



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

PATOLOGIA MEDICA

ASPECTOS EXPERIMENTALES DE LA  
COMBINACION D 860 - DBI.

AUTOR: Fernando Andreu Kern

DIRECTOR: José León Castro

30 de Junio de 1960

Cátedra de Patología Médica

Prof. Dr. José León Castro  
Sevilla

T.D.  
A/7

Por la presente certifico que D. Fernando Andreu Kern  
ha realizado bajo mi dirección la siguiente Tesis Doctoral  
titulada: " Aspectos experimentales de la combinación  
D 860 - DBI".

Sevilla a 30 de Junio de 1960.



ILLUSTRISIMO TRIBUNAL:

La presentacion a vuestra consideracion, de este modesto grabajo experimental con el que aspiramos al Grado de Doctor representa para nosotros un paso mas, quizas uno de los mas importantes y fundamentales en la meta que nos habiamos impuesto como una nevezidad de nuestra vida academica desde que recibieramos la xpimera semilla, sembrada en nosotros por mi padre el Prof. Andreu Urra ( q.e.p.d.).

Mas tarde el Prof. Leon Castro ha seguido incitando nuestra inquietud, apoyandonos continuamente con su sabia direccion y consejo y es por ello que queremos agradecerle desde aqui su profundo interes y continuo desvelo. Creemos que hoy podemos darle a el la satisfaccion que desgraciadamente no puedo dar a mi padre, queremos que esta sea la mejor prueba de agradecimiento al Prof. Leon Castro, ademas pensamos que quien mejor que el discipulo para recibir la ofrenda del desaparecido maestro.

La realizacion de los trabajos experimentales, base de esta tesis se deben a la ayuda prestada por la Fundacion Juan March, al concedernos una beca que nos

permitio la estancia durante un año en Alemania. Expresamos por ello nuestro agradecimiento a la Fundacion March.

Nuestra estancia en Alemania tuvo lugar en la Clinica Medica Universitaria del Pro.Dr.Dr.h.c. L. Heilmeyer a quien queremos agradecer su amable acogida. En la citada clinica realizamos junto a este otros trabajos experimentales y clinicos bajo la direccion del Priv.Doctor.Dr.W.Creutzfeldt, a quien tambien expresamos desde aqui nuestro agradecimiento por su ayuda y consejos.

No nos queda mas que solicitar del Ilmo. Tribunal que juzgue nuestro trabajo con la maxima benevolencia y piense al hacerlo que es fruto de un impulso juvenil y que todavia nos queda mucho que aprender.

Sevilla, Julio de 1960.

" ASPECTOS EXPERIMENTALES DE LA COMBINACION

D 860 - DBI"

I	Introduccion	Pag.	1
II	Historia		3
III	Farmacologia y mecanismo de accion:		
	a) D860		6
	b) DBI		21
IV	Hipotesis de trabajo		29
V	Material y metodos		32
VI	Resultados y discusion		38
VII	Conclusiones		50
VIII	Resumen		52
IX	Bibliografia		53

I N T R O D U C C I O N

Desde que BANTING y BEST en 1.922 extraen del pancreas la substancia activa, que DE MEYER en 1.909 habia intuido definiendola como la que haria posible la combustión de los hidratos de carbono, y logran con ello - el paso al tratamiento científico y efectivo de la diabetes mellitus, ha estado ligado este a la inyección diaria de insulina dada la imposibilidad de su aplicación oral, pues como proteina sufre una hidrólisis al contacto con los ácidos y fermentos propios de aparato digestivo humano. Desde entonces ha sido la preocupación de los investigadores el hallazgo de substancias que mantuviesen su acción hipoglucémica aún siendo administradas oralmente, liberando a los enfermos de la inyección diaria. Las esperanzas puestas en las SMITALINAS A y B se vieron pronto defraudadas, pero CALVO URIARTE en 1.927 - pudo preveer diciendo: -"Hay que confiar, sin embargo, - en que la química sintética de la cual es hija el preparado y ejemplo de lo que puede alcanzar la experimentación rigurosamente científica, conseguira eliminar estas propiedades que tanto limitan su utilización practica." - Lo que hoy es una realidad.

Numerosos intentos se han hecho a este respecto, muchos han sido los fracasos por diferentes razones, - hasta que en 1.955 por fin, se consigue una substancia que administrada por via oral sea activa como agente hipoglucemante y que carezca al mismo tiempo de acciones colaterales que hagan desistir de su empleo.

