

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

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras
da Universidade de São Paulo pela
Licenciada

MARIA MARQUES

Departamento de Fisiologia Geral e Animal da Faculdade
de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade
de São Paulo

e

Instituto de Fisiologia Experimental da Universidade
do Rio Grande do Sul

SÃO PAULO

1965

À memória de meu Pai e de minha Avó

À minha Mãe

Aos meus irmãos

I N T R O D U Ç Ã O

A intensificação do estudo sôbre o glucagon nestes últimos anos conduziu a resultados que permitem admiti-lo como parte integrante do sistema regulador da glicemia. A maioria das informações sôbre 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 fisiològicamente muito mais importante nestas duas classes de vertebrados. Se essas diferenças de comportamento resultam de variações da sensibilidade dos tecidos a êste 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 sôbre o seu papel fisiològico (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 espé

cie "Chrysemys d'Orbigny" ** para objeto de estudo no presente trabalho.

Como adiante se verá, a temperatura influi sôbre 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 interêsse, seguindo as sugestões do Prof. Paulo Sawaya, estudar a ação d'êste hormônio sôbre o metabolismo glicídico de Chrysemys d'orbigny, que são os quelônios mais comumente encontrados 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 Chrysemys habitam as zonas tropicais e temperadas das Américas, sendo mais freqüentes porém, nas regiões tropicais de todo o continente americano - (Goeldi, 1906), 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 da adaptação que deva estar relacionado diretamente com o metabolismo dos hidratos de carbono.

* Sendo Chrysemys d'orbigny uma das espécies de Chelonia que ocorrem no Guaíba, rio das circunjangências de Pôrto 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'orbigny. Evitarei, assim, para não causar confusões, as indicações populares de "tartaruga", "jaboti" ou "tigrê d'água" (Lüderwaldt, 1926) pelas quais êstes animais são conhecidos no país.

O fato de Chrysemys d'orbigny 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 esse regime de adaptação. Propus-me assim experimentar os hormônios pancreáticos em Chrysemys d'orbigny, que podem viver em localidades cujas temperaturas oscilam durante o ano entre 3° e 39°C:

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

Depois de apresentar uma resenha da bibliografia sobre o glucagon e sobre 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 interpretada, 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 ma-

terial fisiologicamente ativo. Denominaram-na "glucagon", 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 interêsse sôbre 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 interêsse por êste fator e seu estudo foi iniciado em vários laboratórios (Bouckaert 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 1953, 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 pêsso 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 contem dois (metionina e triptofano) que não são encontrados na insulina. Este fato e outras características químicas eliminam a possibilidade de que o glucagon possa ser um produto de desdobraimento da

molécula de insulina.

7

Vários métodos biológicos têm sido propostos para o ensaio do glucagon extraído do pâncreas ou presente no plasma. São eles: 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) imunoensaio 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; Cardenza, 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) 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 mascaram os resultados obtidos por meio de técnicas biológicas. Recentemente, entretanto, Unger et al. (1962) e Unger e Eisentraut (1964), usando o método rádio-imunológico, 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 lipídios, 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 o 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; Wurster 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 diabete 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 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).

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 consequente 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 (R-Candela et al., 1956; Snedecor et al., 1955). 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_2 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, ele 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. Neste 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 sobre 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 sobre este 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 sobre 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 Lampropeltis getulus (Rhaney, 1948), Alligator mississippiensis (Coulson et al., 1950), Iguana iguana (Hernandez e Coulson, 1951) e Anolis carolinensis (Dessauer, 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 vêz 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 sobre 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, tireóide 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 estes resultados. Certamente, a temperatura tem influência sobre 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'orbignyi, provoca aumento da glicemia que atinge o máximo dentro de 9 horas, retornando aos 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 glicogénólise espontânea em Chrysemys d'orbignyi. Em outra espécie, Phrynops hilarii, Conceição (1959) encontrou inibição da glicogénólise adrenalínica por ação de sulfonamida hipoglicemiante.

A regulação hormonal do metabolismo glicídico nos Quelônios vem sendo estudada em alguns de seus apêndices, 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'orbignyi 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 Quêlônios 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'orbigny 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 glice-

mia 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 deveria à resposta destes 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 sobre o efeito da insulina, as poucas observações existentes sobre o efeito do glucagon indicam maior sensibilidade a este. Em Chrysemys d'orbignyi o glucagon (1 mg/kg) eleva a glicemia intensamente perdurando este efeito por 72 horas (Marques e Riet Corrêa, 1959). Com menor dose (10 ug/kg) Miller (1961) ainda obteve resposta hiperglicêmica em Chrysemys picta.

Até o presente, não há referência sobre extração e dosagem de glucagon em pâncreas de Quelônios, nem em outros répteis. O seu teor, no entretanto, já foi determinado em muitos mamíferos (Sutherland e De Duve, 1948; Kasal 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 Falk

mer, 1961).

O conteúdo em insulina pancreática foi determinado em Chrysemys, sendo encontrado em média 1,3 unidades de insulina por gramo de tecido (Kraemer e Marques, dados não publicados). Este 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 sobre o metabolismo dos hidratos de carbono em Quelônios foi evidenciada através de alguns experimentos. Foglia et al., (1955) demonstraram que em Chrysemys d'orbignyi e Phrynops hilarii, a hipofisectomia impede a hiperglicemia conseguinte 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 glicose (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 entanto, 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 Phrynos hylarii (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 Phrynos hylarii com pâncreas reduzido, observou

maior incidência e maior gravidade de diabetes nos machos.

