

# EFEITOS DO GLUCAGON NO METABOLISMO GLICÍDICO DE *CHRYSEMYS D'ORBIGNYI* (REPTILIA, CHELONIA) SOB A INFLUÊNCIA DAS VARIAÇÕES ESTACIONAIS

*Maria Marques*

Depart. Fisiol. Geral — Inst. Biociências Univ. São Paulo e Inst. Fisiol. Exp. Univ. Federal Rio Grande do Sul. Caixa Postal, 11.230 São Paulo — ZC 9 — Brasil.

## ÍNDICE

1 — Introdução .....	27
2 — Material e métodos .....	40
1. Determinação da glicemia .....	44
2. Dosagem de glicogênio hepático e muscular .....	44
3. Extração da insulina pancreática .....	46
4. Dosagem de insulina pancreática .....	46
5. Determinação da atividade insulínica do plasma .....	47
6. Extração e dosagem de epinefrina no plasma ..	50
3 — Resultados e Discussão .....	51
A) Experimento prolongado .....	51
1. Efeitos sobre a glicemia .....	52
2. Efeitos sobre o teor de glicogênio hepático e muscular .....	57
3. Efeitos sobre atividade insulínica do plasma .....	58
4. Efeitos sobre o conteúdo de insulina pancreática .....	60
B) Experimento agudo .....	63
1. Efeitos sobre a glicemia .....	63
2. Efeitos sobre atividade insulínica do plasma .....	65
4 — Bibliografia .....	76

## RESUMO

Estudou-se no presente trabalho a ação do glucagon sobre o metabolismo glicídico em *Chrysemys d'orbignyi*, colhendo-se dados experimentais durante o inverno e o verão.

A administração diária de glucagon (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) durante 30 dias ou uma única injeção do referido hormônio produziu marcada hiperglicemia, sendo este efeito mais intenso e prolongado durante o inverno. Ainda, nesta época, a continuação do tratamento fez diminuir aquêlê efeito hiperglicêmico e, aos 20 dias de sua interrupção, a glicemia retornou aos níveis iniciais.

O teor de glicogênio hepático e muscular de **Chrysemys** testemunha estava mais alto no inverno. A injeção diária do glucagon reduziu o conteúdo de glicogênio hepático mas não modificou a concentração do glicogênio muscular. A redução das reservas do glicogênio hepático foi maior em experimentos realizados durante o inverno.

O conteúdo em insulina do pâncreas de animais testemunhas foi o mesmo em ambas estações. Porém, o tratamento com glucagon no inverno diminuiu o teor de insulina pancreática e no verão não o modificou apreciavelmente.

A atividade insulínica do plasma de **Chrysemys** em condições normais, avaliada em  $\mu\text{l}$  do  $\text{CO}_2$  produzido pelo tecido adiposo de rato, "in vitro", é menor do que 10  $\mu\text{U}/\text{ml}$  de insulina. A injeção de glucagon em **Chrysemys** provocou aumento desta atividade após 6 e 48 horas de sua administração. É provável que êsse aumento, verificado às 6 horas, não se deva a um acréscimo de insulina no plasma, nem à hiperglicemia ou à adrenalina, mas parece ser proveniente da ação "in vitro" do glucagon injetado naquêles animais por via sub-cutânea. Provas experimentais indicam que o acréscimo da produção de  $\text{CO}_2$  verificado às 48 horas correspondia a um aumento de insulina plasmática. A injeção diária do glucagon em **Chrysemys** durante 25 dias também acarretou aumento da atividade insulínica do plasma.

Observou-se marcada influência estacional nos efeitos da administração do glucagon em **Chrysemys**. É possível que estas diferenças de ação não dependam apenas da maior ou menor reserva de glicogênio hepático dêstes animais, mas decorram também de alterações profundas no seu estado metabólico relacionadas com as variações dos fatores ambientais.

\*

(EFFECTS OF GLUCAGON ON THE CARBOHYDRATE METABOLISM IN *CHRYSEMYS D'ORBIGNYI* (REPTILIA, CHELONIA) AND THE INFLUENCE OF SEASONAL VARIATION)

**ABSTRACT** — The action of glucagon upon carbohydrate metabolism of *Chrysemys d'orbignyi* during summer or winter was studied.

A single injection of glucagon (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) or its daily administration for 30 days produced intense hyperglycemia. This effect was greater and longer during winter than in summer. The effect in winter decreased as the experiment proceeded and the blood glucose reached normal levels 20 days after suspension of glucagon treatment.

Liver or muscle glycogen concentration of controls was higher during winter than in summer. Daily injection of glucagon during 30 days reduced the liver glycogen levels, this effect being greater during winter than in summer. No changes were observed on muscle glycogen levels of treated turtles.

Pancreas insulin content from glucagon treated animals did not present appreciable modification during the summer, but it was reduced in experiments performed during the winter.

Plasma insulin like activity from treated turtles during 25 days in winter was greater than from controls.

It was observed a seasonal influence upon glucagon action on *Chrysemys d'orbignyi*, which probably is not due only to changes on liver glycogen levels, but it may be caused by variations in its metabolic state correlated with different environmental conditions.

## 1

## INTRODUÇÃO

A intensificação do estudo sobre o glucagon nestes últimos anos conduziu a resultados que permitem admiti-lo como parte integrante do sistema regulador da glicemia. A maio-

ria das informações sobre sua ação decorrem, porém, de experimentos em mamíferos, especialmente em cães e em gatos.

As poucas observações de sua atividade em répteis e em aves sugerem, entretanto, que o glucagon pode ser fisiologicamente muito mais importante nestas duas classes de vertebrados. Se essas diferenças de comportamento resultam de variações da sensibilidade dos tecidos a este hormônio ou se dependem da quantidade secretada, então, a escolha da espécie animal para o estudo do glucagon pode ser um fator importante para a obtenção de resultados esclarecedores sobre o seu papel fisiológico (Berthet, 1963).

Por outro lado, o metabolismo dos répteis desenvolve-se em processo lento, oferecendo, assim, interessante oportunidade para a observação de certos fenômenos que, em mamíferos, poderiam passar despercebidos (Coulson e Hernandez, 1964).

Havendo encontrado poucas informações relativas ao estudo do glucagon em Ofídios, Lacertílios e ainda menos em Quelônios, escolhi dentre os últimos a espécie «*Chrysemys d'orbignyi*»\* para objeto de estudo no presente trabalho

Como adiante se verá, a temperatura influi sobre o metabolismo de certos répteis e, tendo sido possível trabalhar numa região em que as diferenças entre o inverno e o verão são mais nítidas do que em outras do país, julguei de interesse, seguindo as sugestões do Prof. Paulo Sawaya, estudar a ação deste hormônio sobre o metabolismo glicídico de *Chrysemys d'orbignyi*, que são os quelônios mais comumente encontrados

---

(\*) Sendo *Chrysemys d'orbignyi* uma das espécies de *Chelonia* que ocorrem no Guaíba, rio das circunjascências de Porto Alegre, de onde provieram todos os animais do presente trabalho, indicarei, para abreviar, apenas o nome do gênero *Chrysemys*, referindo-me sempre a *Chrysemys d'orbignyi*. Evitarei, assim, para não causar confusões, as indicações populares de "tartaruga", "jaboti" ou "tigré d'água" (Lüderwaldt, 1926) pelas quais estes animais são conhecidos no país.

no rio Guaíba e suas ilhas, em cuja margem se situa a cidade de Pôrto Alegre, sede do Instituto de Fisiologia Experimental, onde êste trabalho foi realizado.

As *Chysemys* habitam as zonas tropicais e temperadas das Américas, sendo mais freqüentes porém, nas regiões tropicais de todo o continente americano (Goeldi, 1960), com exceção de *Chrysemys picta belli*, que parece ser a única encontrada na Columbia Britânica (Darlington, 1957). Por isto, a meu ver, talvez êstes animais ofereçam um mecanismo de adaptação que deva estar relacionado diretamente com o metabolismo dos hidratos de carbono.

O fato de *Chrysemys d'orbignyi* viver também em ambiente relativamente frio, sugere um determinado regime de adaptação, no qual, sem dúvida, deve interferir a atividade endócrina do pâncreas. Na bibliografia consultada não encontrei referência especial ao funcionamento do pâncreas em animais que vivem em regiões tropicais e em temperadas, e daí julgar de interêsse verificar a influência da insulina e do glucagon em animais com êsse regime de adaptação. Propus-me assim experimentar os hormônios pancreáticos em *Chrysemys d'orbignyi*, que podem viver em localidades cujas temperaturas oscilam durante o ano entre 3° e 39°C.

Assim, o objetivo principal dêste trabalho será o estudo da influência do glucagon no metabolismo glicídico de *Chrysemys d'orbignyi* durante as variações estacionais.

Depois de apresentar uma resenha da bibliografia sôbre o glucagon e sôbre o metabolismo dos hidratos de carbono em certos Quelônios, indicarei as técnicas e os métodos empregados, seguindo-se a parte experimental e, finalmente, a discussão dos resultados e conclusões.

A hiperglicemia inicial produzida pela injeção dos primeiros extratos pancreáticos não foi convenientemente inter-

pretada, ou mesmo, passou despercebida durante muito tempo. Coube a Murlin e colaboradores investigar, pela primeira vez, as propriedades biológicas dessa fração do extrato, e sugerir que se poderia tratar de material fisiologicamente ativo. Denominaram-na «glucagon» o que significa «mobilizador de glicose» (Kimbal e Murlin, 1923; Gibbs et al., 1923; Collens e Murlin, 1929). Estas descobertas foram logo confirmadas por Bürger e Kramer (1928). Mas, o interesse sobre o glucagon permaneceu limitado por algum tempo, em vista da nova técnica para extração de insulina (Abel et al., 1927) eliminar aquele fator hiperglicemiante. Posteriormente, com o emprêgo de novo método para obtenção de insulina (Scott, 1934), que não removia o glucagon dos extratos, aquele efeito hiperglicêmico inicial voltou a ser observado. Surgiu então renovado interesse por êste fator e seu estudo foi iniciado em vários laboratórios (Bouchaert e De Duve, 1947; Sutherland e De Duve, 1948; Pincus, 1950; De Duve, 1953; Monnike, 1955; Foà et al., 1957). Alguns autôres preferiram usar o têrmo «fator glicogenolítico-hiperglicemiante» do pâncreas (HGF) em vez de glucagon.

Em 1923, Staub, Sinn e Behrens obtiveram glucagon cristalizado, o que veio permitir a determinação de suas propriedades físicas e químicas. Finalmente, Bromer e colaboradores (1957) caracterizaram-no como um polipeptídeo, com pêso molecular 3485, sendo cada molécula constituída de uma cadeia linear de 29 amino-ácidos. É de se notar que o glucagon possui todos os amino-ácidos presentes na molécula de insulina, com exceção da prolina, isoleucina e cistina, e contém dois (metionina e triptofano) que não são encontrados na insulina. Êste fato e outras características químicas eliminam a possibilidade de que o glucagon possa ser um produto de desdobramento da molécula de insulina.

Vários métodos biológicos têm sido propostos para o ensaio na possibilidade de que o glucagon possa ser um produto do glucagon extraído do pâncreas ou presente no plasma. São

êles: 1) medida do efeito hiperglicêmico do glucagon injetado em gatos (Staub e Behrens, 1954); 2) medida de quantidade de glicose liberada de fatias de fígado «in vitro» (Sutherland e Rall, 1958; Vuylsteke et al., 1950; Audy e Kerly, 1952; Tybergheim e Williams, 1958); 3) medida da reativação da fosforilase em fatias ou homogeneizados de fígado (Berthet et al., 1957); 4) imuno-ensaio baseado na capacidade de ligação ao anti-corpo (Unger et al., 1961). Embora os três primeiros métodos não ofereçam a precisão e especificidade desejadas, têm contribuído para aumentar o conhecimento sobre o glucagon. O último método oferece grandes promessas por ser altamente específico.

Admite-se que o glucagon tem origem no pâncreas e é produzido pelas células alfa (Sutherland e De Duve, 1948; Kazal et al., 1950; Audy e Kerly, 1952). Esta hipótese ganha geral aceitação por estar baseada em numerosos trabalhos experimentais. São suas provas mais recentes: 1) inibição de mitoses, desgranulação e atrofia das células alfa, quando se administra glucagon ou extratos destas células (Korp e Le Compte, 1955; Butturini et al., 1956; Lazarus e Volk, 1958; Logothetopoulos et al., 1960; Cardeza, 1960); e 2) localização de glucagon dentro das células alfa por meio do método de anti-corpo fluorescente (Mosca, 1959 e Baum et al., 1962). Estudos ainda mais recentes distinguem dois tipos de células alfa: alfa 1 e alfa 2, sendo que as primeiras têm função desconhecida, enquanto as segundas produzem o glucagon (Hellerström e Hellman, 1962; Petersson e Hellman, 1963).

A aceitação do glucagon como um hormônio pancreático estava na dependência da demonstração de sua presença na corrente sanguínea. Utilizando técnicas de circulação cruzada (Foà et al., 1949; 1952 b) e ensaios 'in vitro' (Tybergheim e Williams, 1958 e Makman et al., 1960), havia sido possível determinar a presença de material hiperglicemiante ou ativador da fosforilase no plasma. Mas, as quantidades exatas não haviam podido ser determinadas porque o sangue contém

outras substâncias que marcaram os resultados obtidos por meio de técnicas biológicas. Recentemente, entretanto, Unger et al. (1962) e Unger e Eisentraut (1964), usando o método rádioimunológico, altamente específico e extremamente sensível, conseguiram dosar o glucagon no plasma do cão e do homem, demonstrando ainda alterações de sua secreção, em função dos níveis glicêmicos.

Os efeitos fisiológicos do glucagon são vários. Ele age sobre o metabolismo dos hidratos de carbono, das proteínas e dos lipídeos, sobre o consumo de oxigênio, portanto sobre o metabolismo básico e, finalmente, sobre os eletrólitos e função renal (Foà e Galansino, 1962). Muitos destes efeitos estão bem estabelecidos, mas muitos outros ainda não estão bem claros. Citarei apenas os resultados de sua ação sobre o metabolismo dos hidratos de carbono.

A elevação da glicemia é um dos mais evidentes efeitos do glucagon e já foi observado na maioria dos mamíferos, inclusive no homem (Bondy e Cardillo, 1956; Pincus e Rutman, 1958; Tybergheim, 1961); em aves (Beekman, 1957; Hazelwood e Lorenz, 1957; Mialhe, 1958) e em répteis (Miller e Wurster, 1958; Marques e Riet Corrêa, 1959; Houssay e Penhos, 1960; Miller, 1961); mas, não foi encontrada em Urodelos (Miller e Wurster, 1959; Wurter e Miller, 1960).

Segundo Sutherland e Rall (1960) e Finder e Schoemaker (1962), o glucagon eleva a glicemia por estimular a reativação da fosforilase inativa do fígado, assim promovendo a glicogenólise hepática.

Desta forma, a hiperglicemia é menor quando as reservas de glicogênio hepático são baixas, inaproveitáveis ou ausentes, tais como no jejum prolongado (Pincus e Rutman 1958), em doenças do fígado (Cavallero, 1953; Van Itallie e Benthley, 1955; Foà et al., 1957; Shoemaker e Van Itallie, 1960), no diabetes grave (Kirtley et al., 1953; Hubble, 1955; Pincus e Rutman, 1958), depois da adrenalectomia ou desmedulação adrenal (Sarcione et al., 1960), ou ainda, em animais com

hepatectomia total (Pincus, 1950; Ingle e et al., 1953; Drury et al., 1954).

Por outro lado, o efeito do glucagon é maior quando as reservas de glicogênio estão altas, tais como em ratos bem alimentados ou quando receberam repetidas doses de glucagon (Behrens et al., 1956), ou ainda quando a secreção de insulina não é possível, como no caso de cães pancreatoprivos (Foà et al., 1952 a).

Em ratos normais, a redução do glicogênio hepático é passageira, e 24 horas depois está mais alto (Costa et al., 1956; Foà et al., 1957; Okuno, 1960). Em ratos tratados por longo período com glucagon, o glicogênio do fígado pode estar normal ou aumentado (Galansino et al. 1955; Okuno, 1960; Salter, 1960). Este fenômeno compensatório resulta, provavelmente, de complexas reações endócrinas (Foà, et al., 1957).

Enquanto a ação do glucagon sobre o glicogênio hepático, com a conseqüente liberação de glicose, está razoavelmente bem estabelecida, as observações de sua ação sobre o glicogênio muscular e utilização da glicose periférica são discordantes. Provoca pequeno aumento no glicogênio muscular (Costa et al., 1956) e diminui o efeito da insulina sobre o consumo de glicose e síntese do glicogênio, pelo diafragma isolado de rato (Snedecor et al., 1955; R-Candela et al., 1956). As provas mais recentes parecem indicar que o glucagon não tem ação direta sobre a atividade da fosforilase, o teor de glicogênio e o metabolismo da glicose no músculo esquelético (Foà, 1964) mas, causa redução do glicogênio no músculo cardíaco do rato (Cornblath et al., 1961). Alguns autores registraram que o glucagon em animais eviscerados não modifica a tolerância à glicose (Ingle et al., 1953) e nem a oxidação (Drury et al., 1954), provoca porém redução do glicogênio em fatias de pele (Rajarama e De, 1955).