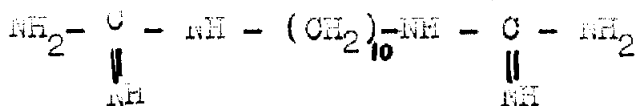
Los estudios sobre el mecanismo de acción de los agentes hipoglucemantes activos por via oral han dado lugar a un enorme desarrollo de la investigación - no solo de ellos, sino tambien de la insulina y de la patogenia de la diabetes, contribuyendo al esclarecimiento de algunos puntos pero manteniéndose todavía desconocido el mecanismo de acción en si, que no sera posible esclarecer hasta no tener un exacto conocimiento de la diabetes y sobre todo del mecanismo de acción de la insulina.

Todo ello justifica el interés que tienen actualmente los antidiabeticos orales y que nosotros hayamos realizado una pequeña aportación a este campo de investigación.

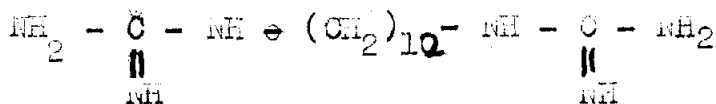
II

HISTORIA

La historia de los antidiabéticos orales comienza con seriedad en 1.926 cuando FRANK (1) descubre e introduce en la clínica la decametilendiguánida o SIRIALINA A:



y posteriormente como mas activo, la dodecametilendi - guánida o SIRIALINA B:



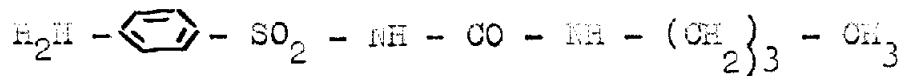
que si bien producian una hipoglucemia relativa en las diabetes ligeras, producian alteraciones colaterales - manifestandose como toxicas, especialmente sobre aparato digestivo, higado y riñón, haciendo que pronto caye ran en desaso.

RUIZ y col. (2) en 1.930 observan la producción de hipoglucemias al estudiar la acción antibacteriana, del METIL-THIOIMIDAZOL y ya en 1942 JAMBON y col. (3,4) en las pruebas clinicas realizadas con el PARA-AMINO-- BENZOL-SULFAMID-ISOPROPIL-THIODIAZOL (IPTD) observaron, junto a la acción bacteriostatica una acción hipogluce miente en relación con la concentracion sanguinea, lie gandose a shocks hipoglucemicos que solamente podian ser salvados con la aplicacion a tiempo y en grandes -



cantidades de glucosa.

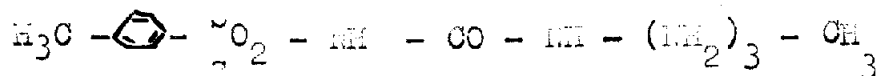
Independientemente y sin conocimiento de estas investigaciones FRANKÉ y FUCHS (5) en 1955 observaron en niños afectados de neumonia tratados con SULFA RIBUTIL-UREA, la aparición de síntomas cerebrales - que FUCHS demostró en si mismo se debían a una hipoglucemia y que esta dependía de la concentración -- sanguínea.



N-(4 - amino-benzolsulfonil) N'- n butilurea  
BZ 55, CARBAMIDA.

farmacológicamente, FRANKÉ y FUCHS (5) y BERTRAM (7) publicaron los primeros resultados clínicos.

Poco después se observó que otra sustancia - derivada de la anterior.

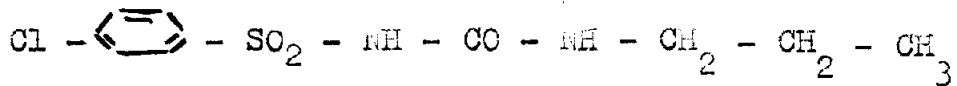


N-(4 - metil-benzolsulfonil) N'- n butilcarbamida.

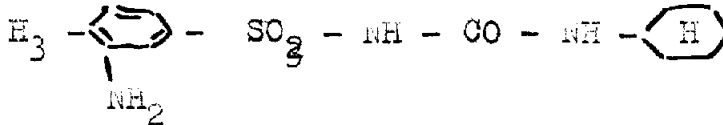
D 860, TOLBUTAMIDA.

en la que la sustitución en posición -para- del anillo benzénico de un grupo amino por uno metílico trae en consecuencia y con ello su principal ventaja terapéutica, la pérdida de su acción antibacteriana, pero la conservación de la acción hipoglucemiante. Posteriormente tendremos ocasión de hacer hincapié sobre este punto.