Sabe-se que o sistema nervoso também influencia sobre o metabolismo dos glicídios, mas em Chrysemys não há referência à esta influência.

Como acima foi citado, o glucagon aumenta a glicemia por estimular a glicogenólise hepática, sendo este efeito proporcional às reservas de glicogênio daquele órgão. Por outro lado, sabe-se que o teor de glicogênio hepático de certos répteis 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'orbignyi 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'orbignyi.

Ainda, partindo da sugestão de Foà (1964), de que o glucagon em excesso provoca hiperglicemia, a qual

estimula a liberação de insulina, procurei constatar este aumento de secreção, determinando a atividade insulínica do plasma e o teor de insulina do pâncreas de Chrysemys tratadas com glucagon.

* * *

II

M A T E R I A L E M E T O D O S

Utilizaram-se Chrysemys d'orbignyi, fêmeas, todas 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 Porto 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 Porto Alegre durante a realização deste 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 deste experimento, desenvolvida durante o verão (fevereiro e março), constituiu-se de 3 grupos de animais: 1º) animais tratados, diariamente, com glucagon (100 µg/kg) em injeção sub-cutânea;

2º) outros, igualmente tratados com glucagon, mas com dose de 50 µg/kg; e 3º) 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, diariamente, uma alíquota, diluindo-a em solução fisiológica a fim de obter 100 e 50 µg de glucagon por ml, com o que se injetaram as Chrysemys, sempre pela manhã. O pH destas soluções permaneceu em torno 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 25º 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.

* The Lilly Research Laboratories, Eli Lilly Co. em lotes de nº 258-234 B-43 e 258-234 B-161-1.

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 este 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 tecnicamente 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 imediatamente 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 µg/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 in-

sulínica 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. Desproteinizase, 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 arsenotungstico (reativo de Nelson), e convenientemente diluído. A intensidade de coloração é medida no fotocolorímetro Klett-Summerson, com filtro de 540 μ (nº 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 sacarídeos. Face às proposições experimentais do presente trabalho, o emprêgo 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 cêrca 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-Sumner-son, utilizando filtro de 490 μ (nº 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.

Os resultados foram expressos em gramos de glicogênio por 100 g de tecido (g%).

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°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-as em

solução álcool-ácido- H_2O (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 acordo com a tabela de extração. Depois de passar a noite no refrigerador à $4^{\circ}C$, 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, H_2O destilada q.s.p. a 1.000 ml. Esta solução, conservada em refrigerador ($4^{\circ}C$) é 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 pesos entre 18 e 22 ou 22 e 26 g, estando eles 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 $37^{\circ}C$.

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 solu-

ções utilizou-se insulina cristalizada Lilly. Os de ais 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 convulsões 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 esse número de ensaios para cada amostra. A média dos valores obtidos é multiplicada pelo volume a que foi levado o extrato sendo este produto dividido pelo volume da alíquota tomada para obtenção do precipitado. Tal quociente é finalmente multiplicado pelo volume da dilução do precipitado. Este 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 CO₂ pela gordura do epididímo de rato, "in vitro".

Os ratos Wistar utilizados pesaram entre 120 e 150 g. Depois de um jejum de 5 horas, conforme indi

cação 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-bicarbonatado (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 Chrysemys não injetada; no segundo, plasma de Chrysemys injetada previamente com glucagon (3 horas antes); no terceiro, plasma de outra Chrysemys também injetada 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 O₂ e 5% de CO₂ 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_2 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 μl de CO_2 produzido durante a incubação com o plasma, o qual dividido pelo peso do tecido em gramas e pelo tempo de incubação em horas, exprime a quantidade de CO_2 produzida por gramo e por hora (μl de $\text{CO}_2/\text{g/h}$).

Determinou-se, também, a produção de CO_2 em resposta a quantidades conhecidas de insulina. Usou-se para isto insulina cristalizada Lilly, dissolvida em solução apropriada (pag. 28). 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 $\mu\text{U/ml}$.

Em experimento complementar, incubou-se plasma de Chrysemys com cisteína (0,02 M), à 37°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 apresen

te grande sensibilidade a este hormônio. Outras substâncias também têm ação sobre o metabolismo da gordura, podendo provocar aumento na produção de CO_2 . Por esta razão, os resultados obtidos por este 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 aquele efeito.

Considerando-se o inconveniente da não especificidade deste 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 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 $\text{mg}/100 \text{ ml}$ de glicose.

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 copo de Beaker ao qual se acrescenta igual volume de acetato de sódio

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

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 0,25 N.

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, completa-se 8 ml com água destilada. Oxidam-se as amostras, pela adição de 10 a 20 mg de dióxido de manganês, formando-se adrenocrômo e nor-adrenocrômo. 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. A 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 nº 5860 para a fluorescência. A segunda série (B) é uma combinação primária de Farrand nº 3389 e Corning

nº 5113, e uma secundária Farrand nº 3486.