O glucagon não modifica o glicogênio do tecido adiposo do rato (Engel e Scott, 1950; Pincus et al., 1955), todavia estimula o consumo de glicose, a oxidação (Hagen, 1961) e a produção de CO<sub>2</sub> pelo mesmo tecido (Lee, et al., 1960).

O papel fisiológico do glucagon ainda não está bem elucidado, mas Foà, em sua recente revisão (1964) sugere a seguinte hipótese: «O glucagon é um hormônio potente, de ação rápida, capaz de estimular a glicogenólise hepática, e assim elevar a glicemia à custa de suas reservas. Normalmente, o glucagon parece ser secretado em resposta à diminuição da glicemia e acelera a glicogenólise, sem produzir hiperglicemia. Quando em excesso, êle pode causar hiperglicemia que, ao contrário, estimula a liberação de insulina. Por outro lado, a insulina é secretada em resposta à elevação da glicemia e acelera a utilização dos hidratos de carbono, sem produzir hipoglicemia. Quando em excesso, ela causa hipoglicemia que estimula a liberação de glucagon. Nêste sentido a secreção de insulina e a de glucagon regulam a glicemia, e são por sua vez regulados por ela. Além disso, o glucagon promove a neoglicogênese, aumentando o total de glicídios disponível. Portanto o glucagon pode ser considerado como parte integrante do sistema regulador da glicemia».

O conhecimento sôbre o metabolismo dos hidratos de carbono nos Quelônios é ainda limitado. Qualitativamente, é semelhante ao metabolismo dos mamíferos superiores, mas, quantitativamente, é bastante diferente, destacando-se pela grande lentidão com que se processa.

Revisões sôbre êste tema encontram-se nas publicações de Houssay (1959), de Gorbman e Bern (1962) e de Bern e Nandi (1964) em que tratam da fisiologia comparada do pâncreas. Por sua vez, Miller (1961) reuniu as informações relativas ao metabolismo dos hidratos de carbono em anfíbios e em répteis.

Estudos sôbre a glicemia nos Quelônios revelam algumas características especiais. Chama logo a atenção, a grande variabilidade de seus níveis glicêmicos em condições normais. Prado (1946) havia observado esse fenômeno em Ofídios. A glicemia média de *Chrysemys d'orbigny* é de 76 mg % (Lopes et al., 1954). Idênticos valores foram determinados em

*Phrynops hilarii* (Foglia et al., 1955) e em *Chrysemys picta* (Rapatz e Musacchia, 1957). Níveis mais altos observam-se em outros répteis, como *Lampropeltus getulus* (Rhaney, 1948), *Alligator mississippiensis* (Coulson et al., 1950), *Iguana iguana* (Hernandez e Coulson, 1951) e *Anolis carolinensis* (Des-sauer, 1952), e, mais baixos em *Xenodom merremii* (Houssay e Biasotti, 1933) e *Bothrops jararaca* (Prado, 1946). Segundo Miller (1960), a glicemia dos répteis sendo mais alta do que a dos anfíbios (30 a 35 mg%), pareceria indicar maior necessidade de glicose por aquêles, uma vez que as aves, que requerem grande consumo de energia (Pearson, 1955), possuem também glicemia normal elevada (200 mg%) (Hazelwood e Lorenz, 1957).

A glicemia normal de *Chrysemys* apresenta variações segundo a estação do ano. É mais alta na primavera e no verão (112 mg%), época da reprodução, caindo a 88 mg% no outono e no inverno (Lopes et al., 1954).

Sabe-se que a temperatura influi sôbre certos processos metabólicos nos animais heterotérmicos, mas esta não seria a causa primária da variação estacional, pois segundo Hernandez e Coulson (1952) a variação permanece, mesmo quando os animais são mantidos em temperatura e exposição à luz constantes, durante todo o ano.

O elevado nível glicêmico, na época da reprodução, poderia estar relacionado com um aumento geral do metabolismo e um aumento da atividade da hipófise, tiróide e gônadas. Esta correlação entre influência hormonal e estação do ano foi demonstrada em anfíbios (Miller e Robbins 1954, 1955a, 1955b; Smith, 1954).

Em geral, os Quelônios suportam bem longo período de jejum, sem baixar apreciavelmente a glicemia. *Chrysemys picta*, em jejum de 6 a 8 semanas, reduz a glicemia de 76 para 49 mg%, quando mantida à 22°C de temperatura. Quando submetida à temperatura de 4°C a glicemia passa de 76 para 68 mg% (Rapatz e Musacchia, 1957). Miller (1961) confirmou êstes resultados. Certamente, a temperatura tem influên-

cia sôbre certos processos metabólicos, mas não se conhece ainda que pontos são afetados, especificamente.

A curva de tolerância à glicose apresenta variações estacionais nestes répteis. Na primavera, a administração de glicose, 0,5 g/kg, via oral, em *Chrysemys d'orbigny*, provoca aumento da glicemia que atinge o máximo dentro de 9 horas, retornando a níveis iniciais, depois de 24 horas. No inverno, a glicemia atinge o máximo no mesmo tempo, mas requer 48 horas para ser normalizada (Lopes et al., 1954).

Sendo o fígado o principal regulador da glicemia, e o órgão central do metabolismo dos glicídios, o conhecimento de seu papel muito contribuiria para esclarecer os fenômenos metabólicos dos Quelônios. Poucos trabalhos referem-se a êsse tema nestes animais. Noble e Macleod (1923) trabalhando com fígado isolado não observaram efeito da insulina sôbre a liberação de glicose. Schilling (1957) também utilizando técnica de perfusão de fígado isolado, demonstrou que temperaturas baixas diminuem a glicogenólise espontânea em *Chrysemys d'orbigny*. Em outra espécie, *Phrynops hilarii*, Conceição (1959) encontrou inibição da glicogenólise adrenalínica por ação de sulfonamida hipoglicemiante.

A regulação hormonal do metabolismo glicídico nos Quelônios vem sendo estudada em alguns de seus aspectos, especialmente no que se refere ao papel do pâncreas e da hipófise. Praticamente nada se conhece sôbre as funções da tiróide, adrenais e gônadas.

A pancreatêctomia total, em alguns Quelônios terrestres, provoca intensa diabete (Aldehoff, 1891; Nish, 1910). Mais recentemente, Foglia et al. (1955) ampliaram as observações sôbre os efeitos da extirpação total do pâncreas, utilizando em seus experimentos as espécies de água doce, *Chrysemys d'orbigny* e *Phrynops hilarii*. Rápida e intensa hiperglicemia segue-se à pancreatêctomia, a qual nunca retorna espontaneamente aos níveis normais. O glicogênio hepático, muscular e cardíaco permanece alto. A hipofisectomia prévia diminui os efeitos da extirpação do pâncreas.

*Em Phrynops hilarii*, a redução da massa pancreática produz hiperglicemia transitória, sendo o efeito diabético mais intenso nos machos (Marques, 1955a). O exame histológico da porção do pâncreas restante revela lesões nas células beta, enquanto persiste a hiperglicemia, mas ao ser restabelecido o nível glicêmico, também essas células recuperam sua estrutura normal (Cardeza, 1957a).

A administração de aloxano a certos Quelônios produz alterações na glicemia que seguem três estágios: hiperglicemia inicial; hipoglicemia depois de 2 a 5 dias, podendo durar até 48 dias, quando então a glicemia volta ao normal; e hiperglicemia permanente, apenas em alguns (Houssay, 1959). Nos animais que ficam hiperglicêmicos aparecem lesões típicas das células beta (Garcia Ramos, 1944; Lopes, 1955; Cardeza, 1957b).

Os répteis são em geral bastante resistentes à ação da insulina, apresentando uma fase inicial de hiperglicemia cuja duração varia com a dose e com a espécie: em *Hydraspis hilarii*, a injeção de grandes doses de insulina eleva a glicemia nas primeiras 5 horas (Houssay et al., 1923). Em *Graphemys geographicus*, a hipoglicemia aparece depois de 24 horas e perdura por 60 a 96 horas (Mann et al., 1924). *Chrysemys d'orbignyi* responde a menores doses de insulina, possivelmente por ter sido usada insulina com maior grau de purificação. Uma ou 2 unidades deste hormônio por quilo de peso corporal produzem hiperglicemia nas primeiras 3 horas, caindo a glicemia a níveis muito baixos em 24 horas. Em alguns animais a glicemia chega a zero, sem entretanto aparecer qualquer sintoma aparente de hipoglicemia. Após 96 horas, a glicemia está normalizada (Lopes et al., 1954). Em outra espécie de *Pseudemys*, Miller e Tai (Miller, 1961) observaram que as doses pequenas provocam apenas hipoglicemia, enquanto que as altas, determinam uma fase hiperglicêmica inicial.

Segundo Coulson e Hernandez (1953) e, Miller e Wurster (1958), a resistência à insulina mostrada pelos répteis, se deve-

ria à resposta dêstes animais ao fator glicogenolítico hiperglicemiante presente nas preparações comerciais de insulina. No entretanto, observações recentes de Miller e Tai (Miller, 1961), demonstraram que preparações livres de glucagon ainda provocam hiperglicemia, quando administradas em grandes doses.

Ao contrário do que foi visto sôbre efeito da insulina, as poucas observações existentes sôbre o efeito do glucagon indicam maior sensibilidade a êste. Em *Chrysemys d'orbigny* o glucagon (1 mg/kg) eleva a glicemia intensamente perdurando êste efeito por 72 horas (Marques e Riet Corrêa, 1959). Com menor dose (10 µg/kg) Miller (1961) ainda obteve resposta hiperglicêmica em *Chrysemys picta*.

Até o presente, não há referência sôbre extração e dosagem de glucagon em pâncreas de Quelônios, nem em outros repteis. O seu teor, no entretanto, já foi determinado em muitos mamíferos (Sutherland e De Duve, 1948; Kazal et al., 1950; Audy e Kerly, 1952), em algumas aves (Weitzel et al., 1956; Vuylsteke e De Duve, 1953) e em certos peixes (Lluch Trull e Planas Mestres, 1956 e Falkmer, 1961).

O conteúdo em insulina pancreática foi determinado em *Chrysemys*, sendo encontrado em média 1,3 unidades de insulina por grama de tecido (Kraemer e Marques, dados não publicados). Êste valor é inferior aos obtidos por Prado e Prado (1946) no pâncreas de *Bothrops jararaca* (3,4 a 4,8 U/g), mas é superior aos de certas aves (0,53 a 0,76 U/g) (Haist, 1944).

A influência da hipófise sôbre o metabolismo dos hidratos de carbono em Quelônios foi evidenciada através de alguns experimentos. Foglia et al., (1955) demonstraram que em *Chrysemys d'orbigny* e *Phrynops hilarii*, a hipofisectomia impede a hiperglicemia conseqüente à extirpação do pâncreas. Ainda em *Chrysemys*, a hipofisectomia diminui a glicemia normal, a curva de tolerância à glicose, a hiperglicemia adrenalínica e aumenta a sensibilidade à insulina (Lopes et al., 1954), mas, não modifica o efeito da injeção contínua de gli-

cose (Letti, 1958). Wagner (1955) verificou nesta espécie, diminuição do glicogênio hepático, muscular e cardíaco, após a hipofisectomia.

Dos hormônios hipofisários, apenas a somatotrofina foi utilizada em experimentos. Marques (1955b) observou acentuado aumento da glicemia em *Phrynops hilarii* tratadas com somatotrofina. Esta hiperglicemia foi, no entretanto, transitória. Cardeza (1957b) assinalou lesões celulares nos animais que apresentavam hiperglicemia ao serem sacrificados e desaparecimento dessas lesões quando a glicemia estava normal.

A falta de conhecimento do papel das glândulas adrenais sobre o metabolismo glicídico em *Chrysemys*, bem como em outros répteis, deve-se talvez à sua disposição anatômica. Elas estão intimamente aderidas às paredes da veia cava inferior, sendo, assim, extremamente difícil sua remoção.

Por outro lado, algumas publicações tratam dos efeitos da administração de hormônios corticais ou medulares. A hidrocortisona, mas não a cortisona, provoca aumento da glicemia em *Chrysemys d'orbignyi* (Rodriguez et al., 1956). Um novo corticóide sintético, Triamicinolona, administrado durante 30 dias produz intensa hiperglicemia, acompanhada de lesões das células beta (Rodriguez e Marques, no prelo). A ação hiperglicemiante da epinefrina é bastante acentuada em *Chrysemys d'orbignyi* (Lopes et al., 1954) e *Phrynops hilarii* (Marques e Riet Corrêa, 1959) e seu efeito se prolonga por vários dias, em ambas as espécies.

Até o presente, não encontrei trabalho experimental sobre o papel da tiróide no metabolismo de *Chrysemys*. Possivelmente isto se deve à dificuldade de conseguir sobrevivência destes animais, quando sofrem extirpação da glândula.

Quanto à relação das gônadas com o metabolismo dos Quelônios, cabe citar a observação de Wagner (dados não publicados), que encontrou níveis glicêmicos mais altos nos machos do gênero *Chrysemys*, e Marques (1955a), que em *Phry-*

*nops hilarii* com pâncreas reduzido, observou maior incidência e maior gravidade de diabete nos machos.

Sabe-se que o sistema nervoso também influi sôbre o metabolismo dos glicídios, mas em *Chrysemys* não há referência a esta influência.

Como acima foi citado, o glucagon aumenta a glicemia por estimular a glicogenólise hepática, sendo êste efeito proporcional às reservas de glicogênio daquele órgão. Por outro lado, sabe-se que o teor de glicogênio hepático de certos repteis apresenta diferentes valores conforme a época do ano (Hernandez e Coulson, 1952 e Dessauer, 1953). Logo, seria de se admitir que a *Chrysemys* apresente também esta variação no teor de glicogênio hepático, e que, conseqüentemente, os efeitos do glucagon neste animal sofram influência estacional.

Assim, tendo em vista aquelas características, julguei conveniente, para verificar esta possível influência, determinar a glicemia e o glicogênio hepático de *Chrysemys d'orbigny* injetados com glucagon, efetuando experimentos em dois períodos distintos do ano, isto é, no inverno e no verão.

Trabalhando em uma zona em que estas duas épocas são bem distintas, foi-me possível realizar as experiências em cada uma delas para observar, em tais condições, o comportamento de *Chrysemys d'orbigny*.

Ainda, partindo da sugestão de Foà (1964), de que o glucagon em excesso provoca hiperglicemia, a qual estimula a liberação de insulina, procurei constatar êste aumento de secreção, determinando a atividade insulínica do plasma e o teor de insulina do pâncreas de *Chrysemys* tratadas com glucagon.

## 2.

### MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se *Chrysemys d'orbigny*, fêmeas, tôdas adultas, a julgar pelo desenvolvimento das gônadas, e, pesando em

média 1.200 g (800 a 2.400 g.). A escolha do sexo foi motivada pela maior facilidade na aquisição das fêmeas.

Os animais provieram do rio Guaíba e suas ilhas sendo mantidos no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade do Rio Grande do Sul, em Pôrto Alegre, onde permaneceram em tanques especiais com água corrente, ao ar livre. Nesta região, o clima apresenta diferenças bem marcadas segundo as estações do ano. Desta forma, os animais estiveram submetidos a temperaturas muito variáveis. Os valores extremos de temperatura em Pôrto Alegre durante a realização dêste trabalho foram de 3,3 a 28,4°C, no inverno, e de 10,6 a 39,1°C no verão.

A alimentação constou de peixes frescos «ad libitum» pelos quais mostraram grande apetite, o que parece indicar que se tratava de um alimento habitual.

O plano experimental abrangeu dois tipos de experimento:

#### A) *Experimento prolongado*

A primeira parte dêste experimento, desenvolvida durante o verão (fevereiro e março), constituiu-se de 3 grupos de animais: 1.º) animais tratados, diàriamente, com glucagon (100 µg/kg) em injeção sub-cutânea; 2.º) outros, igualmente tratados com glucagon, mas com dose de 50 µg/kg; e 3.º) animais injetados apenas com solução fisiológica (NaCl 0,7%). Os dois primeiros grupos compunham-se de 7 *Chrysemys* e o último de 6. Durante o desenvolvimento da experiência morreu uma de cada grupo que recebeu glucagon.

