (4 $\mu$ /Kg/Hr) y en otro se administraron infusiones combinadas de insulina (0.1 U/Kg/Hr) y glucosa (315mg/Kg/Hr). Los valores de utilización fueron corregidos para una glucemia standard de 100mg/100ml.**

FIG. 14



*Zsabel Rathgeb*

BIBLIOGRAFIA

1. Banting, F. G. and C. H. Best: Pancreatic extracts, J. Lab. and Clin. Med., 7: 464, 1922.
2. Buerger, M., und H. Kramer: Ueber die Wirkungsver-schiedenheit technischer Insuline und kristallisierter Praeparate be-zueglich der primären Insulinhyperglykaemie, Arch. Experim. Pathol. and Pharmacol., 156: 1, 1930.
3. Collip, J. B.: Delayed manifestation of the physiologic effects of insulin following the administration of certain pancreatic extracts, Am. J. Physiol., 63: 391, 1923.
4. Marlin, J. R., H. D. Clough, C. B. Gibbs, and A. M. Stokes: Aqueous extracts of pancreas, J. Biol. Chem., 56: 253, 1923.
5. Abel, J. J., E. M. K. Gelling, C. A. Reuiller, F. K. Bell, and O. Wintersteiner: Crystalline insulin, Pharmacol. and Exper. Therap., 31: 65, 1927.
6. Gelling, E. M. K., and A. M. de Lawder: Studies on crystalline insulin, J. Pharmacol. and Exper. Therap., 39: 369, 1930.
7. Buerger, M.: Die klinische Bedeutung der initialen Insulin-hyperglykaemie, Klin. Wochenschrift, 9: 104, 1930.
8. Collins, W. S., and J. R. Marlin: Hyperglycemia following the portal injection of insulin, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 26: 485, 1929.
9. Foa, P. P., H. R. Weinstein, and J. A. Smith: Secretion of insulin and of a hyperglycemic substance studied by means of pan-creatic-femoral cross-circulation experiments, Am. J. Physiol., 157: 197, 1949.
10. Fodden, J. H., and W. O. Read: Isolation of a hyperglycemic phosphorylase-reactivating substance from canine pancreatic blood, Am. J. Physiol. 182: 513, 1955.
11. Sopp, J. W.: Ueber das Glukagen die Hyperglykaemieszierende Substanz des Pankreas, Ztschr. ges. Exper. Med., 96: 817, 1935.

12. de Duve, Chr., and C. A. Vuylsteke: Purification of glucagon, Arch. Intern. Physiol., 61: 107, 1953.
13. Staub, A., L. Sinn, and O. K. Behrens: Purification and crystallization of glucagon, J. Biol. Chem., 214: 619, 1955.
14. Bremer, W. W., L. G. Sinn, A. Staub, and O. K. Behrens: The amino acid sequence of glucagon, Diab., 6: 234, 1957.
15. Sutherland, E. W., and Chr. de Duve: Origin and distribution of the HGF of the pancreas, J. Biol. Chem., 175: 663, 1948.
16. Benecosse, S. A., and J. Frei: Relation of glucagon to A cells of the pancreas, Sec. Exper. Biol. and Med., 91: 589, 1956.
17. Ferner, H.: Glucagon and insulin, Am. J. Digest Diseases; 20: 301, 1953.
18. Fedden J. H.: The enterochromaffin and pancreatic alpha cells: a comparison, Am. J. Clin. Path., 23: 994, 1953.
19. Sutherland, E. W., F. C. Cori, R. Haynes, and N. S. Olsen: Extraction and purification from insulin and gastric mucosa of the HGF, J. Bio. Chem., 180: 825, 1949.
20. Sirek, O. V., A. Sirek, and C. H. Best: Pituitary growth hormone and the question of pancreatic secretion of glucagon, Am. J. Physiol., 188: 17, 1957.
21. Ellis, S., H. L. Anderson, and M. C. Collins: Pharmacologic differentiation between epinephrine- and HGF-hyperglycemias: Application in analysis of cobalt-hyperglycemia, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 84: 383, 1953.
22. Sirek, A., E. Geerling, and H. Declan: The nature of the hyperglycemic substance released by growth hormone, Excerpta Medica, 74: 139, 1964.
23. Thoregood, E., and B. Zimmermann: The effects of pancreatectomy on glycosuria and ketosis in dogs made diabetic by alloxan, Endocrinol., 37: 191, 1945.



24. Foa, P. P., L. Santamaria, H. R. Weinstein, E. Bergers, and J. A. Smith: Secretion of HGF in normal dogs, Am. J. Physiol., 171: 32, 1952.

25. Mahman, M. H., R. S. Mahman, and E. W. Sutherland: Presence of glucagon-like material in blood of man and dog, J. Biol. Chem., 233: 894, 1958.