Normaliza-se o fluorômetro na graduação 100 da escala do galvanômetro com uma amostra de 0,5 µg/ml de epinefrina* para cada série de filtros, utilizando diafragma nº 4. Preparam-se também uma amostra de 0,5 µg/ml de nor-epinefrina** e um branco de reativos.

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

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

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".

* Monohidrato bitartrato de L-epinefrina

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

B - Idem para a amostra usando a série de filtros
"B".

Os resultados foram expressos em μg de epinefrina
ou nor-epinefrina por 100 ml de plasma.

* * *

III

R E S U L T A D O S E D I S C U S S Ã O

A - Experimento prolongado

A injeção diária do glucagon em Chrysemys durante 30 dias produziu alterações da glicemia, do glicogênio hepático, da atividade insulínica do plasma e do teor de insulina pancreática.

1. Efeitos sôbre 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 ($P < 0,001$). (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 tem 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

gon, durante o inverno, acarretou marcada elevação da glicemia já a partir do 10º 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 µg/kg/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 10º 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.

TABELA 1

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

Esta- ção do ano	Grupo nº	Trata- mento	Dose diária (µg/kg)	Nº de animais	Glicemia (mg/100ml)			
					D I A S			
					0	10	20	30
V E R Ã O	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**<0,02 1-3	P< 0,001 1-3
								P< 0,001 2-3
I N V E R N O	4	Glucagon	100	14	86± 5,0	275± 18,4	197± 10,7	158± 5,9
	5	Solução fisiol.	-	10	90± 11,0	47± 4,0	56± 7,9	67± 11,4
						P<0,001 4-5	P<0,001 4-5	P<0,001 4-5
						P<0,001 1-4		

*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.

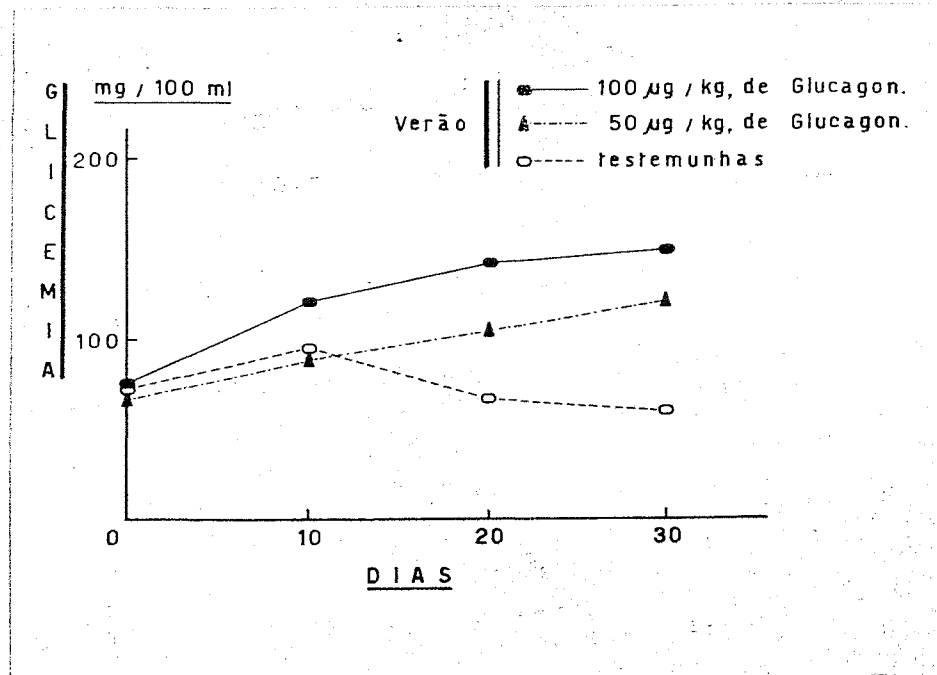


Gráfico 1 - Variações da glicemia de *Chrysemys* injetadas com diferentes doses de glucagon por via subcutânea durante 30 dias. Testemunhas tratadas com solução fisiológica.