Conforme recomendação de Lilly Research Laboratories, o glucagon\* foi dissolvido em água alcalinizada com NaOH (0,1 N) e o pH ajustado a 8,5 - 9. Desta solução, conservada no refrigerador, retirou-se, diàriamente, uma aliquota, diluindo-a em solução fisiológica afim de obter 100 a 50 µg de glu-

---

(\*) The Lilly Research Laboratories, Eli Lilly Co. em lotes de n.º 258-234 B-43 e 258-234 B-161-1.

cagon por ml, com o que se injetaram as *Chrysemys*, sempre pela manhã. O pH destas soluções permaneceu em tórno de 7.

Determinaram-se as glicemias pelo método de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952) no início do tratamento e a seguir com intervalos de 10 dias. Nos animais do primeiro grupo, avaliou-se também a atividade insulínica do plasma em amostras de sangue colhidas no 25.<sup>o</sup> dia de tratamento.

Ao final da experiência, que teve a duração de 30 dias, os animais foram sacrificados por decapitação. Após, abriu-se o plastrão com o auxílio de uma serra elétrica circular, sendo retirados o pâncreas (inteiro) para extração de insulina e amostras de fígado e músculo, para dosagens de glicogênio.

Durante a experiência, as *Chrysemys* permaneceram nos tanques ao ar livre, sendo levadas para o laboratório somente para a coleta de sangue.

No inverno (fins de junho e julho) repetiu-se a experiência, apenas com dois grupos: o primeiro, formado de 14 animais, injetados diariamente com glucagon (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) via sub-cutânea; o segundo, composto de 10 animais testemunhas injetados apenas com solução fisiológica. Retiraram-se amostras de sangue antes e durante o tratamento, com intervalos de 10 dias.

Ao fim de 30 dias, 6 das *Chrysemys* que receberam glucagon e 6 das testemunhas, foram sacrificadas para determinações do glicogênio hepático e muscular e extração de insulina pancreática. As restantes permaneceram sem tratamento por mais 30 dias, continuando a determinação da glicemia nos mesmos intervalos. Findo êste prazo, foram também sacrificadas, colhendo-se material para glicogênio hepático e muscular. Como restassem apenas 4 animais do primeiro grupo e 3 do segundo, (as outras haviam morrido) tornou-se técnica-mente desaconselhável a extração de insulina do pâncreas.

## B) *Experimento agudo*

Também neste tipo de experiência, o trabalho compreende observações feitas no verão e no inverno.

Durante as primeiras, realizadas em fevereiro e março, as *Chrysemys* foram injetadas uma única vez com glucagon (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) por via sub-cutânea. Colheram-se amostras de sangue antes da injeção, e depois de 3, 6, 24, 48, 72 e 96 horas, para determinação da glicemia e da atividade insulínica do plasma. Para obtenção do plasma, o sangue foi heparinizado e imeditamente centrifugado a 1.500 r.p.m., durante 15 minutos.

Como a técnica para determinação da atividade insulínica requer 1 ml de plasma, no caso particular da *Chrysemys*, e, como as dosagens foram sempre feitas em duplicado, não foi possível utilizar o mesmo animal mais de uma vez, pois a retirada de sangue em excesso, poderia alterar os resultados posteriores. Assim, formaram-se vários grupos de *Chrysemys*, de acordo com o intervalo de retirada de sangue após a injeção do glucagon: zero hora ou inicial (10 animais), 3 horas (5), 6 h (6), 24 h (7), 48 h (8), 72 h (7) e 96 h (6). Serviram como testemunhas *Chrysemys* injetadas com solução fisiológica. Enquanto perdurou o experimento, os animais permaneceram à temperatura ambiente (em média 25°C), sem receber alimento.

Durante o inverno (julho, temperatura média 15°C) repetiu-se a experiência, observando-se apenas o efeito do glucagon sobre a glicemia. Seis *Chrysemys* receberam uma única injeção de glucagon (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) via sub-cutânea, retirando-se sangue às zero, 6, 24 e 72 horas, e, aos 6, 9, 12 e 18 dias. Outras seis foram tratadas com solução fisiológica e observadas durante o mesmo tempo. Duas das *Chrysemys* tratadas com glucagon e uma das testemunhas morreram quase ao final do experimento.

A maioria dos métodos descritos a seguir foram empregados em experimento prolongado, outros, como o da determinação da glicemia e o da medida da atividade insulínica do plasma, foram utilizados em ambos tipos de experiência e, o método de extração e dosagem de epinefrina no plasma, apenas em experimento agudo.

## 1. — *Determinação da glicemia.*

As amostras de sangue para determinação da glicemia foram retiradas após jejum de 24 horas e colhidas da jugular externa. Para isto, tornou-se necessário conter as *Chrysemys* em uma caixa especial, que fixa a cabeça do animal, podendo-se então dissecar a veia com facilidade. Após a coleta de sangue, a veia foi ligada e a pele suturada.

Utilizou-se o método de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952) para a dosagem da glicose sanguínea. Esta técnica, resumidamente, consiste no seguinte: em 3 ml de água destilada colocam-se 0,2 ml de sangue. Desproteíniza-se, acrescentando 0,4 ml de sulfato de cobre e 0,4 ml de tungstato de sódio. O precipitado, separado por centrifugação, além das proteínas, também inclui sacaróides. Retira-se 1 ml do sobrenadante, tratando-o a quente (15 minutos) com o reativo de Somogyi (reagente cúprico alcalino), produzindo-se óxido cuproso como produto de redução pela glicose, em quantidades proporcionais a esta. O material resultante é tratado com o reativo especial de ácido arseno-tungstico (reativo de Nelson), e convenientemente diluído. A intensidade de coloração é medida no fotocolorímetro Klett-Summerson, com filtro de 540 m $\mu$  (n.º 54) e os valores de absorvência obtidos são comparados com os de soluções padrão de glicose, submetidas às mesmas operações. Os resultados são expressos em mg de glicose por 100 ml de sangue.

Entre os métodos para dosagem da glicose sanguínea, baseados na redução de metais, o que maior especificidade apresenta é o de Somogyi-Nelson, pois as soluções desproteinizantes precipitam também os sacaróides. Face às proposições experimentais do presente trabalho, o emprego do Somogyi-Nelson é perfeitamente satisfatório, embora existam métodos ainda mais específicos, baseados em reação enzimática.

## 2. — *Dosagem do glicogênio hepático e muscular*

O material para dosagem do glicogênio foi retirado das *Chrysemys* após jejum de 24 horas. As amostras de fígado,

colhidas sempre do mesmo lóbulo hepático, pesaram em média 250 mg. Para a dosagem do glicogênio muscular retiraram-se fragmentos da massa muscular extensora do membro posterior, pesando cerca de 500 mg.

Mediu-se o glicogênio nos tecidos pelo método de Montgomery (1957), que dá diretamente a concentração de glicogênio.

Esta técnica recomenda o seguinte procedimento: Pesado o tecido, é rapidamente colocado em 3 ml de hidróxido de potássio a 30%, em banho-maria fervente, durante 30 minutos. Adiciona-se 0,1 ml de sulfato de sódio a 2%, e precipita-se com 6 ml de álcool etílico 96° G.L. Deixa-se em repouso durante 2 horas em refrigerador. Centrifuga-se e lava-se o precipitado com álcool. Finalmente, dilui-se o precipitado em 10 ml de água destilada. Desta solução retira-se uma alíquota (1 ml) à qual se acrescentam 0,1 ml de fenol a 80% e 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Agita-se o tubo e aguardam-se 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir faz-se a leitura da extinção no fotocolorímetro Klett-Summerson, utilizando filtro de 490 m $\mu$  (n.º 52). Estes valores são convertidos em concentração de glicogênio pela comparação com os resultados da curva padrão. Na preparação desta utilizaram-se concentrações conhecidas de glicogênio puro (Pfanstiehl).

O método fenol-sulfúrico para dosagem de glicogênio em tecidos apresenta como vantagens a simplicidade, flexibilidade e reprodutibilidade. Substâncias que poderiam interferir nos resultados, como aldeídos, cetonas e ceto-ácidos, estão em baixa concentração em muitos tecidos, particularmente depois de sofrerem a ação do hidróxido de potássio a quente, e são também removidos com a precipitação do glicogênio com álcool. Proteínas e amino-ácidos não interferem nesta técnica colorimétrica. Além disso, é um método rápido, que usa reagentes estáveis, e a coloração obtida também é estável durante horas.

### 3. — *Extração da insulina pancreática*

Para extrair a insulina do pâncreas utilizou-se o método de Fisher e Scott (1934). Retirados imediatamente após a abertura do plastrão, os pâncreas foram limpos, pesados e guardados em congelador a  $-30^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceram congelados até o momento da extração da insulina. Como o pâncreas da *Chrysemys* pesa relativamente pouco, reuniram-se 2 ou 3 pâncreas para cada extração. Esta técnica, em resumo, compreende as seguintes etapas: corta-se todo o pâncreas em diminutas porções, colocando-se em solução álcool-ácido- $\text{H}_2\text{O}$  (900:15:35 V/V), num volume de 4 ml por grama de tecido. Depois de um repouso de 2 horas, o extrato é filtrado em gaze. Repete-se este procedimento mais uma vez. Neutraliza-se o líquido de extração com hidróxido de amônio, levando-o até pH 8. Retira-se daí uma alíquota, que se coloca no frasco da centrífuga, acrescentando éter e álcool absoluto em proporções de acôrdo com a tabela de extração. Depois de passar a noite no refrigerador à  $4^{\circ}\text{C}$ , centrifuga-se a 2.000 r.p.m., durante 30 minutos. Desprezando o sobrenadante, dissolve-se o precipitado em 10 ml de uma solução que contém: 32 ml de HCl 0,1 N; 8,4 g de NaCl; 1 ml de m-cresol,  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. a 1.000 ml. Esta solução, conservada em refrigerador ( $4^{\circ}\text{C}$ ) e posteriormente dosada em sua concentração de insulina, pelo método da convulsão em camundongos.

### 4. — *Dosagem de insulina pancreática*

Para a determinação da quantidade de insulina contida nos extratos de pâncreas aplicou-se o método da convulsão em camundongos, descrita por Wrenshall (1951).

Empregam-se para cada teste, 72 camundongos fêmeas, com pêsos entre 18 e 22 ou 22 e 26 g, estando êles em jejum de 3 horas e meia. Durante o teste os animais são colocados em caixas especiais, parcialmente imersas em água, onde a temperatura se mantém ao redor de  $37^{\circ}\text{C}$ .

Os camundongos, divididos em 6 grupos de 12 animais, recebem a injeção por via sub-cutânea de 0,2 ml de solução contendo insulina. Dois destes grupos são injetados com soluções padrão, isto é, com 0,1 e 0,05 Unidades de insulina por ml. Para a preparação destas soluções utilizou-se insulina cristalizada Lilly. Os demais grupos recebem a injeção de soluções cuja concentração de insulina é desconhecida (extratos de pâncreas). Determina-se a concentração destas soluções comparando-se o número de animais em convulsão observado nos grupos testemunhas (injetados com soluções padrão) com o número verificado nos grupos que receberam as soluções desconhecidas. Considera-se terminado o teste ao entrarem em convulsão 50% dos camundongos.

Neste método Wrenshall verificou que com 9 ou 10 ensaios com a solução desconhecida o grau de confiança é suficiente para a interpretação dos resultados. Efetuou-se assim êsse número de ensaios para cada amostra. A média dos valores obtidos é multiplicada pelo volume a que foi levado o extrato sendo êste produto dividido pelo volume da ali-quota tomada para obtenção do precipitado. Tal quociente é finalmente multiplicado pelo volume da diluição do precipitado. Êste valor representa o total de unidades de insulina existente na massa pancreática utilizada em cada extração, o qual, dividido pelo pêso do tecido, expressa a quantidade de insulina por gramo de pâncreas (U/g). O resultado pode ser também expresso em U/kg, isto é, unidades de insulina por quilo de pêso corporal.

##### 5 — *Determinação da atividade insulínica do plasma*

Empregou-se o método manométrico, descrito por Ball, Martin e Cooper (1959), baseado no desprendimento de CO<sub>2</sub> pela gordura do epidídimo de rato, «in vitro».

Os ratos Wistar utilizados pesaram entre 120 e 150 g. Depois de um jejum de 5 horas, conforme indicação de Marques et al. (1963), os ratos foram sacrificados por decapitação e de imediato foi retirada a gordura do epidídimo. Esta,

dividida em 4 porções, pesando cada uma cêrca de 50 mg, foi distribuída nos frascos do aparelho de Warburg, que continham como meio de incubação 1 ml de Krebs-Henseleit-bicarbonato (Krebs-Henseleit, 1932) com 200 mg de glicose e 200 mg de gelatina por 100 ml. O pH desta solução foi de 7,4. No braço lateral do frasco de Warburg colocou-se 1 ml de plasma de *Chrysemys*.

Afim de tornar os resultados comparáveis e eliminar a variação individual do rato, 3 ou 4 amostras de plasma de diferentes *Chrysemys* foram ensaiados na gordura de um mesmo animal. Em resumo, distribuíram-se quatro porções do tecido adiposo de um dado rato em 4 frascos. No primeiro acrescentou-se plasma de *Chrysemis* não injetada, no segundo, plasma de *Chrysemis* previamente injetada com glucagon (3 horas antes); no terceiro, plasma de outro animal injetada também com glucagon, porém 6 horas antes, e finalmente, no quarto frasco deixou-se apenas o líquido de incubação (2 ml). Seguiu-se êste critério também para as amostras de plasma colhidas 24, 48, 72 e 96 horas após a injeção de glucagon. Cada amostra de plasma foi ensaiada em 2 ratos, assim os resultados representam a média de dois dados.

Os frascos contendo o líquido de incubação, o plasma e a porção de tecido adiposo eram colocados no aparelho de Warburg, que realiza 120 oscilações por minuto à temperatura constante de 37°C. Introduzia-se nos frascos uma mistura de 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> e após 10 minutos, iniciavam-se as leituras nos manômetros. Depois de 15 minutos, procedia-se à mistura do plasma com a gordura, continuando a incubação por mais 2 horas. Ao final, pesava-se a gordura, em balança de torsão, com precisão de 0,1 mg.

A produção de CO<sub>2</sub> pelo tecido adiposo «in vitro» é determinada pelo aumento de pressão verificado através das leituras nos manômetros. Da multiplicação do valor do aumento (diferença entre leitura final e inicial) pela constante do sistema frasco-manômetro, resulta o volume total em  $\mu$ l de CO<sub>2</sub> produzido durante a incubação com o plasma, o qual dividido pelo pêsso do tecido em gramas e pelo tempo de incubação em

horas, exprime a quantidade de  $\text{CO}_2$  produzida por grama e por hora ( $\mu\text{l}$  de  $\text{CO}_2/\text{g}/\text{h}$ ).

Determinou-se, também, a produção de  $\text{CO}_2$  em resposta a quantidades conhecidas de insulina. Usou-se para isto insulina cristalizada Lilly, dissolvida em solução apropriada (pag. 321. Momentos antes de ser usada, tomou-se certa quantidade daquela solução e diluiu-se em Krebs-Henseleit-bicarbonatado, de forma a dar as concentrações finais de 10 e de 100  $\mu\text{U}/\text{ml}$ .

Em experimento complementar, incubou-se plasma de *Chrysemys* com cisteína (0,02 M), a  $37^\circ\text{C}$ , durante 18 horas, segundo indicação de Wallance-Owen e Hurlock (1954). Como se sabe, a cisteína inativa a insulina por redução das pontes dissulfeto.

O método «in vitro» da gordura do epidídimo do rato, para a medida da atividade insulínica do plasma, não é específico, muito embora o tecido adiposo apresente grande sensibilidade a êste hormônio. Outras substâncias também têm ação sobre o metabolismo da gordura, podendo provocar aumento na produção de  $\text{CO}_2$ . Por esta razão, os resultados obtidos por êste método são considerados como de atividade semelhante à insulina (insulin-like activity). Para maior facilidade de expressão, entretanto, costuma-se empregar o termo reduzido «atividade insulínica», para indicar aquêlo efeito.

Considerando-se o inconveniente da não especificidade dêste método, uma outra série de experimentos foi realizada com o objetivo de demonstrar a presença de outras substâncias no plasma da *Chrysemys*, capazes de influir nos resultados obtidos anteriormente. Estudou-se, assim, a ação do glucagon, da epinefrina e da maior concentração de glicose, sobre a produção de  $\text{CO}_2$  pelo tecido adiposo «in vitro». Seguiu-se a técnica acima descrita, empregando-se as seguintes concentrações: 2 ou 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de glucagon, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de epinefrina\* e 250 mg/100 ml de glicose.

---

(\*) Utilizou-se bitartrato de L-epinefrina (Mann Research Laboratories).

## 6. — *Extração e dosagem de epinefrina no plasma*

Aplicou-se a técnica de von Euler e Lishajko (1959) para extração das catecolaminas do plasma. Consiste o método no seguinte: cerca de 12 ml de sangue são retirados com seringa heparinizada. Após imediata centrifugação, o plasma é transferido para um béquer ao qual se acrescenta igual volume de acetato de sódio 0,2 N. Leva-se a pH 8,3 com hidróxido de sódio 0,1 N, medindo em potenciômetro Beckman. A seguir, passa-se em coluna de alumina ( $Al_2O_3$ ), numa velocidade de 1-2 ml por minuto. Lava-se a coluna com 10 ml de água destilada, na mesma velocidade. Fazem-se passar pela coluna 10 ml de acetato de sódio, e logo elui-se com 6 ml de ácido acético 0,25N.