26. Unger, R. H., A. M. Eisentraut, M. S. McCall and L. L. Madison: Glucagon antibodies and an immunoassay for glucagon, J. Clin. Invest., 40: 1200, 1961.

27. Unger, R. H., A. M. Eisentraut, M. S. McCall, and L. L. Madison: Measurements of endogenous glucagon in plasma and the influence of blood glucose concentration upon its secretion, J. Clin. Invest., 41: 682, 1962.

28. Burger, M.: Die physiologische Bedeutung der primären Insulinhyperglykämie, Am. J. Physiol., 90: 302, 1929.

29. Ingle, D. J., E. J. Neenan, and L. M. Humphrey: Absence of hyperglycemic effect of glucagon in the eviscerated rat, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 84: 232, 1953.

30. Pincus, I. J.: A hyperglycemic factor extracted from the pancreas, J. Clin. Endocrin., 10: 556, 1950.

31. Costa, E., G. Galandino, and P. P. Foa: Glycogen stores in glucagon-treated rats (I) Time factors, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 91: 308, 1956.

32. Costa, E. G. Galandino, G. Penna, and P. P. Foa: Glycogen stores in glucagon-treated rats (II) Effect of alloxan diabetes, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 91: 574, 1956.

33. Sutherland, E. W.: Action of hyperglycemic-glycogenolytic factor and epinephrine, Rec. Progress in Hormone Research, 5: 441, 1950.

34. Shipley, R. A., and E. J. Humel: Carbohydrate and acetone body metabolism of liver slices and the effects of insulin, Am. J. Physiol., 144: 51, 1945.

35. Sutherland, E. W., and C. F. Cori: Influence of insulin preparations on glycogenolysis in liver slices, J. Biol. Chem., 172: 737, 1948.

36. Sutherland, E. W. and C. F. Cori: Effect of hyperglycemic-glycogenolytic factor and epinephrine on liver phosphorylase, J. Biol. Chem., 188: 531, 1951.

37. Rall, T. W., E. W. Sutherland, and J. Berthet: The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase, J. Biol. Chem., 224: 463, 1957.

38. Rall, T. W., and E. W. Sutherland: Formation of cyclic adenosine ribonucleotide by tissue particles, J. Biol. Chem., 232: 1065, 1958.

39. Sutherland, E. W., and T. W. Rall: The relation of adenosine-3, 5-Phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones, Pharmacol. Rev., 12: 265, 1960.

40. Klainer, L. M., Y. M. Chi, S. L. Freidberg, T. W. Rall, and E. W. Sutherland: Adenyl cyclase, (IV) The effects of neurohormones on the formation of adenosine-3, 5-phosphate by preparations from brain and other tissues, J. Biol. Chem., 237: 1239, 1962.

41. de Bodo, R. C., and N. Altswiler: Insulin hypersensitivity and physiological insulin antagonists, Physiological Rev., 38: 389, 1958.

42. Tyberghein, J. : Action du glucagon sur le metabolisme des proteines, Arch. Intern. Physiol., 61: 104, 1953.

43. Salter, J. M., I. W. F. Davidson, and C. H. Best: Effects of glucagon on metabolisms of carbohydrate and protein, Fed. Proc., 16: 111, 1957.

44. Isselbacher, K. J., and S. R. Glasser: Influence of glucagon on protein metabolism of fasting rats, Fed. Proc., 17: 78, 1958.

45. Iano, J. L. and S. R. Glasser.: Influence of anabolic steroids on protein catabolic action of glucagon, Fed. Proc., 19: 120, 1960.

46. Miller, L. L.: Some direct actions of insulin, glucagon, and hydrocortisone on the isolated perfused rat liver, Res. Progress in Hormone Research, 17: 539, 1961.

47. Drury, D. R., A. N. Wick, and J. W. Sherrill: The effect of the HGF on the metabolism of glucose by the extra hepatic tissues, Diabetes, 3: 129, 1954.

48. Pincus, I. J., M. E. Scott, M. Dunn, and J. Z. Rutman: Influence of glucagon HGF on insulin deposition of C<sup>14</sup> labeled glucose in muscle glycogen, Fed. Proc., 14: 115, 1955.

49. R-Candela, J. L., and R. R-Candela: Inhibitory effect of glucagon on the insulin glucose uptake of the isolated diaphragm of the rat, Giba Found. Colloq. on Endocrinology, 9: 194, 1955.

50. Randle, P. J.: Giba Found. Colloq. on Endocrinology, 9: 199 (discussion) 1956.

51. Elrick, H., C. J. Hlad, and T. Witten: Glucagon and peripheral glucose utilization, J. Clin. Invest., 34: 1830, 1955.

51a. Elrick, H., C. J. Hlad, Y. Arai and A. Smith: The interaction of glucagon and insulin on blood glucose, J. Clin. Invest., 35: 757, 1956.