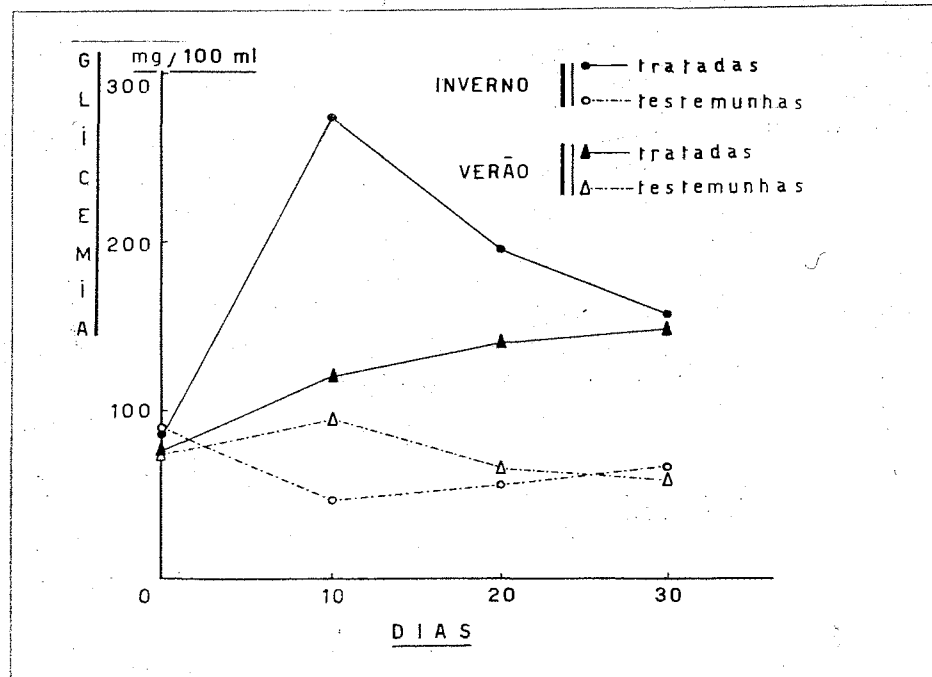


Gráfico 2 - Variações da glicemia de *Chrysemys* injetadas com 100 µg/kg/dia de glucagon durante 30 dias no inverno e no verão. Testemunhas tratadas com solução fisiológica.

Ratos tratados durante 6 meses com 1 mg de glucagon não a presentaram 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.

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 este 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,

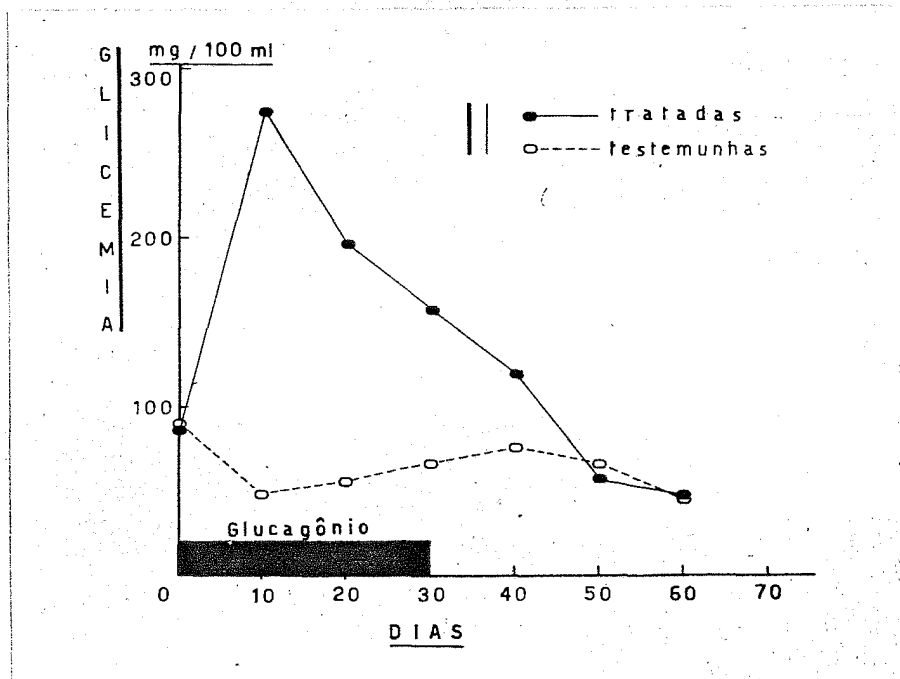


Gráfico 3 - Normalização da glicemia de Chrysemys após a interrupção do tratamento com glucagon (100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$). Testemunhas tratadas com solução fisiológica.

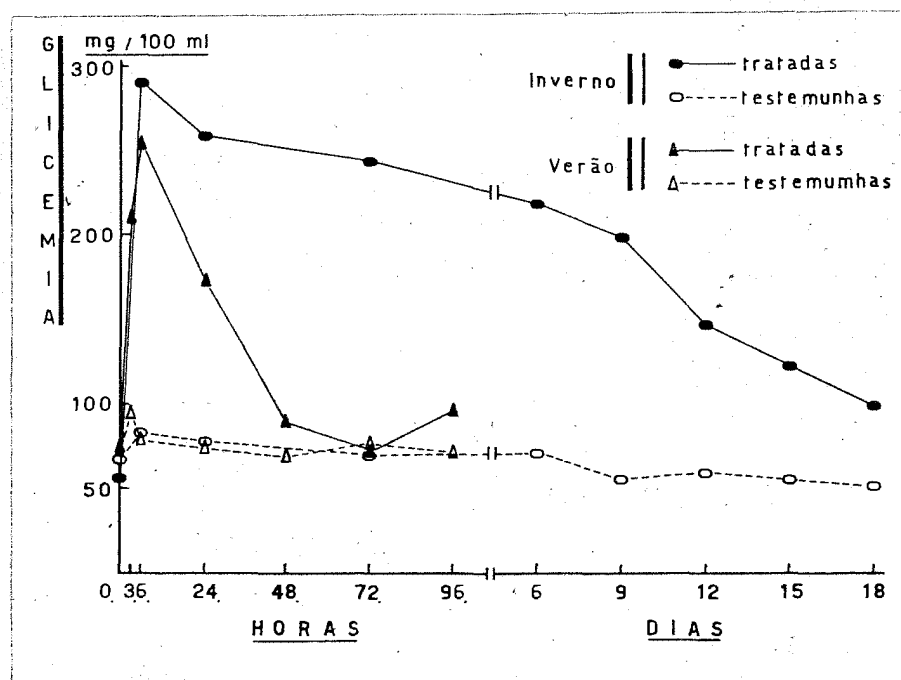


Gráfico 4 - Variações da glicemia de Chrysemys injetadas com glucagon (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) por via sub-cutânea, uma única vez, durante o inverno e o verão. Testemunhas tratadas com solução fisiológica.