A dosagem das Catecolaminas no eluido foi efetuada segundo o método fluorimétrico de Cohen e Goldenberg (1957). Em 2 ml de eluato acético, ajustado a pH 6,5 (potenciômetro), acrescentam-se 0,5 ml de fosfato disódico 0,8 M e 0,9 ml de hidróxido de sódio 0,1 N. Agitados os tubos, completam-se 8 ml com água destilada. Oxidam-se as amostras, pela adição de 10 a 20 mg de dióxido de manganês, formando-se adreno-cromo e nor-adrenocromo. Agitados os tubos por repetida inversão, durante 1 minuto, centrifuga-se a 2.500 r.p.m. durante 3 minutos. Divide-se o sobrenadante límpido em duas partes iguais. A uma delas, acrescentam-se 0,5 ml de mistura ascórbica-alcalina para formação das respectivas lutinas fluorescentes. À outra parte, adicionam-se 0,5 ml de hidróxido de sódio 5 N para usar como branco.

Para a medida da fluorescência usou-se o fluorômetro Farrand modelo A (Farrand Optical Co Inc, New York), com duas séries combinadas de filtros que permitem a determinação simultânea de epinefrina e nor-epinefrina. A primeira série (A) consiste em um filtro primário Farrand n. 5860 para a fluorescência. A segunda série (B) é uma combinação primária de Farrand n.º 3389 e Corning n.º 5113, e uma secundária Farrand n.º 3486.

Normaliza-se o fluorômetro na graduação 100 da escala do galvanômetro com uma amostra de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de epinefrina\* para cada série de filtros, utilizando diafragma n.º 4. Preparam-se também uma amostra de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de nor-epinefrina\*\* e um branco de reativos.

Efetuaram-se três determinações para cada eluído acético, realizando 2 leituras com cada uma delas. Para o cálculo final, empregaram-se as seguintes fórmulas, de acôrdo com Cohen e Goldenberg (1957).

$$\text{Ne} = \frac{(A \text{ Eb}/\text{Ea}) - B}{(Na \text{ Eb}/\text{Ea}) - Nb} = Y \quad \text{E} = \frac{B - y \text{ Nb}}{\text{Eb}} = X$$

onde:

Ea — Valor da leitura no galvanômetro obtida com epinefrina, descontado o branco para a série de filtros «A», dividido pela concentração.

Eb — Idêntico procedimento usando a série de filtros «B».

Na — Idem para nor-epinefrina usando a série de filtros «A».

Nb — Idem para a série de filtros «B».

A — Valor da leitura obtida com a amostra e usando a série de filtros «A».

B — Idem para a amostra usando a série de filtros «B».

Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de epinefrina ou nor-epinefrina por 100 ml de plasma.

### 3.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### A — *Experimento prolongado*

A injeção diária do glucagon em *Chrysemys* durante 30 dias produziu alterações da glicemia, do glicogênio hepático,

(\*) Monohidrato bitartrato de L-epinefrina.

(\*\*) Monohidrato bitartrato de L-nor-epinefrina (Sterling Winthrop Research Institute).

da atividade insulínica do plasma e do teor de insulina pancreática.

### 1. *Efeitos sobre a glicemia*

A administração de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  de glucagon, durante o verão, provocou aumento da glicemia, que se acentuou com a continuação do tratamento (Tab 1 e Gráf. 1). Comparando-se êstes resultados com os apresentados pelas testemunhas, observa-se que a diferença é estatisticamente significativa aos 20 e 30 dias de tratamento, mas não aos 10 dias.

O tratamento com menor dose de glucagon (50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ ) causou moderada hiperglicemia, com diferença significativa apenas aos 30 dias, isto é, no final do experimento ( $P < 0,0001$ ). (Tab. 1 e Gráf. 1).

A resposta hiperglicêmica à injeção de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  de glucagon foi maior do que a produzida pela injeção de 50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ , contudo, as diferenças entre os dois grupos não têm valor estatístico.

O grupo testemunha que recebeu o veículo do glucagon não apresentou variações apreciáveis em seus níveis glicêmicos.

A administração de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  de glucagon, durante o inverno, acarretou marcada elevação da glicemia já a partir do 10.º dia de tratamento. Esta hiperglicemia, no entretanto, foi diminuindo com a repetição das injeções. Em relação ao grupo testemunha, esta diferença permaneceu sempre significativa ( $P < 0,001$ ) (Tab. 1 e Gráf. 1).

Comparando-se os resultados dos dois grupos tratados com 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  de glucagon, nas duas estações do ano, vêem-se diferenças bem marcadas. Enquanto no verão, a glicemia vai aumentando gradativamente, no inverno ela sobe rapidamente, para ir diminuindo com o decorrer da experiência. Desta forma, a diferença entre ambos os grupos é significativa apenas no 10.º dia de tratamento ( $P < 0,001$ ).

No experimento realizado durante o inverno, seis das *Chrysemys* injetadas com glucagon foram observadas após a interrupção do tratamento. Como se pode ver no Gráf. 3, o aumento dos níveis glicêmicos não se manteve e, depois de 20 dias desta interrupção, a glicemia apresentou-se completamente normalizada.

Os resultados obtidos indicam que a *Chrysemys* submetida a tratamento prolongado com o glucagon comporta-se como um animal bastante sensível à sua ação hiperglicemiante. Apenas um outro réptil, *Xenodon merremii*, foi utilizado em experimento deste tipo (Cardeza, 1960). A dose empregada neste animal foi 100 vezes maior e, contudo, os resultados foram semelhantes aos da *Chrysemys*. Em outras espécies, como ratos, cães, gatos, cobaias e coelhos, a administração prolongada do glucagon não modificou a glicemia ou elevou-a em forma moderada.

Ratos tratados durante 6 meses com 1 mg de glucagon não apresentaram hiperglicemia (Root, 1954). Também Galansino et al. (1955) não encontraram este efeito do glucagon em ratos. Elrich et al. (1958), empregando espécies mais sensíveis a este hormônio, como cães e gatos, provocaram hiperglicemia somente com doses altas: 3,6 e 10 mg. Volk e Lazarus (1960) injetaram glucagon em cobaias e coelhos, três vezes ao dia, e encontraram apenas leve hiperglicemia. Somente Logothetopoulos et al. (1960) obtiveram hiperglicemia intensa e permanente, ao tratar coelhos com glucagon, a partir do primeiro dia de vida e prolongando o tratamento por 7 meses.

O efeito hiperglicêmico do glucagon em *Chrysemys* apresentou variações segundo a época do ano. De acordo com Behrens et al. (1956) o efeito deste hormônio é maior quando o teor de glicogênio hepático está alto. Assim, a maior hiperglicemia observada no inverno pode ser consequência do aumento das reservas de glicogênio hepático. Contudo, é possível que outros mecanismos também contribuam para aumentar aquele efeito no inverno. Discutiremos este ponto, posteriormente.

TABELA 1

Médias dos valores glicêmicos de *Chrysemys d'orbigny* injetadas com glucagon, via subcutânea, durante 30 dias.

Estação do ano	Grupo N.º	Tratamento	Dose diária (µg/kg)	N.º de animais	Glicemia (mg/100 ml)				
					0	10	20	30	D I A S
Verão	1	Glucagon	100	7	75 ± 9,4*	121 ± 32,2	141 ± 23,6	149 ± 13,6	
	2	Glucagon	50	7	68 ± 7,0	89 ± 12,6	105 ± 17,7	121 ± 12,6	
	3	Solução fisiol.	—	6	74 ± 10,9	95 ± 7,4	66 ± 5,5	59 ± 3,6	P <sub>1-3</sub> < 0,001
Inverno	4	Glucagon	100	14	86 ± 5,0	275 ± 18,4	197 ± 10,7	158 ± 5,9	P <sub>1-3</sub> ** < 0,02
	5	Solução fisiol.	—	10	90 ± 11,0	47 ± 4,0	56 ± 7,9	67 ± 11,4	P <sub>4-5</sub> < 0,001
						P <sub>1-4</sub> < 0,001	P <sub>4-5</sub> < 0,001		

\* Média e erro-padrão. Erro-padrão calculado pela fórmula  $e = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n(n-1)}}$

\*\* P 1-3 significa a probabilidade dada pela tabela de Fisher e Yates (1934) na distribuição t quando se comparam os grupos 1 e 3. Usou-se a mesma notação na comparação dos outros grupos.

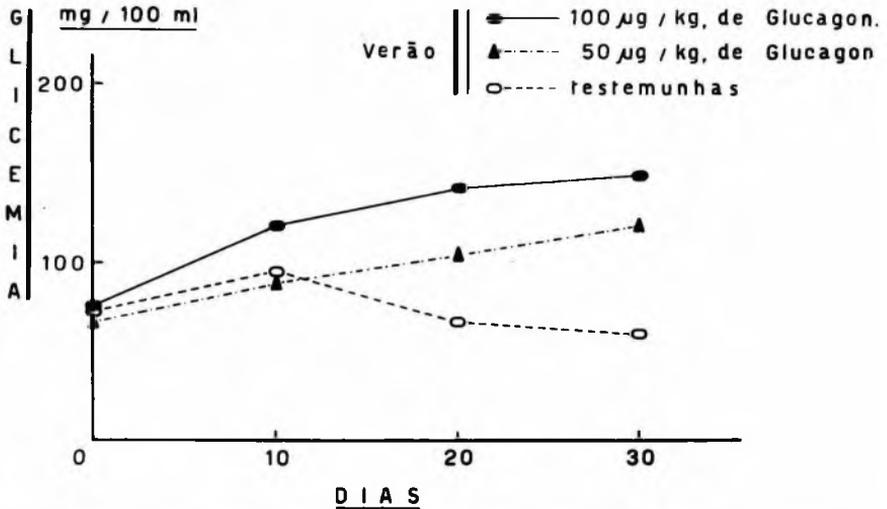


Gráfico 1 - Variações da glicemia de *Chrysemys* injetadas com diferentes doses de glucagon por via subcutânea durante 30 dias. Testemunhas tratadas com solução fisiológica.

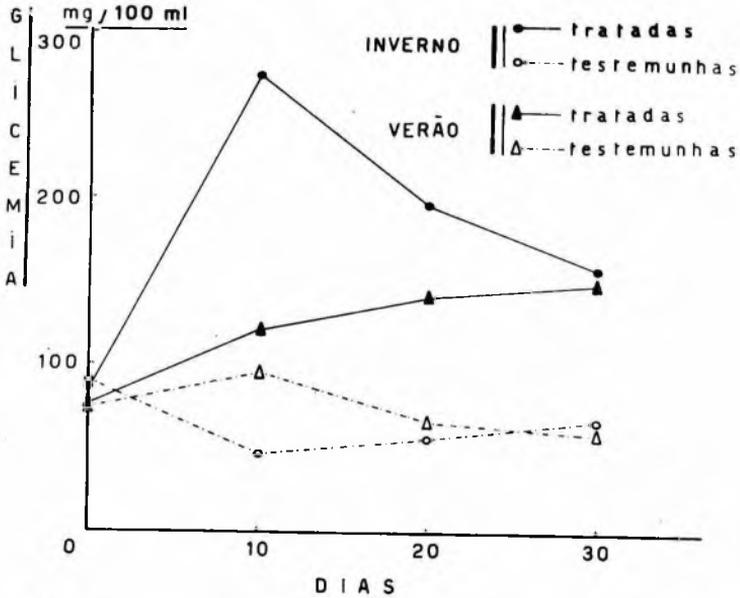


Gráfico 2 - Variações da glicemia de *Chrysemys* injetadas com 100 µg/kg/dia de glucagon durante 30 dias no inverno e no verão. Testemunhas tratadas com solução fisiológica.

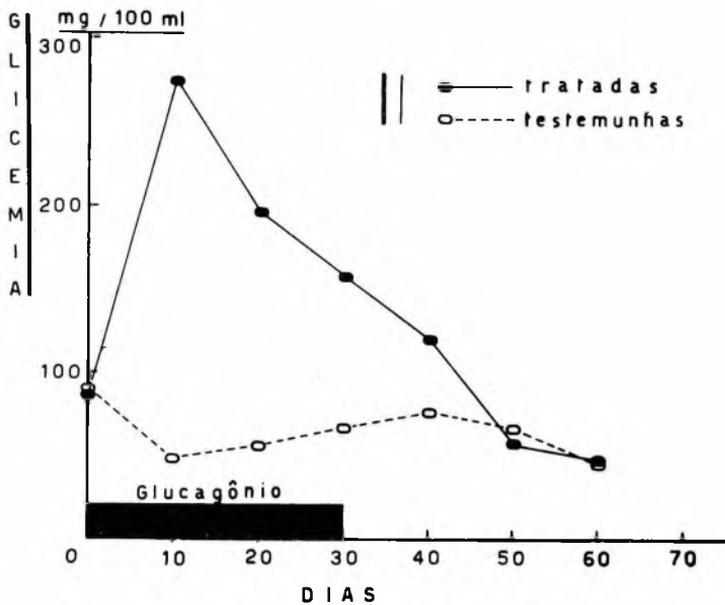


Gráfico 3 - Normalização da glicemia de *Chrysemys* após a interrupção do tratamento com glucagon ( $100 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ ). Testemunhas tratadas com solução fisiológica.

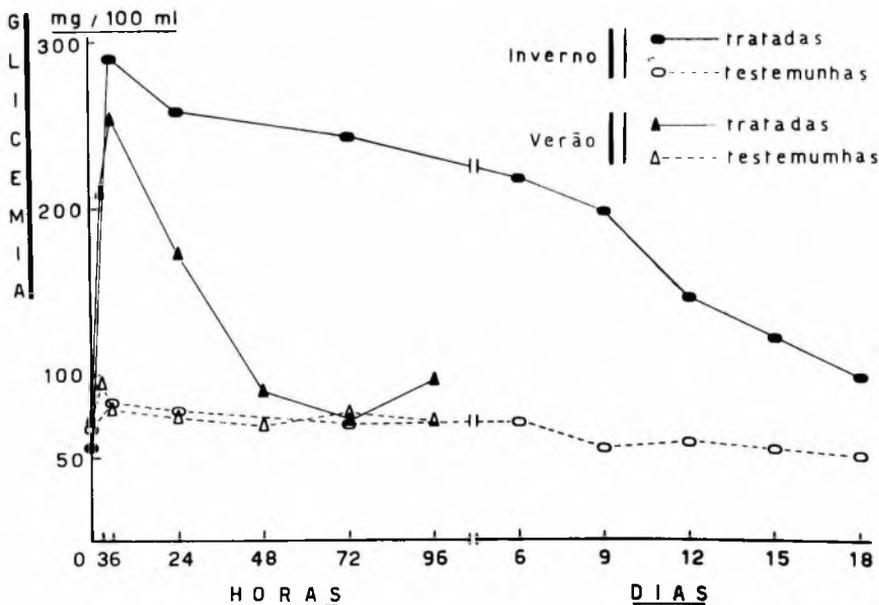


Gráfico 4 - Variações da glicemia de *Chrysemys* injetadas com glucagon ( $100 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ ) por via sub-cutânea, uma única vez, durante o inverno e o verão. Testemunhas tratadas com solução fisiológica.

Ainda no inverno, a hiperglicemia provocada pelo glucagon diminuiu com a continuação do tratamento. Cardeza (1960) fez idêntica observação em *Xenodon merremii*. Lazarus e Volk (1958) também verificaram êste fato em cobaias e coelhos, e o atribuíram a um aumento da insulinogênese. Para Logothetopoulos et al. (1960), esta diminuição poderia ser uma consequência do efeito compensatório do pâncreas que apresenta hiperplasia das ilhotas, ou, resultante de uma progressiva perda de sensibilidade ao glucagon.

A normalização da glicemia depois de suspenso o tratamento concorda com os experimentos em coelhos (Lazarus e Volk, 1958) e em cães e gatos (Elrich et al., 1958).

Observou-se intensa hiperglicemia em *Chrysemys* pela ação do glucagon, contudo, apesar dêste animal ser muito sensível à ação dêste hormônio, a hiperglicemia não foi permanente.

## 2. Efeitos sôbre o teor de glicogênio hepático e muscular.

Depois de 30 dias da administração diária de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , de glucagon, durante o verão, o glicogênio hepático ficou reduzido em 46% do valor apresentado pelas testemunhas. Os animais tratados com 50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  tiveram uma diminuição de 30% do glicogênio hepático (Tab. 2). Comparando-se êstes resultados com os apresentados pelas testemunhas, encontra-se no primeiro grupo uma diferença significativa da ordem de  $P < 0,01$  e, no segundo,  $P < 0,05$ .