52. Van Hallie, T. B., M. C. Morgan, and L. B. Detti: The effect of glucagon on peripheral utilization of glucose in man, J. Clin. Endocrinology, 15: 28, 1955.

53. Bendy, P. K., and L. R. Cardillo: The effect of glucagon on carbohydrate metabolism in normal human beings, J. Clin. Invest., 35: 494, 1956.

54. Tomisawa, H. H., and P. M. Hyde: Effect of glucagon on peripheral utilization of glucose, Am. J. Physiol., 193: 52, 1958.

55. Gemmill, C. L., and L. Hamman, Jr.: The effect of insulin on glycogen deposition and on glucose utilization by isolated muscles, Bull Johns Hopkins Hosp., 68: 50, 1941.
56. Winegrad, A. I., and A. E. Renold: Studies on rat adipose tissue in vitro, (I) Effects of insulin on the metabolism of glucose, pyruvate and acetate, J. Biol. Chem., 233: 267, 1958.
57. Steele, R., J. S. Bishop, A. Dunn, M. Altzuler, I. Rathgeb and R. C. de Bedo: Inhibition by insulin of hepatic glucose production in the normal dog, Am. J. Physiol., 208: 301, 1965.
58. Cavallero, C., B. Malandra, and G. Galansino: Diabetogenic action of pancreatic glucagon, Nature, 173: 585, 1954.
59. Galansino, G., H. R. Weinstein, H. M. Magill, and P. P. Foa: Chronic effects of glucagon, Am. J. Physiol., 180: 27, 1955.
60. Elrick, H., F. J. Rachals, and C. J. Hlad, Jr.: Effects of prolonged glucagon administration in cat and dog, Diabetes, 7: 129, 1958.
61. Salter, J. M., I. W. F. Davidson, and C. H. Best: Pathologic effects of large amounts of glucagon, Diabetes, 6: 248, 1957.
62. Mirsky, I. A., G. Perisutti, and N. C. Davis: Destruction of glucagon, adrenocorticotropin and somatotropin by human blood plasma, J. Clin. Invest., 38: 14, 1959.
63. Goldner, M. G., R. H. Jauregui, and S. Weisenfeld: Disappearance of HGF from insulin after liver perfusion, Am. J. Physiol., 179: 25, 1954.
64. Berson, S.A., R. W. Yalow, and B. W. Volk: in vivo and in vitro metabolisms of insulin I<sup>131</sup> and glucagon I<sup>131</sup> in normal cortisone-treated rabbits, J. Lab. Clin. Med., 49: 331, 1957.
65. Kakiuchi, S., and H. H. Tomizawa: Properties of a glucagon-degrading enzyme of beef liver, J. Biol. Chem., 239: 2560, 1964.

66. Steele, R., J. S. Wall, R. C. de Bode, and N. Altszuler: Measurement of size and turnover rate of body glucose pool by the isotope dilution method, Am. J. Physiol., 187: 15, 1956.

67. Steele, R.: Influences of glucose loading and of injected insulin on hepatic glucose output, Ann. N. Y. Acad. Sci., 82: 420, 1959.

68. Wall, J. S., R. Steele, R. C. de Bode, and N. Altszuler: Effect of insulin on utilization and production of circulating glucose, Am. J. Physiol., 189: 43, 1957.

69. Hagedorn, H. C., and B. N. Jensen: Zur Mikrobestimmung des Blutzucker's mittels Ferricyanid, Biochem. Ztschr., 135: 46, 1923.

70. Somogyi, M.: Determination of blood sugar, J. Biol. Chem., 160: 69, 1945.

71. Steele, R., W. Bernstein, and C. Bjerknes: Single phototube liquid scintillation counting of  $C^{14}$ : application to an easily isolated derivative of blood glucose, J. Applied Physiol., 10: 319, 1957.

72. Yalow, R. S., and S. A. Berson: Immunoassay of plasma insulin, Methods of Biochemical Analysis, 12: 69, 1963.

73. Bishop, J. S., R. Steele, N. Altszuler, A. Dunn, C. Bjerknes, and R. C. de Bode: Effects of insulin on liver glycogen synthesis and breakdown in the dog, Am. J. Physiol., 208: 307, 1965.

74. Steele, R., N. Altszuler, J. S. Wall, A. Dunn, and R. C. de Bode: The influence of adrenalectomy on glucose metabolism in the dog: Studies with  $C^{14}$  glucose, Am. J. Physiol., 196: 221, 1959.

75. Miller, L. L.: Direct actions of insulin, glucagon, and epinephrine on the isolated perfused rat liver, Fed. Proc., 24: 737, 1965.

76. Sekal, J. E., E. J. Sarcione, and A. M. Henderson: Relative potency of glucagon and epinephrine as hepatic glycogenolytic agents: Studies with the isolated perfused rat liver, Endocrin., 74: 930, 1964.