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 deste animal ser muito sensível à ação deste hormônio, a hiperglicemia não foi permanente.

2. Efeitos sobre 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 estes 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 Des-sauer (1953) em Anolis carolinensis.

Por outro lado, a redução do glicogênio hepático em Chrysemys injetadas com glucagon discorda dos resultados de outros autôres. Galansino et al.(1955) encontraram níveis normais de glicogênio hepático em ratos tratados com glucagon e, Root (1954) 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 estes autôres que este 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 esse 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 ani

TABELA 2

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

Esta- ção do ano	Grupo nº	Trata- mento	Dose diária (µg/kg)	Nº de animais	G L I C O G Ê N I O	
					hepático (g%)	muscular (g%)
V E R Ã O	1	Glucagon	100	6	2,62 ± 0,339	0,62 ± 0,049
	2	Glucagon	50	6	3,40 ± 0,482	0,64 ± 0,064
	3	Solução fisiol.	-	6	4,88 ± 0,428	0,72 ± 0,169
					$P_{1-3} < 0,01$	
					$P_{2-3} < 0,05$	
I V E R N O	4	Glucagon	100	6	3,02 ± 0,161	3,43 ± 0,853
	5	Solução fisiol.	-	6	8,44 ± 0,757	2,61 ± 0,438
	6*	Glucagon	100	4	6,40 ± 0,548	1,65 ± 0,150
	7*	Solução fisiol.	-	5	7,42 ± 0,674	2,08 ± 0,350
					$P_{4-5} < 0,001$	
					$P_{3-5} < 0,01$	$P_{3-5} < 0,01$
					$P_{3-7} < 0,01$	

* Sacrificados 30 dias após a interrupção do tratamento.

mais tratados com glucagon. Porém, para estes autores, o pequeno aumento não parece ser um efeito direto e específico do glucagon mas um resultado da secreção de insulina.

3. Efeitos sôbre a atividade insulínica do plasma

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

Os dados aquí referidos não são suficientes para indicar a causa dêste aumento da atividade insulínica do plasma, isto é, se se deve à uma ação direta do glucagon sôbre 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 sôbre 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 corporal, 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

TABELA 3

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

Estação do ano	Grupo n ^o	Tratamento	Dose diária (µg/kg)	N ^o de animais	I N S U L I N A *		Relação pâncreas/peso corporal (g/kg)
					por pâncreas (U/g)	por peso corporal (U/kg)	
V E R Ã O	1	Glucagon	100	6	1,739 ± 0,013	2,507 ± 0,262	1,479 ± 0,096
	2	Glucagon	50	6	1,723 ± 0,162	2,637 ± 0,283	1,506 ± 0,107
	3	Solução fisiol.	-	6	1,321 ± 0,316	1,832 ± 0,313	1,393 ± 0,123
I N V E R N O	4	Glucagon	100	6	0,870 ± 0,099	1,308 ± 0,127	1,540 ± 0,112
	5	Solução fisiol.	-	6	1,303 ± 0,118	1,753 ± 0,204	1,345 ± 0,079
					$P_{4-5} < 0,02$		
					$P_{1-4} < 0,001$	$P_{1-4} < 0,01$	

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

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 de terminado 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 convulsão em camundongos. É possível, entretanto, que haja diferenças estruturais entre ambas, como sabe-se existir entre insulinas provenientes de diferentes espécies 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 µg/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 subseqüentes 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 glicemia mais alta ocorreu após 6 horas do tratamento (290mg%), 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 experiências nas distintas épocas do ano, não tendo observado aquela influência. Apenas DiMaggio (1961) demonstrou em Anolis carolinensis, que a hiperglicemia provocada por

TABELA 4

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

		Glicemias (mg/100 ml)			
Nº de animais	V E R Ã O		I N V E R N O		
	8	8	6	6	
Tratamento	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.

5.000 µg/kg de glucagon é maior 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 Wurster (1958) observaram aumento da glicemia em Eumeces obsoletus após 2 horas da administração do glucagon. Houssay 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 esse 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 CO₂

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_2 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 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 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 injetadas com glucagon. Há aumento daquela atividade após 6 e 48 horas da sua administração.