Durante o inverno, o glucagon provocou maior redução relativa do glicogênio hepático (64% do valor da respectiva testemunha). Esta diferença é altamente significativa ( $P\% < 0,01$ ). Depois de 30 dias da interrupção do tratamento o teor do glicogênio hepático voltou a níveis normais (Tab. 2).

No inverno, *Chrysemys* não tratadas com glucagon apresentam teor mais elevado de glicogênio hepático (Tab. 2), o que concorda com as observações de Dessauer (1953) em *Anolis carolinensis*.

Por outro lado, a redução do glicogênio hepático em *Chrysemys* injetadas com glucagon discorda dos resultados de outros autores. Galansino et al. (1955) encontraram níveis normais de glicogênio hepático em ratos tratados com glucagon e, Root (1956) e Salter (1960) verificaram-no aumentado em coelhos e ratos. Talvez estas diferenças possam ser atribuídas à maior lentidão dos processos metabólicos nos répteis. Em *Alligator mississippiensis*, por exemplo, há necessidade de glicemia elevada por vários dias afim de aparecer um aumento significativo no teor de glicogênio hepático (Coulson e Hernandez, 1964). Costa et al. (1956) haviam observado que, em ratos tratados com glucagon, há, inicialmente, diminuição do glicogênio hepático e, secundariamente, aumento acima dos níveis normais. Sugerem êstes autores que êste efeito secundário se deve a um aumento da secreção de insulina ou de hormônios corticais, ou de ambos. Possivelmente, em *Chrysemys*, a secreção de insulina seria insuficiente para aumentar o glicogênio hepático, ou então êsse efeito apareceria mais tardiamente.

No verão, o teor de glicogênio muscular em *Chrysemys* não tratadas é significativamente menor do que no inverno e a administração de glucagon não o modifica (Tab. 2). Milman et al. (1954) e Costa et al. (1956), verificaram aumento ocasional do glicogênio muscular em animais tratados com glucagon. Porém, para êstes autores, o pequeno aumento não parece ser um efeito direto e específico do glucagon mas um resultado da secreção de insulina.

### 3. Efeitos sobre a atividade insulínica do plasma

A atividade insulínica do plasma de *Chrysemys* injetadas com glucagon foi determinada nos 25 dias do tratamento. Os resultados (Tab. 5), mostram que a atividade insulínica do plasma dos animais tratados sofreu aumento de 45% em relação à mesma atividade dos não injetado ( $P < 0,05$ ).

Os dados aquí referidos não são suficientes para indicar a causa dêste aumento da atividade insulínica do plasma, isto

TABELA 2

Teor de glicogênio hepático e muscular em *Chrysemys d'orbigny* injetadas com glucagon, via sub-cutânea, durante 30 dias.

Estação do ano	Grupo N.º	Tratamento	Dose diária ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	N.º de animais	GLICOGENIO	
					hepático (g%)	muscular (g%)
Verão	1	Glucagon	100	6	2,62 $\pm$ 0,339	0,62 $\pm$ 0,049
	2	Glucagon	50	6	3,40 $\pm$ 0,482	0,64 $\pm$ 0,064
	3	Solução fisiol.	—	6	4,88 $\pm$ 0,428	0,72 $\pm$ 0,169
Inverno	4	Glucagon	100	6	P <sub>1-3</sub> < 0,01	3,43 $\pm$ 0,853
	5	Solução fisiol.	—	6	P <sub>2-3</sub> < 0,05	2,61 $\pm$ 0,438
	6*	Glucagon	100	4	3,02 $\pm$ 0,161	1,65 $\pm$ 0,150
	7*	Solução fisiol.	—	5	8,44 $\pm$ 0,757	2,08 $\pm$ 0,350
					6,40 $\pm$ 0,548	P <sub>4-5</sub> < 0,001
					7,42 $\pm$ 0,674	P <sub>6-5</sub> < 0,01
						P <sub>3-7</sub> < 0,01

\* Sacrificados 30 dias após a interrupção do tratamento.

é, se se deve à uma ação direta do glucagon sobre o pâncreas ou ao seu efeito hiperglicemiante. Foà (1956) havia admitido que o glucagon poderia estimular a secreção de insulina, em vista de seu efeito hiperglicêmico ser menor em presença do pâncreas, do que na sua ausência. No entretanto, recentes observações em fatias de pâncreas «in vitro» permitem afirmar que o glucagon não estimula a secreção de insulina e nem modifica a excitação produzida pela alta concentração de glicose (Randle 1964).

Por outro lado, o efeito estimulante da hiperglicemia sobre a secreção de insulina já foi bem evidenciado através de experimentos «in vivo» e «in vitro». Entre os primeiros citam-se os trabalhos clássicos de Houssay e Deulofeu (1939), de Foà et al., (1949), de Brown et al. (1952) e, modernamente, os de Yallow e Berson (1960). Entre os últimos, destacam-se os trabalhos de Anderson e Long (1947) que foram recentemente confirmados por Grodsky e colaboradores (1962).

Assim, em face das demonstrações dos citados autores, pode-se admitir que a hiperglicemia produzida pelo glucagon em *Chrysemys*, estimula a secreção de insulina.

#### 4. Efeitos sobre o conteúdo de insulina pancreática

A administração de 100 ou 50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  de glucagon em *Chrysemys* durante o verão, provocou um aumento no teor de insulina do pâncreas, tanto calculado em unidades de insulina por gramo de tecido, como por quilo de peso corporal. Este aumento, contudo, não foi estatisticamente significativo (Tab. 3).

Ao contrário, no inverno, a injeção diária do glucagon reduziu o conteúdo de insulina pancreática ( $P < 0,02$ ). Pela comparação destes resultados com os obtidos no verão, resulta uma diferença altamente significativa ( $P < 0,001$ ).

Do exame da Tab. 3, conclue-se que não há diferenças estatísticas nas relações entre peso de pâncreas e peso corpo-

TABELA 3

Teor de insulina pancreática em *Chrysemys d'orbigny* injetadas com glucagon, via cutânea, durante 30 dias

Estação do ano	Verão fisiol.	Tratamento	Dose diária ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	N.º de animais	INSULINA			Relação pâncreas peso corporal (g/kg)
					por pâncreas (U/g)	por peso corporal (U/kg)	por peso corporal (g/kg)	
N.º Glucagon fisiol.	Glucagon Solução Inverno Grupo	1	100	6	1,739 $\pm$ 0,013	2,507 $\pm$ 0,262	1,479 $\pm$ 0,096	
		2	50	6	1,723 $\pm$ 0,162	2,637 $\pm$ 0,283	1,506 $\pm$ 0,107	
Glucagon fisiol.	Glucagon Solução	3	—	6	1,321 $\pm$ 0,316	1,832 $\pm$ 0,313	1,393 $\pm$ 0,123	
		4	100	6	0,870 $\pm$ 0,099	1,308 $\pm$ 0,127	1,540 $\pm$ 0,112	
		5	—	6	1,303 $\pm$ 0,118	1,753 $\pm$ 0,204	1,345 $\pm$ 0,079	
					$P_{4-5} < 0,02$			
					$P_{1-4} < 0,001$			
						$P_{1-1} < 0,01$		

\* Dosagem da insulina pancreática pelo método da convulsão em camundongos.

ral, quando se comparam os diferentes grupos experimentais. Observa-se, também, que o teor de insulina do pâncreas de animais não tratados é o mesmo tanto no inverno como no verão.

Os efeitos do glucagon sobre o conteúdo de insulina do pâncreas de *Chrysemys* revelaram diferenças relacionadas com a época do ano. Em experimento realizado durante o verão o teor de insulina mostrou um pequeno aumento embora não estatisticamente significativo e, no inverno ao contrário ficou reduzido. Salter et al. (1957) também haviam verificado redução da insulina pancreática em cães que receberam glucagon em tratamento prolongado.

Segundo Haist (1944) o teor de insulina do pâncreas representa, a cada instante, o balanço entre a produção e a secreção do hormônio. A redução de seu conteúdo pode, portanto, resultar de uma diminuição de sua produção ou de um aumento da secreção ou destes efeitos simultâneos.

Aplicando-se este conceito na análise dos resultados acima apresentados, pode-se sugerir o seguinte: A hiperglicemia intensa verificada nos animais tratados com glucagon, durante o inverno, talvez tenha determinado maior secreção de insulina pelo pâncreas, sem ocorrer um equivalente aumento de produção, daí resultando a diminuição de seu conteúdo.

No verão, porém, o glucagon não reduziu o conteúdo de insulina pancreática, tendo-se mesmo observado um pequeno aumento. Pareceria, pois, que o moderado efeito hiperglicêmico do glucagon nesta época do ano, tivesse provocado menor estímulo secretório sobre o pâncreas, verificando-se ainda uma produção de insulina equivalente ou mesmo levemente superior à liberada.

O fato de haver utilizado um método biológico para avaliar a insulina extraída do pâncreas de *Chrysemys* sugere que a insulina deste Quelônio tem ação semelhante à produzida pelos mamíferos, uma vez que foi capaz de provocar convul-

são em camundongos. É possível, entretanto, que haja diferenças estruturais entre ambas, como se sabe existir entre insulinas provenientes de diferentes espécies de animais.

## B — *Experimento agudo*

Tendo sido observada uma clara influência estacional sobre os efeitos provocados pela administração prolongada do glucagon em *Chrysemys*, julgou-se conveniente verificar se esta influência também poderia ocorrer em experimento agudo. Assim, nesta parte do trabalho, administrou-se uma única injeção de glucagon, avaliando sua ação através dos efeitos sobre a glicemia, em duas épocas distintas do ano.

No experimento realizado durante o verão, complementou-se a observação sobre a glicemia, determinando a atividade insulínica do plasma em diferentes intervalos após a administração do glucagon.

### 1. *Efeitos sobre a glicemia*

A injeção sub-cutânea de glucagon (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em *Chrysemys* produziu acentuada hiperglicemia no verão. O valor glicêmico máximo foi alcançado depois de 6 horas do tratamento (253 mg%), diminuindo sensivelmente nas 24 horas seguintes e retornando aos níveis normais às 48 horas. Decorridas 96 horas houve leve aumento da glicemia (Tab. 4 e Gráf. 4).

Da comparação dos valores glicêmicos obtidos nas horas subsequentes à injeção do glucagon com o valor inicial do grupo tratado ou com o das respectivas testemunhas resultam diferenças estatisticamente significativas às 3, 6 e 24 horas ( $P < 0,001$ ) e, posteriormente, às 96 horas ( $P < 0,05$ ).

Os animais que serviram como testemunhas, tanto no inverno como no verão, não mostraram variações apreciáveis na glicemia.

Durante o inverno, o glucagon injetado em dose de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  provocou hiperglicemia intensa e prolongada. A glice-

mia mais alta ocorreu após 6 horas do tratamento (290 mg%), e permaneceu elevada por 12 dias (Tab. 4). Todos os valores desta curva guardam diferenças altamente significativas quando comparados com o da glicemia inicial do mesmo grupo ou com os valores das testemunhas ( $P < 0,001$ ). Aos 18 dias, embora a glicemia já tivesse baixado sensivelmente, a diferença em relação aos valores iniciais ainda era bem acentuada ( $P < 0,01$ ).

A influência da época do ano sobre o efeito hiperglicêmico do glucagon em *Chrysemys* é um fato evidente. Enquanto no verão seu efeito dura apenas 24 horas, no inverno, mesmo decorridos 18 dias, a glicemia não volta aos níveis iniciais.

A maioria dos autores que estudaram a ação do glucagon em répteis não se ocupou em repetir experiência nas distintas épocas do ano, não tendo observado aquela influência. Apenas DiMaggio (1961) demonstrou em *Anolis carolinensis*, que a hiperglicemia provocada por 5.000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de glucagon é maior

TABELA 4

Médias das glicemias em *Chrysemys d'orbigny* injetadas, uma única vez, com glucagon (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), via sub-cutânea.

N.º de animais Tratamento	Glicemias (mg/100 ml)			
	VERÃO		INVERNO	
	8	8	6	6
	Glucagon	Solução fisiológica	Glucagon	Solução fisiológica
Horas				
0	74 $\pm$ 4,2	73 $\pm$ 6,3	56 $\pm$ 10,2	67 $\pm$ 5,4
3	210 $\pm$ 9,6*	94 $\pm$ 4,6		
6	253 $\pm$ 7,1*	79 $\pm$ 5,8	290 $\pm$ 14,0*	82 $\pm$ 7,7
24	172 $\pm$ 8,8*	74 $\pm$ 12,2	258 $\pm$ 16,3*	78 $\pm$ 5,6
48	89 $\pm$ 6,4	69 $\pm$ 4,2		
72	74 $\pm$ 4,5	76 $\pm$ 10,6	243 $\pm$ 12,8*	70 $\pm$ 5,0
96	96 $\pm$ 8,3***	71 $\pm$ 8,6		
Dias				
6			218 $\pm$ 14,8*	71 $\pm$ 3,7
9			198 $\pm$ 21,3*	55 $\pm$ 3,1
12			147 $\pm$ 1,6*	60 $\pm$ 3,6
18			98 $\pm$ 7,1**	51 $\pm$ 3,0

\* $P < 0,001$ , \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,05$ , respectivamente quando as médias são comparadas com os valores iniciais.

no outono do que no inverno. Stevenson et al. (1957) administrando diversas doses de glucagon em *Alligator mississippiensis* verificaram que seu efeito é proporcional às doses, mas não mencionaram a época do ano. Da mesma forma Miller e Wurteh (1958) observaram aumento da glicemia em *Eumeces obsoletus* após 2 horas da administração do glucagon. Housay e Penhos (1960) encontraram em *Xenodon merremii* um efeito hiperglicêmico bastante intenso, que se prolongou por 25 dias. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados na *Chrysemys* durante o inverno, contudo, a dose de glucagon administrada às serpentes foi 100 vezes maior do que a injetada na *Chrysemys*.

Vê-se, pois, que em comparação aos demais répteis utilizados em experimentos com o glucagon, a *Chrysemys* é o que apresenta maior sensibilidade a este hormônio.

O maior efeito hiperglicêmico do glucagon durante o inverno confirma a hipótese de que a maior reserva de glicogênio hepático observada nesta época, favoreceria êsse efeito. Mas, para manter essa hiperglicemia por tão longo tempo, outros fatores deverão concorrer. É provável que toda a atividade metabólica da *Chrysemys* se encontre reduzida nessa época do ano, tardando assim, a pôr em ação os mecanismos reguladores da glicemia.

## 2. *Efeitos sobre a atividade insulínica do plasma.*

Mediu-se a atividade insulínica do plasma da *Chrysemys* determinando o aumento da produção de CO<sub>2</sub> pelo tecido adiposo quando incubado em presença do plasma. Os resultados apresentados na Tab. 5 mostram que o plasma dêste Quelônio possui certa atividade semelhante à insulina, pois verificou-se um aumento de 55% na produção de CO<sub>2</sub> em relação à testemunha (Krebs e tecido apenas), sendo o valor de P < 0,001. Contudo, a atividade insulínica de 0,5 ml de plasma, quando comparada à atividade de concentrações conhecidas de insulina, resulta ser menor do que 10 $\mu$ U/ml.

A determinação da atividade insulínica do plasma de *Chrysemys* injetadas com glucagon mostrou diferentes resultados conforme o tempo decorrido daquela injeção (Tab. 6 e Gráf. 5). Após 3 e 6 horas, verificaram-se aumentos na produção de  $\text{CO}_2$ , os quais foram, respectivamente, de 28 e de 40% em relação à atividade do plasma dos animais não injetados. Há diferença acentuada apenas no valor obtido às 6 horas ( $P < 0,02$ ). Os resultados observados às 24 horas assemelham-se aos da atividade inicial, ou seja, antes de injetar o glucagon. Após 48 horas, há novamente um aumento na produção de  $\text{CO}_2$ , cuja diferença em relação aos dados iniciais é bastante expressiva ( $P < 0,001$ ). Após 72 e 96 horas da injeção do glucagon nota-se pequena diminuição da atividade insulínica do plasma, porém sem significado estatístico.