Como o método do tecido adiposo "in vi

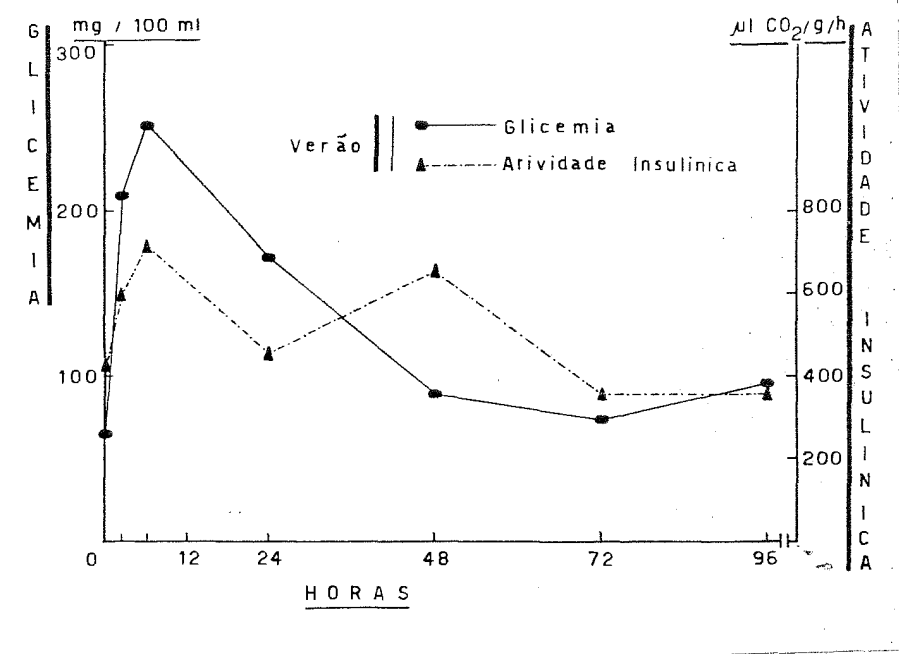


Gráfico 5 - Variações da glicemia e da atividade insulínica do plasma de *Chrysemys* injetadas com glucagon (100 µg/kg) por via sub-cutânea durante o verão.

tro" 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_2 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_2 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_2 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).

TABELA 5

Avaliação da atividade insulínica do plasma de Chrysemys d'orbignyi em μl de CO_2 produzido pelo tecido adiposo de rato, "in vitro".

Meio de incubação com tecido adiposo acrescido de:	Conc. final por ml	Nº de determinações	$\mu\text{l CO}_2/\text{g/h}$	Aumento em relação a testemunha	P entre os grupos
1 - (Testemunha)		10	$275 \pm 19,7$		
2 - Insulina	10 μU	8	$488 \pm 40,2$	77%	$P_{1-2} < 0,001$
3 - Insulina	100 μU	8	$775 \pm 42,1$	177%	$P_{1-3} < 0,001$
4 - Plasma de <u>Chrysemys</u> injetadas com solução fisiológica	0,5 ml	10	$427 \pm 23,0$	55%	$P_{1-4} < 0,001$
5 - Plasma de <u>Chrysemys</u> injetadas com glucagon durante 25 dias	0,5 ml	6	$621 \pm 79,8$	125%	$P_{4-5} < 0,05$

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 a maior concentração da glicose no plasma seria a causa daquele aumento. Como a glicemia média das Chrysemys às 6 horas fôra de cêrca de 250 mg/100 ml, acrescentou-se glicose ao plasma de animal não injetado, levando-se em conta a glicemia dêste, de modo a que o teor de glicose final alcançasse 250 mg/100ml. Os resultados apresentados na Tab.8, mostram que não houve modificação na produção de CO₂ 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., 1961) 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 CO₂ em comparação com a produzida pelo plasma ou por epinefrina separadamente. Observa-se na Tab.8 que a epinefrina em presença do plasma au

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 μl de CO_2 produzido pelo tecido adiposo de rato "in vitro".

Meio de incubação com tecido adiposo acrescido de 1 ml de:	Nº de determi-nações	Horas após injeção	$\mu\text{l CO}_2/\text{g/h}$	Aumento em relação a testemunha	P entre os grupos
1 - Plasma de <u>Chrysemys</u> sem injetar (testemunha)	10	-	427 \pm 23,0		
2 - Plasma de <u>Chrysemys</u> injetadas com solução fisiológica	4	3	443 \pm 24,2	-	
3 - Idem	6	6	417 \pm 42,4	-	P < 0,02 3-5
4 - Plasma de <u>Chrysemys</u> injetadas com glucagon	6	3	596 \pm 79,1	28%	
5 - Idem	6	6	715 \pm 96,0	40%	P < 0,02 1-5
6 - Idem	7	24	459 \pm 75,8	-	
7 - Idem	6	48	658 \pm 27,3	35%	P < 0,001 1-7
8 - Idem	7	72	354 \pm 34,2	-	
9 - Idem	6	96	359 \pm 42,9		

TABELA 7

Atividade insulínica de plasma incubado previamente com cisteína. Avaliação desta atividade em μl de CO_2 produzido pelo tecido adiposo do rato, "in vitro".

μl de $\text{CO}_2/\text{g}/\text{h}$			
Plasma de <i>Chrysemys</i> após 6 horas de administração de glucagon		Plasma de <i>Chrysemys</i> após 48 horas 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
$443 \pm 65,3$	$373 \pm 54,3$	$490 \pm 47,00$	$232 \pm 65,3$
		P < 0,01	

TABELA 8

Produção de CO_2 pelo tecido adiposo de rato em presença do plasma de *Chrysemys* não injetadas, acrescido de glicose ou de epinefrina "in vitro".