Os resultados acima representados revelam alterações da atividade insulínica do plasma de *Chrysemys* quando injeta-

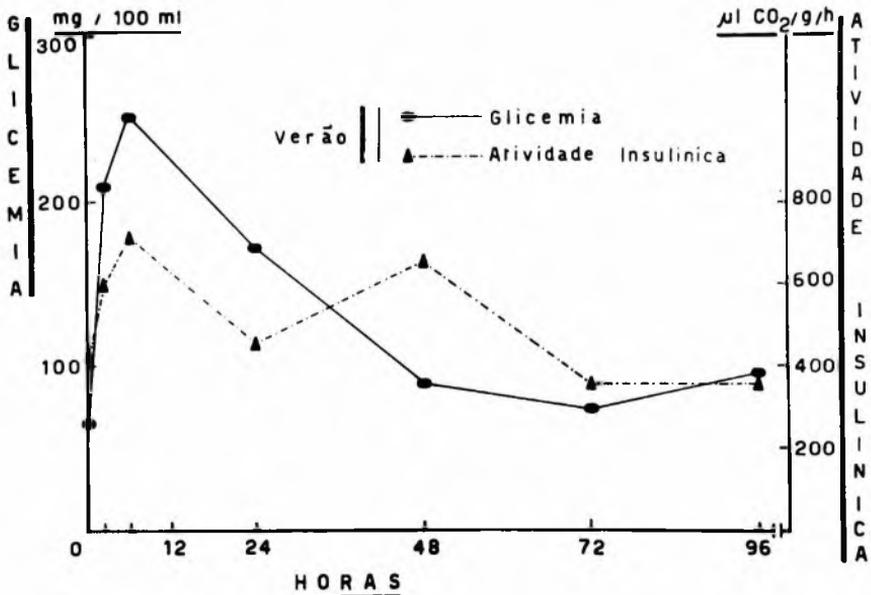


Gráfico 5 - Variações da glicemia e da atividade insulínica do plasma de *Chrysemys* injetadas com glucagon (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) por via sub-cutânea durante o verão.

das com glucagon. Há aumento daquela atividade após 6 e 48 horas da sua administração.

Como o método do tecido adiposo «in vitro» não é específico para insulina, admitiu-se que outras substâncias presentes no plasma estivessem interferindo nos resultados. Por essa razão, efetuou-se, a seguir, uma série de experimentos com o objetivo de tentar esclarecer a causa do aumento da produção de CO<sub>2</sub> verificado às 6 e às 48 horas da injeção do glucagon.

Inicialmente, mediu-se a atividade insulínica do plasma de *Chrysemys* injetadas com glucagon, incubando-se previamente estas amostras de plasma com cisteína que, como se sabe, inativa a insulina, de modo a fazer desaparecer sua ação.

Os resultados mostram que a atividade insulínica do plasma retirado de *Chrysemys* após 6 horas da injeção do glucagon não foi modificada pela incubação prévia com cisteína (Tab. 7). Houve redução desta atividade em plasma colhido 48 horas depois daquela injeção. Admite-se, assim, que a maior produção de CO<sub>2</sub> provocada pelo plasma obtido depois de 6 horas provavelmente não se deva a um aumento de insulina, mas à presença de outra substância também ativa sobre o metabolismo do tecido adiposo.

Convém mencionar que o experimento relativo à incubação com cisteína, bem como os que serão discutidos a seguir, foram realizados durante o mês de maio (outono - temp. média 20°C). Como se pode ver na Tab. 7, a produção de CO<sub>2</sub> pelo plasma dos animais injetados com glucagon é menor do que a produzida pelo plasma dos igualmente tratados em fevereiro e março (Temp. média 25°) (Tab. 5 e 6). Do mesmo modo, a atividade insulínica do plasma dos não injetados está diminuída nêstes experimentos (Tab. 8 e 10).

Observando-se que o aumento da atividade insulínica do plasma retirado após 6 horas da injeção do glucagon coincidia com a glicemia mais alta (Gráf. 5), procurou-se determinar se

TABELA 5

Avaliação da atividade insulínica do plasma de *Chrysemys d'orbigny* em  $\mu\text{l}$  de  $\text{CO}_2$  produzido pelo tecido adiposo de rato, "in vitro".

	Meio de incubação com tecido adiposo acrescido de:	Conc. final por ml	N.º de determinações	$\mu\text{l}$ $\text{CO}_2/\text{g}/\text{h}$	Aumento em relação à testemunha	P entre os grupos
1	(Testemunha)		10	275 $\pm$ 19,7		
2	Insulina	10 $\mu\text{U}$	8	488 $\pm$ 40,2	77%	$P_{1-2} < 0,001$
3	Insulina	100 $\mu\text{U}$	8	775 $\pm$ 42,1	177%	$P_{1-3} < 0,001$
4	Plasma de <i>Chrysemys</i> injetadas com solução fisiológica	0,5 ml	10	427 $\pm$ 23,0	55%	$P_{1-4} < 0,001$
5	Plasma de <i>Chrysemys</i> injetadas com glucagon durante 25 dias	0,5 ml	6	621 $\pm$ 79,8	125%	$P_{4-5} < 0,05$

a maior concentração da glicose no plasma seria a causa daquele aumento. Como a glicemia média das *Chrysemys* às 6 horas fôra de cerca de 250 mg/100 ml, acrescentou-se glicose ao plasma de animal não injetado, levando-se em conta a glicemia dêste, de modo que o teor de glicose final alcançasse 250 mg/100ml. Os resultados apresentados na Tab. 8, mostram que não houve modificação na produção de CO<sub>2</sub> pelo aumento da concentração de glicose.

Sarcione et al. (1960) demonstraram a existência de certa relação entre a medula supra-renal e o efeito hiperglicêmico do glucagon, e Scian et al. (1960) observaram que êste hormônio aumenta a secreção de catecolaminas. Por outro lado, sabe-se que o tecido adiposo «in vitro» é sensível à epinefrina (Cahill et al., 1960; Lynn et al., 1960; Riet Corrêa et al., 1931) e porisso, poder-se-ia pensar que o aumento inicial da atividade insulínica do plasma das *Chrysemys* injetadas com glucagon fosse provocado pela maior concentração de epinefrina no plasma.

Para demonstrar esta hipótese realizou-se o seguinte experimento: Acrescentou-se 1 µg/ml de epinefrina ao plasma de *Chrysemys* não injetadas, medindo-se a seguir a produção de CO<sub>2</sub> em comparação com a produzida pelo plasma ou por epinefrina separadamente. Observa-se na Tab. 8 que a epinefrina em presença do plasma aumentou a produção do CO<sub>2</sub> ( $P < 0,01$ ).

Admitindo-se a possibilidade de que o aumento da produção de CO<sub>2</sub> pela gordura «in vitro» tenha sido motivado pela maior concentração de epinefrina no plasma, determinou-se então a sua concentração no plasma de *Chrysemys*, antes e depois de 6 horas da administração do glucagon.

Os resultados da Tab. 9 indicam não ter havido aumento na concentração de epinefrina no plasma da *Chrysemys* após 6 horas da injeção do glucagon.

TABELA 6

Atividade insulínica do plasma de *Chrysemys d'orbigny* injetadas com glucagon (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) via sub-cutânea. Avaliação desta atividade em  $\mu\text{l}$  de  $\text{CO}_2$  produzido pelo tecido adiposo de rato "in vitro".

Meio de incubação com tecido adiposo acrescido de 1 ml de:	N.º de determinações	Horas após injeção	$\mu\text{l CO}_2/\text{g/h}$	Aumento em relação à testemunha	P entre os grupos
1 — Plasma de <i>Chrysemys</i> sem injetar (testemunha)	10	—	427 $\pm$ 23,0	—	
2 — Plasma de <i>Chrysemys</i> injetadas com solução fisiológica	4	3	443 $\pm$ 24,2	—	
3 — Idem	6	6	417 $\pm$ 42,4	—	$P_{3-5} < 0,02$
4 — Plasma de <i>Chrysemys</i> injetadas com glucagon	6	3	596 $\pm$ 79,1	28%	
5 — Idem	6	6	715 $\pm$ 96,0	40%	$P_{1-5} < 0,02$
6 — Idem	7	24	459 $\pm$ 75,8	—	
7 — Idem	6	48	658 $\pm$ 27,3	35%	$P_{1-7} < 0,001$
8 — Idem	7	72	354 $\pm$ 34,2	—	
9 — Idem	6	96	359 $\pm$ 42,9	—	

O glucagon foi injetado por via subcutânea e sua absorção, portanto, fez-se lentamente. Isto permite considerar a possibilidade de sua presença nas amostras de plasma colhidas após 3 e 6 horas de sua administração. Por sua vez, segundo as observações de Lee et al. (1960) e de Hagen (1961) o glucagon parece ter ação sobre o metabolismo da gordura «in vitro». Portanto, o aumento da produção de CO<sub>2</sub> pelo tecido adiposo, provocado pelo plasma dos animais tratados

TABELA 7

Atividade insulínica de plasma incubado previamente com cisteína  
Avaliação desta atividade em  $\mu$ l de CO<sub>2</sub> produzido pelo tecido adiposo do rato, "in vitro".

$\mu$ l de CO <sub>2</sub> /g/h			
Plasma de <i>Chrysemys</i> após 6 hs. da administração de glucagon		Plasma de <i>Chrysemys</i> após 48 hs. da administração de glucagon	
Não incubado com cisteína	Incubado com cisteína	Não incubado com cisteína	Incubado com cisteína
634	578	583	225
414	478	590	210
642	340	448	167
352	357	292	181
251	258	566	374
366	228	439	237
443 ± 65,3	373 ± 54,3	490 ± 47,00	232 ± 65,3
		P < 0,01	P < 0,01

TABELA 8

Produção de CO<sub>2</sub> pelo tecido adiposo de rato em presença do plasma de *Chrysemys* não injetadas, acrescido de glicose ou de epinefrina "in vitro".

Testemunha	Acrescido de:		Sòmente Epinefrina (1 $\mu$ g/ml)
	Glicose (250 mg/100 ml)	Epinefrina (1 $\mu$ g/ml)	
396	281	504	519
338	460	416	374
278	450	491	458
416	333	492	430
320	260	448	428
303	373	505	523
342 ± 21,9	359 ± 34,2	476 ± 14,7	455 ± 23,5
		P < 0,01	

previamente com o glucagon (3 e 6 horas), talvez tenha sido induzido pelo próprio glucagon injetado.

Em outra série de experimentos, mediu-se a produção de CO<sub>2</sub> pela gordura incubada com plasma de *Chrysemys* não injetada, ao qual se acrescentou glucagon «in vitro» (2 ou 5 µg/ml). Serviram como testemunhas o mesmo plasma e o glucagon (2 µg/ml) colocados separadamente. Verifica-se na Tab. 10 que o glucagon adicionado ao plasma, tanto na concentração de 2 como de 5 µg/ml, acarreta um aumento da produção de CO<sub>2</sub>, sendo que neste último caso a diferença é estatisticamente significativa (P < 0,01).

TABELA 9

Concentração de epinefrina e nor-epinefrina no plasma de *Chrysemys d'orbigny* injetadas 6 horas antes com glucagon (100 µg/kg) por via subcutânea.

Epinefrina (µg/100 ml)		Nor-epinefrina (µg/100 ml)	
Não injetadas	Injetadas	Não injetadas	Injetadas
0,76	0,75	0,00	0,00
1,05	0,92	0,15	0,00
0,90	0,47	0,00	0,00
0,60	0,58	0,00	0,00
—	0,82	—	—
0,83 ± 0,096	0,71 ± 0,081	0,04 ± 0,043	0,00 ± 0,000

TABELA 10

Produção de CO<sub>2</sub> pelo tecido adiposo de rato, em presença do plasma de *Chrysemys d'orbigny* não injetadas, acrescido de glucagon "in vitro".

µl CO <sub>2</sub> /g/h			
Plasma de Testemunha	Chrysemys não injetadas — 1 ml		Sòmente Glucagon (2 µg/ml)
	Acrescido de glucagon (2 µg/ml)	Acrescido de glucagon (5 µg/ml)	
456	564	745	542
436	337	689	311
404	531	739	406
452	572	731	358
306	452	547	320
260	317	530	277
386 ± 33,8	462 ± 46,10	664 ± 40,3	369 ± 36,3
		P < 0,01	

É provável, pois, que o aumento inicial da atividade insulínica do plasma de *Chrysemys* injetadas com glucagon seja provocado pela sua presença no plasma dos referidos animais. Experimentos futuros poderão esclarecer melhor estas observações.

Voltando a analisar o Gráf. 5, onde estão representadas as variações da atividade insulínica do plasma das *Chrysemys* quando injetadas com glucagon, verifica-se que há dois pontos máximos na curva. As provas experimentais até aqui desenvolvidas e acima descritas indicam que aquêles pontos correspondem a causas distintas. O primeiro aumento, notado às 6 horas, não se deve à insulina, nem à hiperglicemia e nem à adrenalina. Possivelmente se trata do efeito do glucagon injetado previamente em *Chrysemys* ou talvez seja proveniente de algum outro fator desconhecido. O segundo aumento (48 horas), no entretanto, parece ser provocado por um acréscimo de insulina no plasma, uma vez que êste efeito desapareceu pela incubação prévia com cistína. Desta forma, estaria confirmada em *Chrysemys*, a hipótese de que a hiperglicemia produzida pelo glucagon estimula a secreção de insulina (Foà, 1964).

De todos os resultados obtidos no presente trabalho destaca-se a diferença de ação do glucagon sobre o metabolismo glicídico de *Chrysemys d'orbignyi* em função da época do ano.

O efeito hiperglicêmico é maior e mais prolongado durante o inverno. Esta acentuada hiperglicemia se explica, por certo, pela maior reserva de glicogênio hepático verificada nessa época. Contudo, êste fato por si só parece ser insuficiente para justificar a maior duração daquêle efeito, principalmente considerando-se que a diferença entre os níveis glicêmicos máximos (inverno e verão) é de apenas 37 mg% e que o retôrno aos valcres iniciais se faz em 48 horas no verão e requer mais de 18 dias no inverno.

A curva de tolerância à glicose em *Chrysemys* também é mais prolongada no inverno (Lopes et al., 1954) e, da mesma forma, a administração de glicose em tratamento prolongado

provoca hiperglicemia muito mais intensa nesta época (Riet Corrêa, Marques e Wagner, 1960).

Pareceria, pois, que a atividade do pâncreas da *Chrysemys* encontra-se reduzida no inverno, sendo êle incapaz de liberar a insulina necessária para restaurar a glicemia em curto prazo de tempo ou que, ao contrário, os tecidos periféricos não respondem ao aumento de insulina, não havendo portanto uma adequada utilização de glicose.

Contudo, o teor de insulina pancreática foi o mesmo tanto no inverno como no verão, e verificou-se uma redução em seu conteúdo em *Chrysemys* tratadas com glucagon durante o inverno, o que indica ter havido uma liberação de insulina superior à sua produção. Portanto, não seria unicamente a falta de insulina que retardaria a normalização da glicemia mas, provavelmente, a incapacidade das células em aumentar o consumo de glicose. É possível também que ambos os fatores concorram para prolongar aquêle efeito hiperglicêmico.

Segundo Tyberghhein (1961) a hiperglicemia produzida pelo glucagon varia com as reservas de glicogênio hepático apenas dentro de certos limites, e parece ser também dependente do estado funcional das glândulas endócrinas. Ora, estas observações podem ser aplicadas aos resultados obtidos em *Chrysemys*, considerando que êste animal deve apresentar modificações no sistema endócrino decorrentes da variação estacional. E, como ainda se conhece muito pouco desta influência sôbre a regulação hormonal do metabolismo nos Quelônios, um amplo campo de pesquisas nêste setor aguarda futuros experimentos.

\*

### *Agradecimentos* —

Desejo manifestar meu profundo reconhecimento ao Prof. Paulo Sawaya, pelas sugestões e constante apôio os quais foram de fundamental importância na elaboração desta tese.

Tendo realizado êste trabalho no Instituto de Fisiologia Experimental da Universidade do Rio Grande do Sul, cumpre-me expressar meus sinceros agradecimentos ao seu Diretor, Prof. Pery Riet Corrêa, por ter despertado o meu entusiasmo pela pesquisa científica e me proporcionado condições para desenvolvê-la. Apraz-me agradecer também nesta oportunidade aos Profs. Bernardo A. Houssay, Virgilio G. Foglia e Ricardo R. Rodriguez, pela valiosa orientação em minha iniciação científica.

Devo ainda estender os meus melhores agradecimentos ao Dr. Alcyr Kraemer, pela dedicada colaboração no planejamento dêste trabalho; ao Dr. Edgard M. Wagner, pela incansável ajuda e oportunas sugestões na redação do texto; ao Dr. Antonio Mies Filho, pelo auxílio na correção do mesmo; ao Dr. Celso P. Jaeger, por seu interêsse e proveitoso estímulo; à Sra. Maria Antonio H. Riet Corrêa, Srta. Ilza dos Santos e ao Sr. Pedro P. dos Santos, pelo eficiente auxílio na parte técnica; à Srta. Bárbara Kowalczyk, pela cuidadosa feitura dos gráficos; à Sra. Lavinia Fonseca, pelo exaustivo trabalho de datilografia; ao Sr. Ernandi Bornes, pelo transporte diário dos animais para o laboratório; enfim a tôdas as pessoas que, de uma forma ou de outra, facilitaram a minha tarefa.