μl de $\text{CO}_2/\text{g}/\text{h}$			Epinefrina (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
Plasma de <i>Chrysemys</i> não injetadas - 1 ml			
Testemunha -	Acrescido de:		
	Glicose (250 mg/100 ml)	Epinefrina (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	
396	281	504	519
338	460	416	374
278	450	491	458
416	333	492	430
320	260	448	428
303	373	505	523
$342 \pm 21,9$	$359 \pm 34,2$	$476 \pm 14,7$	$455 \pm 23,5$
		P < 0,01	

mentou a produção de CO_2 ($P < 0,01$).

Admitindo-se a possibilidade de que o aumento da produção de CO_2 pela gordura "in vi ro" 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.

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 vês, segundo as observações de Lee et al. (1960) e de Hagen (1961) o glucagon parece ter ação sôbre o metabolismo da gordura "in vitro". Portanto, o aumento da produção de CO_2 pelo tecido adiposo, provocado pelo plasma dos animais tratados prèviamente 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_2 pela gordura incubada com plasma de Chrysemys não injetada; ao qual se acrescentou glucagon "in vitro" (2 ou 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Serviram como test munhas o mesmo plasma e o glucagon (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) colocados separadamente. Verifica-se na Tab.10 que o glucagon adicionado ao plasma, tanto na concentração de 2 como de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, acarreta um

TABELA 9

Concentração de epinefrina e norepinefrina no plasma de Chrysemys d'orbigny injetadas 6 horas antes com glucagon (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) por via sub-cutânea.

Epinefrina ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)		Norepinefrina ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	
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	-	-
$0,83 \pm 0,096$	$0,71 \pm 0,081$	$0,04 \pm 0,043$	$0,00 \pm 0,000$

TABELA 10

Produção de CO_2 pelo tecido adiposo de rato, em presença do plasma de Chrysemys d'orbigny não injetadas, acrescido de glucagon "in vitro".

$\mu\text{l CO}_2/\text{g/h}$			
Plasma de <u>Chrysemys</u> não injetadas - 1 ml			Glucagon (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
Testemunha	Acrescido de glucagon		
-	(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	
456	564	745	542
436	337	689	311
404	531	739	406
452	572	731	358
306	452	547	320
260	317	530	277
$386 \pm 33,8$	$462 \pm 46,10$	$664 \pm 40,3$	$369 \pm 36,3$
		$P < 0,01$	

aumento da produção de CO_2 , sendo que neste último caso a diferença é estatisticamente significativa ($P < 0,01$).

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 este efeito desapareceu pela incubação prévia com cisteína. 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'orbigny 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, este fato por si só parece ser insuficiente para justificar a maior duração daquele efeito, principalmente considerando-se que a diferença entre os níveis glicêmicos máximos (inverno e verão) é de apenas 37 mg% e que o retorno aos valores 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 ele 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 incapacida

de das células em aumentar o consumo de glicose. É possível também que ambos os fatores concorram para prolongar aquêlê efeito hiperglicêmico.

Segundo Tyberghein (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.

* * *

IV

RESUMO E CONCLUSÕES

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

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

O teor de glicogênio hepático e muscular de Chrysemys testemunhas 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 o 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 µl de CO₂ produzido pelo tecido adiposo de rato, "in vitro", é menor do que

10 μ U/ml de insulina. A injeção de glucagon em Chrysemys provocou aumento desta atividade após 6 e 48 horas de sua administração. É provável que esse 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 naqueles animais por via sub-cutânea. Provas experimentais indicam que o acréscimo da produção de CO_2 verificado às 48 horas corresponderia 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 destes animais, mas decorram também de alterações profundas no seu estado metabólico relacionadas com as variações dos fatores ambientais.

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 este 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 desper

tado 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. Rodríguez, pela valiosa orientação em minha iniciação científica.

Devo ainda estender os meus melhores agradecimentos ao Dr. Alcyr Kraemer, pela dedicada colaboração no planejamento deste 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 norepinefrina 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 Eli Lilly & Co. Indianopolis, Indiana, Estados Unidos, pelo suprimento de insulina e de glucagon, sendo este último também obtido pela gentileza do Dr. Arthur W. Martin da Universidade de Washington, Estados Unidos.

V

B I B L I O G R A F I A

- ABEL, J.J., GEILING, E.M.K., ROUILIER, 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 GALANSINO, 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.
- BURGER, 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. *Fo*

- lia Endocrinol., 9: 145-164.
- CAHILL Jr, G.F., LEBOEUF, 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. Argent. 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. (1950) - Ação da Carbutamida ou Bz-55 sobre a Glicogenólise hepática. Tese de Doutorado. Porto 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 Wiley & 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.
- ENGEI, F.L. e SCOTT Jr., J.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 LISHAJKC, F. (1959) - The Estimation of Catecholamines 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.
- FOÀ, P.P. (1956) - The control of the secretory activity of the islets of Langerhans. *Ciba Foundation Colloq. on Endocrinol.*, 9: 55-71.
- FOÀ, P.P. (1964) - Glucagon, em PINCUS, G., THIMAN, K.V. & ASTWOOD, E.B. - *The Hormones*, 4: 531-556, Academic Press, New York.
- FOÀ, P.P. e GALANSINO, G. (1962) - Glucagon: Chemistry and Function in Health and Disease. Springfield, Charles Thomas, p.79.
- FOÀ, P.P., GALANSINO, G. e POZZA, G. (1957) - Glucagon, a Second Pancreatic Hormone. *Recent Progress Hormone Res.*, 13: 473-510.
- FOÀ, P.P., SANTAMARIA, L., BERGER, S., SMITH, J.A. e WEINSTEIN, H.R. (1952) - Effects of the Hyperglycemic-Glycogenolytic Factor (HGF), Epinephrine and Insulin in Normal and Depancreatized Dogs. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 80: 635-639.
- FOÀ, P.P., SANTAMARIA, L., WEINSTEIN, H.R., BERGER, S. e SMITH, J.A. (1952) - Secretion of the Hyperglycemic-Glycogenolytic Factor in Normal Dogs. *Amer. J. Physiol.*, 171: 32-36.