Sou também grata à Dra. Ana Maria Biscardi, do Instituto de Biologia y Medicina Experimental de Buenos Aires, pelas determinações de epinefrina e nor-epinefrina no plasma de *Chrysemys*; aos Drs. Sergio Zucas, da Faculdade de Farmacia, e Maurício Rocha e Silva Junior, da Faculdade de Medicina, ambas da Universidade de São Paulo, pelo fornecimento de ratos; à Elli Lilly & Co. Indianopolis. Indiana, Estados Unidos, pelo suprimento de insulina e de glucagon, sendo êste último também obtido pela gentileza do Dr. Arthur W. Martin, da Universidade de Washington, Estados Unidos.

## 4.

## BIBLIOGRAFIA

- ABEL, J. J., GEILING, E. M. K., ROUILLER, C. A., BELL, F. K. e WINTERSTEINER, O. (1927) — Crystalline insulin. *J. Pharmacol. Experim. Ther.*, **31**: 65-72.
- ALDEHOFF, G. (1891) — Tritt bei Kalblumern nach Pankreas extirpation Diabetes melitus auf. *Z. Biol.*, **28**: 293-304.
- ANDERSON, E. e LONG, J. A. (1947) — The effect of hyperglycemia on insulin secretion as determined with the isolated rat pancreas in a perfusion apparatus. *Endocrinology*, **40**: 92-97.
- AUDY, G. e KERLY, M. (1952) — The Content of Glycogenolytic Factor in Pancreas from different Species. *Biochem. J.*, **52**: 77-78.
- BALL, E. G., MARTIN, D. B. e COOPER, O. (1959) — Studies on the Metabolism of Adipose Tissue. I. The effect of insulin on glucose utilization as measured by the manometric determination of carbon dioxide output. *J. Biol. Chem.*, **234**: 774-780.
- BAUM, J., SIMONS Jr., B. E., UNGER, R. H. e MADISON, L. L. (1962) — Localization of Glucagon in the Alpha Cells in the Pancreatic Islet by Immunofluorescent Technics. *Diabetes*, **11**: 371-374.
- BEEKMAN, B. E. (1957) — The effect of crystalline glucagon on the blood sugar of the fowl. *Proc. Indiana Acad. Sci.*, **66**: 341. Citado por FOA, P. P. e GIANINO, G. (1962) — Glucagon: Chemistry and Function Health and Disease. Springfield, Charles Thomas, p. 47.
- BEHRENS, O. K., STAUB, A., ROOT, M. A. e BROMER, W. W. (1956) — Chemical and biological characteristics of glucagon. *Ciba Foundation Colloq. Endocrinol.*, **9**: 167-174.
- BERN, H. A. e NANDI, J. (1964) — Endocrinology of Poikilothermic Vertebrates. VI. Pancreatic Islets and Carbohydrate Metabolism. In Pincus, G., Thimann, K. V. e Astwood, E. B. — *The Hormones*. Vol. IV. N. Y. London. Academic Press p 235-239.
- BERTHET, J. (1963) — Pancreatic Hormones: Glucagon. In von Euler, V. S. e Heller, H. — *Comparative Endocrinology*. I. Glandular Hormones. XIII+543pp. N.Y. London. Academic Press, p. 410-427.
- BERTHET, J., SUTHERLAND, E. W. e RALL, T. W. (1957) — The assay of glucagon and epinephrine with use of liver homogenates. *J. Biol. Chem.*, **229**: 351-361.
- BONDY, P. K. e CARDILLO, L. R. (1956) — The effect of glucagon on carbohydrate metabolism in normal human beings. *J. Clin. Invest.*, **35**: 494-501.
- BOUCKAERT, J. P. e DE DUVE, C. (1947) — The action of insulin *Physiol. Rev.*, **27**: 39-71.

- BROMER, W. W., SINN, L. G., STAUB, A. e BEHRENS, O. K. (1957) — The Amino Acid Sequence of Glucagon. *Diabetes*, **6**: 234-238.
- BROWN JR., E.M., DOHAN, F.C., FREEDMAN, L.R., DE MOOR, P. e LUKENS, F.D.W. (1952) — The effects of prolonged infusion of the dog's pancreas with glucose. *Endocrinology*, **50**: 644-656.
- BÜRGER, M. e KRAMER, H. (1928) — "Über den hepatischen Angriffspunkt des Insulins. Die primäre paradoxe Insulinhyperglykämie. *Zeit. ges. exp. Med.*, **65**: 487. Citado por Foà, P.P. e Galansino, G. (1962) — *Glucagon: Chemistry and Function in Health and Disease*, Springfield, Charles Thomas. p. 47.
- BUTTURINI, U., MANCINI, A.M. e BARONCHELLI, A. (1956) — Azioni specifiche ed aspecifiche degli ormoni insulo-attivi sull'istomorfogenesi del pancreas insulare. *Folia Endocrinol.*, **9**: 145-164.
- CAHILL JR., G. F., IEBOEUF, B. e FLINN, R. B. (1960) — Studies on Rat Adipose Tissue "in Vitro". VI. Effect of epinephrine on glucose metabolism. *J. Biol. Chem.*, **235**: 1246-1250.
- CARDEZA, A. F. (1957 a) — Histologia de los islotes de Langerhans en la tortuga diabetica por pancreatectomia parcial. *Rev. Soc. Argent. Biol.*, **33**: 67-73.
- CARDEZA, A. F. (1957 b) — Histologia de los islotes de Langerhans en la tortuga diabetica por aloxano y por accion de la glucosa. *Rev. Soc. Argent. Biol.*, **33**: 74-79.
- CARDEZA, A. F. (1960) — Modificaciones de los islotes de Langerhans de la serpiente *Xenodon merremii* tratada con glucagon. *Rev. Soc. Argentina Biol.*, **36**: 258-263.
- CAVALIERO, C. (1953) — Études sur le facteur hyperglycémiant du pancréas (Glucagon). *Rev. Canad. Biol.*, **12**: 509-529.
- COHEN, G. e GOLDENBERG, M. (1957) — The simultaneous fluorimetric determination of adrenaline and noradrenaline in plasma. I. The fluorescence characteristics of adrenolutine and noradrenolutine and their simultaneous determination in mixtures. *J. Neurochem.*, **2**: 58-70.
- COLLENS, W. S. e MURLIN, J. R. (1929) — Hyperglycemia Following the Portal Injection of Insulin. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **26**: 485-490.
- CONCEIÇÃO, J. M. (1959) — Ação da Carbutamida ou Bz-55 sobre a Glicogenólise hepática. Tese de Doutorado. Pôrto Alegre, Globo, 44p.
- COSTA, E., GALANSINO, G. e FOA, P. P. (1956) — Glycogen Stores in Glucagon-Treated Rats. I. Time Factors. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **91**: 308-312.
- COULSON, R. A., HERNANDEZ, T. (1953) — Glucose studies in Crocodilia. *Endocrinology*, **53**: 311-320.

- COULSON, R. A. e HERNANDEZ, T. (1964) — Biochemistry of the alligator. A study of metabolism in slow motion. XIX+138pp. Baton Rouge. Louisiana State University Press, p. VII e p. 29.
- COULSON, R. A., HERNANDEZ, T. e BRAZDA, F. G. (1950) — Biochemical Studies on the Alligator. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **73**: 203-206.
- CORNBLATH, M., MORGAN, H. E. e RANDLE, P. J. (1961) — Glycogenolysis and phosphorylase activation by glucagon and anoxia in the perfused rat heart. Fed. Proc., **20**: 85.
- DARLINGTON, P. J. (1957) — Zoogeography. XI+675pp. John Willey & Sons, Inc. New York. p. 208.
- DE DUVE, C. (1953) — Glucagon, the hyperglycemic glycogenolytic factor of pancreas. Lancet, **2**: 99.
- DESSAUER, H. C. (1952) — Biochemical Studies on the Lizard, *Anolis carolinensis*. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **80**: 742-744.
- DESSAUER, H. C. (1953) — Hibernation of the Lizard, *Anolis carolinensis*. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **82**: 351-353.
- DI MAGGIO, A. (1961) — Effects of glucagon and insulin on carbohydrate metabolism in a Lizard. Fed. Proc., **20**: 175.
- DRURY, D. R., WICK, A. N. e SHERRIL, J. W. (1954) — The effect of the Hyperglycemic Factor on the Metabolism of Glucose by the Extrahepatic Tissues. Diabetes, **3**: 129-132.
- ELLIS, S., ANDERSON JR., H. L. e TURTLE, M. A. (1952) — A Study of the mechanism of action of epinephrine on liver slice. J. Pharmacol. Exp. Ther., **106**: 383-389.
- ELRICK, H., RACHIELE, F. J. e HLAD Jr., C. J. (1958) — Effects of Prolonged Glucagon Administration in the Cat and Dog. Diabetes, **7**: 129-132.
- ENGEL, F. L. e SCOTT JR., L. L. (1950) — The role of hormones in adipose glycogen synthesis in the rat. Insulin and the hyperglycemic factor of the pancreas. Endocrinology, **46**: 574-581.
- EULER, U. S. v. e LISHAJKO, F. (1959) — The Estimation of Catechol Amines in Urine. Acta Physiol. Scand., **45**: 122-132.
- FALKMER, S. (1961) — Experimental diabetes research in fish. Acta Endocrinol., **59** (supl.): 1-122.
- FINDER, A. G. e SHOEMAKER, W. C. (1962) — In vivo activation of liver phosphorylase by glucagon. Fed. Proc., **21**: 200.
- FISHER, A. M. e SCOTT, D. A. (1934) — The insulin content of the pancreas in cattle of various age. J. Biol. Chem., **106**: 305-312.
- FISHER, R. A. e YATES, F. (1954) — Tablas Estadísticas para investigadores científicos, económicos, demográficos y especialmente Biólogos, Agrónomos y Médicos. Madrid. Aguilar S.A. de Ediciones, p. 50.
- FOA, P. P. (1956) — The control of the secretory activity of the islets of Langerhans. Ciba Foundation Colloq. on Endocrinol., **9**: 55-71.

- FOA, P. P. (1964) — Glucagon, em Pincus G., Thiman, K. V. & Astwood, E. B. — *The Hormones*, 4: 531-556. Academic Press, New York.
- FOA, P. P. e GALANSINO, G. (1962) — Glucagon: Chemistry and Function in Health and Disease. Springfield, Charles Thomas, p.79.
- FOA, P. P., GALANSINO, G. e POZZA, G. (1957) — Glucagon, a Second Pancreatic Hormone. *Recent Progress Hormone Res.*, 13: 473-510.
- FOA, P. P., SANTAMARIA, L., BERGER, S., SMITH, J. A. e WEINSTEIN, H. R. (1952a) — Effects of the Hyperglycemic-Glycogenolytic Factor (HGF), Epinephrine and Insulin in Normal and Depancreatized Dogs. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 80: 635-639.
- FOA, P. P., SANTAMARIA, L., WEINSTEIN, H. R., BERGER, S. e SMITH, J. A. (1952b) — Secretion of the Hyperglycemic-Glycogenolytic Factor in Normal Dogs. *Amer. J. Physiol.*, 171: 32-36.
- FOA, P. P., WEINSTEIN, H. R., SMITH, J. A. (1949) — Secretion of insulin and of a hyperglycemic substance studied by means of pancreatic-femoral cross-circulation experiments. *Amer. J. Physiol.*, 157: 197-204.
- FOGLIA, V. G., WAGNER, E. M., BARROS, M. e MARQUES, M. (1955) — La diabetes por pancreatectomia en la tortuga normal y hipofisopriva. *Rev. Soc. Argent. Biol.*, 31: 87-95.
- GARCIA RAMOS, J. (1944) — Contribución al conocimiento de la farmacología de la aloxana. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*, 5: 25. Citado por Houssay, B. A. (1959). *Comparative Physiology of the Pancreas*. In Gorbman, A. — *Comparative Endocrinology*. New York, Wiley. p. 646.
- GALANSINO, G., WEINSTEIN, H. R., MAGILL, A. M., FOA, P. P. (1955) — Rats Chronically Treated With Glucagon. *Amer. J. Physiol.*, 180: 27-30.
- GIBBS, C. B. F., ROOT Jr., E. W., MURLIN, J. R. (1923) — The gluco-genic substance in extracts of pancreas and other tissues. *Quart. J. Exp. Physiol.*, 13 (supl.): 128. Citado por FOA, P. P. e GALANSINO, G. (1962) — *Glucagon: Chemistry and Function in Health and Disease*. Springfield, Charles Thomas, p. 19.
- GOELDI, E. A. (1906) — Chelonios do Brazil (Jabotys, Kágados, Tartarugas). Em *Boletim do Museu Goeldi (Museu Paraense) Tomo IV*. p.699-756.
- GORBMAN, A. e BERN, H. A. (1962) — Internal secretion of the pancreas: insulin and glucagon. In *A Textbook of Comparative Endocrinology*. New York. London. Willey & Sons, Inc. p. 203-229.
- GRODSKY, G. M., BENNETT, L., BATTIS, A., McWILLIAMS, N. e VOELLA, C. (1962) — Insulin secretion from isolated perfused pancreas. *Fed. Proc.*, 21: 202.
- HAGEN, J. H. (1961) — Effect of Glucagon on the Metabolism of Adipose Tissue. *J. Biol. Chem.*, 236: 1023-1027.

- HAIST, R. E. (1944) — Factors affecting the insulin content of the pancreas. *Physiol. Rev.*, **24**: 409-444.
- HAZELWOOD, R. L. e LORENZ, F. W. (1957) — Responses of the domestic fowl to hyper and hypoglycemic agents. *Endocrinology*, **61**: 520-527.
- HELLERSTRÖM, C. e HELLMAN, B. (1962) — Reactions of the two types of A cells in the islets of Langerhans after administration of glucagon. *Acta Endocrinol.*, **41**: 116-122.
- HERNANDEZ, T. e COULSON, R. A. (1951) — Biochemical Studies on the Iguana. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **76**: 175-177.
- HERNANDEZ, T. e COULSON, R. A. (1952) — Hibernation in the Alligator. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **79**: 145-149.
- HOUSSAY, B. A. (1959) — Comparative Physiology of the Endocrine Pancreas. In Gorbman, A. — *Comparative Endocrinology*. New York, Willey. p. 639-667.
- HOUSSAY, B. A. e BIASOTTI, A. (1933) — Hipófisis y diabetes pancreática en los batracios y los reptiles. *Rev. Soc. Argent. Biol.*, **9**: 29-33.
- HOUSSAY, B. A. e DEULOFEU, V. (1939) — Ergbn Vitamin-u. *Hormonforsch.*, **2**: 297. Citado por Foà, P. P. (1956) — The control of the secretion activity of the islet of Langerhans. *Ciba Foundation Colloq. on Endocrinol.*, **9**: 55, p. 57.
- HOUSSAY, B. A., SORDELI, A. e MAZZOCO, P. (1923) — Acción de la insulina sobre diversas espécies animales. *Rev. Assoc. Med. Argent.*, **36**: 430-454.
- HOUSSAY, B. A. e PENHOS, J. C. (1960) — Pancreatic diabetes and hypophysectomy in the snake *Xenodon merremii*. *Acta Endocrinol.*, **35**: 313-323.
- HUBBLE, D. (1955) — The Action of Glucagon on the Blood Sugar in Normal and Diabetic Persons. *Diabetes*, **4**: 197-202.
- INGLE, D. J. NEZAMIS, J. E. e HUMPHREY, L. M. (1953) — Absence of Hyperglycemic Effect of Glucagon in the Eviscerate Rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **84**: 232-233.
- KAZAL, L. A., WOLFF, E. K., SPICER, D. S. e BARNES, R. H. (1950) — Hyperglycemic Properties of Grude Pancreatic Proteina. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **74**: 8-11.
- KIMBALL, C. P. e MURLIN, J. R. (1923) — Aqueous extracts of pancreas. III. Some precipitation reactions of insulin. *J. Biol. Chem.*, **58**: 337-346.
- KIRTLEY, W. R., WAIFE, S. O. e PECK, F. B. (1953) — Effect of Glucagon in Stable and Unstable Diabetic Patients. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **83**: 387-389.
- KORP, W. e LECOMPTE, P. M. (1955) — The Nature and Function of the Alpha Cells of the Pancreas. *Diabetes*, **4**: 347-366.

- KRAEMER, A. e MARQUES, M. — Teor em insulina do pâncreas de **Chrysemy d'orbignyi**. Dados não publicados.
- KREBS e HENSELEIT (1932) — *Z. Physiol. Chem.*, **210**: 33. Citado por Dixon, M. (1952) — *Manometric Methods*. Cambridge, University Press, p. 84.
- LAZARUS, S.S. e VOLK, B.W. (1958) — The effect of protacted glucagon administration on blood glucose and on pancreatic morphology. *Endocrinology*, **63**: 359-371.
- LEE, H. M., ELLIS, R. M. e BROMER, W. W. (1960) — Insulin-Like Activity of Chrystalline Glucagon as Measured with Rat Epididymal Fat Pad Preparation. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **104**: 4-6.
- LETTI, N. (1958) — Ação da hipófise. pâncreas e fígado sôbre a glicemia e glicogênio da Tartaruga "**Phrynops hilarii**" sob a influência de injeção contínua de glicose. Tése de Doutorado. Pôrto Alegre, Gráfica da Universidade, 55p.
- LLUCH TRULL, M. e PLANAS MESTRES, J. (1956) — Presencia de glucagón en los extractos insulínicos del albacora **Germo alalunga**, *Gml. Rev. Esp. Fisiol.*, **12**: 21-27.
- LOGOTHETOPOULOS, J., SHARMA, B. B., SALTER, J. M. e BEST, C. H. (1960) — Glucagon and Metagucagon Diabetes in Rabbits. *Diabetes*, **9**: 278-285.
- LOPES, N. (1955) — The action of alloxan in the turtle **Pseudemys d'orbignyi**, D and B. *Acta Physiol. Latino-amer.*, **5**: 39-45.
- LOPES, N., WAGNER, E. M., BARROS, M. e MARQUES, M. (1954) — Glucose, insulin and epinephrine tolerance tests in the normal and hypophysectomized turtle "**Pseudemys d'orbignyi**". *Acta Physiol. Latinoamer.*, **4**: 190-199.
- LÜDERWALDT, H. (1926) — Os chelonios brasileiros *Rev. Mus. Paul.*, **14**: 430-470, 11t. São Paulo. p.466.
- LYNN, W. S., MACLEOD, R. M. e BROWN, R. H. (1960) — Effects of Epinephrine, Insulin and Corticocotrophin on the Metabolism of Rat Adipose Tissue. *J. Biol. Chem.*, **235**: 1904-1911.
- MAKMAN, M. H., MAKMAN, R. S. e SUTHERLAND, E. W. (1960) — Glucagon in Plasma. In Antoniades, H.N. — *Hormones in Human Plasma*. Boston. Little, Brown and Co., p.119-137.
- MANN, F. C., BOLLMAN, J. L. e MAGATH, T. B. (1924) — The effects of insulin in some of the lower vertebrates. *Amer. J. Physiol.*, **68**: 115.
- MARQUES, M. (1955) — Efeitos da pancreatectomia parcial na tartaruga "**Phrynops hilarii**". *Rev. Brasil. Biol.*, **15**: 349-354.
- MARQUES, M. (1955 b) — Accion diabetogena de la somatotrofina en la tortuga **Phrynops hilarii**. *Rev. Soc. Argent. Biol.*, **31**: 177-183.
- MARQUES, M. e RIET CORRÉA, P. (1959) — Accion de la Orinassa sobre la glucemia de la tortuga "**Phrynops hilarii**". *Rev. Soc. Argent. Biol.*, **35**: 279-287.

- MARQUES, M., MAGALHÃES, E. e RIET CORRÊA, P. (1963) — Changes in Activity of Rat Epididymal Adipose Tissue "in vitro". Due to Time Elapsed since Last Feeding. *Experientia*, **19**: 149-150.
- MIALHE, P. (1958) — Glucagon, insuline et regulation endocrine de la glycemie chez le canard. *Acta Endocrinol.*, **36** (supl.): 1-34.
- MILLER, M. R. (1960) — Pancreatic Islet Histology and Carbohydrate Metabolism in Amphibians and Reptiles. *Diabetes*, **9**: 318-323.
- MILLER, M. R. (1961) — Carbohydrate Metabolism in Amphibians and Reptiles, In Martin, A.W. — *Comparative Physiology of Carbohydrate Metabolism in Heterothermic Animals*. Seattle, Univ. Washington Press. p. 125-147.
- MILLER, M. R. e ROBBINS, M. G. (1954) — The reproductive cycle in *Tarica torosa*. *J. Exp. Zool.*, **125**: 415-446.
- MILLER, M. R. e ROBBINS, M. G. (1955 a) — Cyclic changes in the thyroid and interrenal glands of the urodele amphibian, *Tarica torosa*. *Anat. Rec.*, **122**: 79-104.
- MILLER, M. R. e ROBBINS, M. G. (1955 b) — Cyclic changes in the pituitary gland of the urodele amphibian *Tarica torosa*. *Anat. Rec.*, **122**: 105-114.
- MILLER, M. R. e WURSTER, D. H. (1956) — Studies on the blood glucose and pancreatic islets of lizards. *Endocrinology*, **58**: 114-120.
- MILLER, M. R. e WURSTER, D. H. (1958) — Further studies on the blood glucose and pancreatic islets of lizards. *Endocrinology*, **63**: 191-200.
- MILLER, M. R. e WURSTER, D. H. (1959) — The Morphology and Physiology of the Pancreatic Islets in Urodele Amphibians and Lizards. In GORBMAN, (Ed.) — *Comparative Endocrinology*, John Wiley, New York, pp. 668-680.
- MILMAN, A. E., TREACY, A. M. e MILHORAT, A. T. (1954) — Pancreatic hyperglycemic factor on liver and muscle glycogen in vitamin E — deficient rabbits. *Fec. Proc.*, **13**: 100.
- MOHNIKE, G. (1955) — Glukagon und das Glycogenolytisches Pancreasnucleoteid. *Klin. Wschr.*, **33**: 132. Citado por Foà, P. P. e Galansino, G. (1962) — *Glucagon: Chemistry and Function in Health and Disease*. Springfield, Charles Thomas, p. 5.
- MONTGOMERY, R. (1957) — Determination of Glycogen. *Arch. Biochem. and Biophys.*, **67**: 378-386.
- MOSCA, L. (1959) — *Istofisiologia delle Isole Pancreatiche*. Fondazione D. Gaanssini, Milano, Italia. Citado por Foà, P. P. e Galansino, G. (1962) — *Glucagon: Chemistry and Function in Health and Disease*. Springfield, Charles Thomas, p. 20.
- MURLIN, J. R., CLOUGH, . D., GIBBS, C. B. F. e STOKES, A. M. (1923) — Aqueous extracts of the pancreas. I. Influence on the carbohy-

- drate metabolism of depancreatized animals. *J. Biol. Chem.*, **56**: 253-296.
- NISH, M. (1910) — Ueber Glycogenbildung in der Leber pankreasdiabetischer Schildkroete. *Arch. exp. Path. Pharmak.*, **62**: 170-179.
- NOBLE, E. C. e MACLEOD, J. J. R. (1923) — Does Insulin influence the glycogenic function of the perfused liver of the turtle. *J. Physiol.*, **58**: 33-40.
- OKUNO, G. (1960) — Studies on the Delayed Increase of Liver Glycogen by Glucagon. *Med. J. Osaka Univ.*, **10**: 483. Resumo em *Metabolism*, **9**: 968, (1960).
- PEARSON, D.P. (1955) — The metabolism of humming-birds. *First Book of Animals*. Simon and Schuster, New York. Citado por Miller, M.R. (1960) — Pancreatic Islet Histology and Carbohydrate Metabolism in Amphibians and Reptiles. *Diabetes*, **9**: 318, p. 320.
- PETERSSON, B. e HELLMAN, B. (1963) — Effects of long term administration of glucagon on the pancreatic islet tissue of rats and guinea-pigs. *Acta Endocrinol.*, **44**: 139-149.
- PINCUS, I. J. (1950) — A hyperglycemic factor extracted from the pancreas. *J. Clin. Endocrinol.*, **10**: 556-571.
- PINCUS, I. J., GRICE M. S., DUNN, M. e RUTMAN, J. Z. (1955) — Effect of Glucagon (HGF) on Deposition of Muscle Glycogen. *Amer. J. Physiol.*, **183**: 413-415.
- PINCUS, I. J. e RUTMAN, J. Z. (1958) — Glucagon, the hyperglycemic agent in pancreatic extracts. *Arch. Int. Med.*, **92**: 666. Citado por Foà, P.P. e Galansino, G. (1962) — Glucagon: Chemistry and Function in Health and Disease. Springfield, Charles Thomas, p. 47.
- PRADO, J. L. (1946) — A glicemia normal nos ofidios. *Mem. Inst. Butantan*, **19**: 59-68.
- PRADO, J. L. e PRADO, E. S. (1946) — Teor em insulina do pâncreas da "*Bothrops jararaca*". *Rev. Brasil. Biol.*, **6**: 133-137.
- RAJARAMA RAO, M. R. e DE, N. N. (1955) — The influence of hyperglycemic glycogenolytic factor (HGF) on glycogenolysis in skin. *Acta Endocrinol.*, **18**: 299-304.
- RANDLE, P. J. (1964) — Rate of Release of Insuline "in vitro". *Ciba Foundation Colloq. on Endocrinol.*, **15**: 107-113.
- R-CANDELA, J. L. e R-CANDELA, R. (1956) — Inhibitory effect of glucagon on the insulin glucose uptake of the isolated diaphragm of the rat. *Ciba Foundation Colloq. on Endocrinol.*, **9**: 194-198.
- RAPATZ, G. L. e MUSACCHIA, X. J. (1957) — Metabolism of *Chrysemys picta* During Fasting and During Cold Torpor. *Amer. J. Physiol.*, **188**: 456-460.
- RHANEY, M. C. (1948) — Some aspects of the carbohydrate metabolism of the kingsnake *Lampropeltus getulus floridane*. Ph. D. Dissertation. Univ. of Michigan. Citado por Miller, R. M. (1961) — Car-

- bohydrate Metabolism in Amphibian and Reptiles. In Martin, A. W. — Comparative Physiology of Carbohydrate Metabolism in Heterothermic Animals. Univ. Washington Press. Seattle, p. 138.
- RIET CORRÊA, P. e MAGALHAES, E. (1961) — Effect of Prior Epinephrine upon Adipose Tissue Sensitivity to Insulin in Vitro. *Metabolism*, **10**: 808-811.
- RIET CORRÊA, P., MARQUES, M. e WAGNER, E. M. (1960) — Hyperglycemia causes by the oral administration of glucose in turtles. *Endocrinology*, **66**: 731-734.
- RODRIGUEZ, R. R. e MARQUES, M. — Efeito da Triamicinolona sôbre a glicemia da tartaruga *Chrysemy d'orbigny*. No prelo.
- RODRIGUEZ, R. R., MARQUES, M., CONCEIÇÃO, J. M. e LETTI, N., (1956) — Action diabétogène des corticoïdes synthétiques. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **150**: 1281-1282.
- ROOT, M. A. (1954) — Effect of Chronic Administration of Glucagon to Rats and Rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **87**: 108-110.
- ROOT M. A. (1956) — Effect of Glucagon on Glycogen in Rats and Rabbits. *Endocrinology*, **59**: 340-346.
- SALTER, J. M. (1960) — Metabolic effects of glucagon in the Wistar rat. *Amer. J. Clin. Nutr.*, **8**: 535-536.
- SALTER, J. M., DAVIDSON, I. W. T., BEST, C. H. (1957) — The Pathologic Effects of Large Amounts of Glucagon. *Diabetes*, **6**: 248-252.
- SARCIONE, E. J., SOKAL, J. E. e GERSZI, K. E. (1960) — Relationship of the adrenal medulla to the hyperglucemic effect of glucagon. *Endocrinology*, **67**: 337-346.
- SCHILLING, J. (1957) — The glycogenolytic action of adrenaline and noradrenaline on the isolated liver of the tortoise. *Acta Physiol. Latinoamer.*, **7**: 205-211.
- SCIAN, L. F., WESTERMANN, C. D., VERDESCA, A. S. e HILTON, J. G. (1960) — Adrenocortical and medullary effects of glucagon. *Amer. J. Physiol.*, **199**: 867-870.
- SCOTT, D. A. (1934) — Crystalline insulin. *Biochem. J.*, **28**: 1592. Citado por Foà, P. P. e Galansino, G. (1962) — Glucagon: Chemistry and Function in Health and Disease. Springfield, Charles Thomas, p. 5.
- SELTZER, H. S. (1962) — Comparative Insulinogenic Potencies of Glucose and Sulfonylurea Compounds. *Diabetes*, **11**: (supl.): 11-12.
- SHOEMAKER, W. C. e VAN ITALLIE, T. B. (1960) — The hepatic response to glucagon in the unanesthetized dos. *Endocrinology*, **66**: 260-268.
- SMITH, C. L. (1954) — The relation between seasonal hyperglycemia and thyroid activity in the frog (*Rana temporaria*). *J. Endocrinol.*, **10**: 184-191.

- SNEDECOR, J. G., DeMEIO, R. H. e PINCUS, I. J. (1955) — Reduction by Glucagon of Glycogen Deposition Effect of Insulin in Rat Diaphragm. *Proc. Exp. Biol. & Med.*, **89**: 396-397.
- SOMOGYI, M. (1952) — Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, **195**: 19-23.
- STAUB, A. e BEHRENS, O. K. (1954) — The glucagon content of crystalline insulin preparations. *J. Clin. Invest.*, **33**: 1629-1633.
- STAUB, A., SINN, L. e BEHRENS, O. K. (1953) — Purification and Crystallization of Hyperglycemic-glycogenolytic factor (HGF). *Science*, **117**: 628-629.
- STAUB, A., SINN, L. e BEHRENS, O. K. (1955) — Purification and crystallization of glucagon. *J. Biol. Chem.*, **214**: 619-632.
- STEVENSON, O. R., COULSON, R. A. e HERNANDEZ, T. (1957) — Effects of Hormones on Carbohydrate Metabolism in the Alligator. *Amer. J. Physiol.*, **191**: 95-102.
- SUTHERLAND, E. W. e DE DUVE, C. (1948) — Origin and distribution of the hyperglycemic-glycogenolytic factor of the pancreas. *J. Biol. Chem.*, **175**: 663-674.
- SUTHERLAND, E. W. e RALL, T. W. (1958) — Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J. Biol. Chem.*, **232**: 1077-1091.
- SUTHERLAND, E. W. e RALL, T. W. (1960) — The relation of adenosine-3', 5' phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones. *Pharmacol. Rev.*, **12**: 265-299.
- TYBERGHEIN, J. (1952) — Action du facteur hyperglycémiant glycolytique sur le métabolisme des hydrates de carbone. *Arch. Internat. Physiol.*, **60**: 113-115.
- TYBERGHEIN, J. M. (1961) — The hyperglycemic action of glucagon as influenced by liver glycogen concentration, the pancreas, the adrenals and the pituitary in the baboon (*Papio ursinus*). *Endocrinology*, **69**: 312-318.
- TYBERGHEIN, J. M. e WILLIAMS, R. H. (1958) — Assay for Glucagon in Rabbit Plasma. *Metabolism*, **7**: 635-645.
- UNGER, R. H. e EISENTRAUT, A. M. (1964) — Studies of the Physiologic Role of Glucagon. *Diabetes*, **13**: 563-568.
- UNGER, R. H., EISENTRAUT, A. M., McCALL, M. S. e MADISON, L. L. (1961) — Glucagon antibodies and an immunoassay for glucagon. *J. Clin. Invest.*, **40**: 1280-1289.
- UNGER, R. H., EISENTRAUT, A. M., McCALL, M. S. e MADISON, L. L. (1962) — Measurements of endogenous glucagon in plasma and the influence of blood glucose concentration upon its secretion. *J. Clin. Invest.*, **41**: 682-689.
- VAN ITALLIE, T. B. e BENTLEY, W. B. A. (1955) — Glucagon-induced hyperglycemia as an index of liver function. *J. Clin. Invest.*, **34**: 1730-1737.

- VOLK, B.W. e LAZARUS, S.S. (1960) — Studies on the Diabetogenic Action and the Site of Origin of Glucagon. *Diabetes*, **9**: 53-62.
- VUYLSTEKE, C.A. e DE DUVE, C. (1953) — Le contenu en glucagon du pancréas aviaire. *Arch. Internat. Physiol.*, **61**: 273-274.
- VUYLSTEKE, C.A., DE DUVE, C. e NYS, A. (1950) — Étude sur le facteur H-G du pancréas. *Arch. Internat. Physiol.*, **57**: 445-446.
- WAGNER, E.M. (1955) — Effect of hypophysectomy in the turtle "*Chrysemys d'orbigny*". *Acta Physiol. Latinoamer.*, **5**: 219-228.
- WALLANCE-OWEN, J. e HURLOCK, B. (1954) — Estimation of plasma insulin by the rat Diaphragm Method. *Lancet*, I: 68-70.
- WEITZEL, G., BUDDECKE, E. e KRAFT, D. (1956) — Zinc un Glukagon im Pankreas der Ente. *Weit. Physiol. Chem.*, **305**: 132. Citado por Foà, P.P. e Galansino, G. (1962) — Glucagon: Chemistry and Function in Health and Disease. Springfield, Charles Thomas, p.19.
- WRENSHALL, G.A. (1951) — Studies on the Extratable Insulin of Human Pancreas. Tése. Toronto. 60p.
- WURSTER, D. H. e MILLER, M. R. (1960) — Studies on blood glucose and pancreatic islets of the Salamander, *Taricha tovoza*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **1**:101-109.
- YALOW, R. S. e BERSON, S.A. (1960) — Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.*, **39**: 1157-1175.