- FOÀ, 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., FOÀ, 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 glucogenic substance in extracts of pancreas and other tissues. *Quart. J. Exp. Physiol.*, 13 (Supl.):128. Citado por FOÀ, 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 VCELLA, 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. (1950) - Comparative Physiology of the Endocrine Pancreas. In GORBMAN, A. - *Comparative Endocrinology*. New York, Wiley. 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 FOA, 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 especies 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.

- KASAL, 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 Chrysemys 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 Crystalline 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 sobre a glicemia e glicogênio da Tartaruga "Phrynops hilarii" sob a influência de injeção contínua de glicose. Tése de Doutoramento. 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 Metaglucagon Diabetes in Rabbits. Diabetes, 9: 278-285.

- LOPES, N. (1955) - The action of alloxan in the turtle Pseudemys d'orbigny, D and B. Acta Physiol. Latinoamer., 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'orbigny". 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 Corticotrophin 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 a) - Efeitos da pancreatemia 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 CORREA, P. (1959) Accion de la Orinasa sobre la glucemia de la tortuga "Phrynops hilarii". Rev. Soc. Argent. Biol., 35: 279-287.
- MARQUES, M., MAGALHÃES, E. e RIET CORREA, 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.
- 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 Pancreasnucleotid. Klin. Wschr., 33: 132. Citado por FOA, 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. Ganassini, Milano, Italia. Citado por FOA, P.P. e GALANSINO, G. (1962) - Glucagon: Chemistry and Function in Health and Disease. Springfield,

Charles Thomas. p.20.

- MURLIN, J.R., CLOUGH, H.D., GIBBS, C.B.F. e STOKES, A.M. (1923) - Aqueous extracts of the pancreas. I. Influence on the carbohydrate metabolism of depancrea-tized animals. J.Biol.Chem., 56: 253-296.
- NISH, M. (1910) - Ueber Glycogenbildung in der Leber pan-kreasdiabetischer Schildkröte. 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 FOA, P.P. e GAIANSINO, G. (1962) - Glucagon: Chemistry and Function in Health and Disease. Springfield, Charles Thomas, p.47.
- PRADO, J.L. (1946) - A glicemia normal nos ofídios. 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 Insulin "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 floridanae. Ph.D. Dissertation. Univ. of Michigan, Citado por MILLER, R.M. (1961) - Carbohydrate Metabolism in Amphibian and Reptiles. In MARTIN, A.W. Comparative Physiology of Carbohydrate Metabolism in Heterothermic Animals. Univ. Washington Press. Seattle, p. 138.
- RIET CORREA, P. e MAGALHÃES, E. (1961) - Effect of Prior Epinephrine upon Adipose Tissue Sensitivity to Insulin in Vitro. Metabolism, 10: 808-811.
- RIET CORREA, 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 sobre a glicemia da tartaruga Chrysemys d'orbignyi. No prelo.
- RODRIGUEZ, R.R., MARQUES, M., CONCEIÇÃO, J.M. e LETTI, N., (1956) - Action diabetogene des corticoides synthetiques. 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., 3: 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 FOA, P.P. e GALANSINO, G. (1962) - Glucagon: Chemistry and Function in Health and Disease. Springfield, Charles Thomas. p.5.
- SELTZER, H.S. (1962) - Comparative Insulogenic 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 dog. 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. Soc. 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 crystalization 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 glyco-génolytique 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.
- VOIK, 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'orbignyi". *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 Glucagon im Pankreas der Ente. *Weit.Physiol. Chem.*, 305: 132. Citado por FOA, 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. Tese. Toronto. 60p.
- YALOW, R.S. e BERSON, S.A. (1960) - Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J.Clin.Invest.*, 39: 1157-1175.

Í N D I C E

I - Introdução	4
II - Material e métodos	21
Generalidades	21
1. Determinação da glicemia	25
2. Dosagem de glicogênio hepático e muscular	26
3. Extração da insulina pancreática	27
4. Dosagem de insulina pancreática	28
5. Determinação da atividade insulínica do plasma	29
6. Extração e dosagem de epinefrina no plasma	32
III - Resultados e Discussão	36
A) Experimento prolongado	36
1. Efeitos sobre a glicemia	36
2. Efeitos sobre o teor de glicogênio hepático e muscular ...	42
3. Efeitos sobre a atividade insulínica do plasma	45
4. Efeitos sobre o conteúdo de insulina pancreática	46
B) Experimento agudo	49
1. Efeitos sobre a glicemia	49
2. Efeitos sobre a atividade insulínica do plasma	52
IV - Resumo e conclusões	65
V - Bibliografia	68

* * *