Otros derivados:

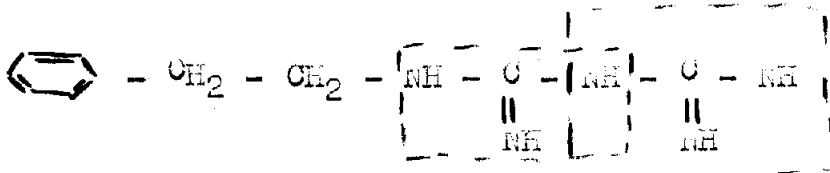


CLOPRIPAMIDA.



METABEXAMIDA.

introducidos posteriormente ejercen la acción hipoglucémica con dosis menores, esta última cinco veces más potente que el D 860 (CREUTZFELDT, ANDREU y DISCHER, (8)). A partir de 1957 UNGAR (9) introduce nuevamente un derivado de la GUANIDINA, cumpliéndose rigurosamente la presunción de CALVO CRIADO.



FENETILGUANIDINA, DBI

combinación que evita los efectos tóxicos ¿? y las lesiones de hígado y riñón presentando la gran ventaja de ser activo en los casos de diabetes juvenil, -- donde los otros antidiabéticos se muestran como inactivos.

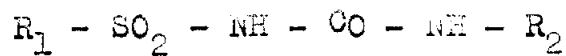
Otros derivados de este pretenden evitar todo efecto tóxico manteniendo su acción hipoglucémica.

III

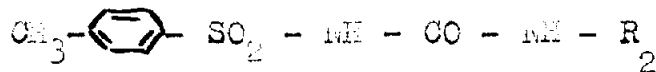
FARMACOLOGIA Y MECANISMO DE ACCION

a) D 860

Tras el conocimiento de las sulfanilureas y de su excelente acción hipoglucémica después de la administración oral de estos compuestos vemos que todos muestran ciertas similitudes y que excepto el IPAD responden a la fórmula general:



y que su acción no está en ningún modo unida al grupo sulfanilo ( $H_2N - \text{C}_6H_4 - SO_2$ ) y que según las sustituciones que se hagan en  $R_1$  o  $R_2$  varíe la potencia de su acción hipoglucémica y la presencia o ausencia de manifestaciones tóxicas; se ha demostrado que los restos  $R_1$  y  $R_2$  tienen que tener una estructura definida para darle efectividad al compuesto, poniéndose de manifiesto que es en la fórmula:

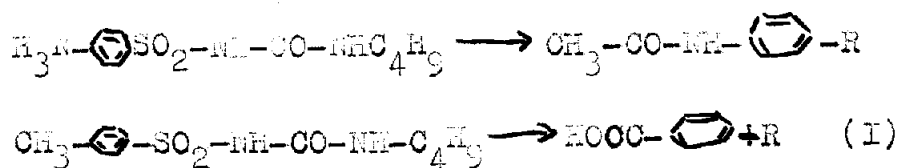


$R_2$  lo sustituimos por un H o un grupo metílico se obtiene un compuesto inactivo y que es a partir de la sustitución por un etilo cuando el compuesto empieza a ser activo bruscamente, perdiendo actividad cuando la cadena tiene más de 7 átomos de C, llegando a ser

nula con 12. (D 860 se encuentra entre los mas activos)

Substituciones en R<sub>2</sub> con cadenas aromaticas producen cuerpos que en el supuesto de que muestren una actividad -- como agentes hipoglucemiantes, son tan altamente toxicos, que no se ha llegado a obtener buenos resultados con ellos

D 860 se diferencia del BZ por la falta de acción quimioterapica y por el producto de descomposición como se elimina. Mientras que BZ 55 en el organismo humano sufre en el grupo amino en posición -para- una acetilación para eliminarse como tal por la orina alrededor del 75 %; el D 860 es oxidado en el grupo metilo en posición -para- convirtiendolo en un grupo carbonilo, eliminandose cerca del 90% de esta forma:



(I) este acido no muestra accion hipoglucemica.

D 860 es como sal sodica soluble en medio alcalino -- y por tanto bien absorbido en el intestino, obteniendose cantidades medibles en suero a los 30 min., llegandose a un maximo a las 4 horas, que corresponde con el nivel mas bajo hipoglucemico (investigaciones propias en CIRSULFELDT ANDREU y DISCHER (3) Fig. 1<sup>a</sup>).

La toxicidad del D 860 ha sido suficientemente pro-

bada en animales no habiendose encontrado alteraciones organicas en experimentos de larga duracion con dosis tan altas aun como las usadas por BAENDER (19).

Sobre el mecanismo de accion de las sulfanilureas, representadas en nuestro trabajo por el D - 860, se han desarrollado diferentes teorias, pensando en primer lugar en la accion sobre el sistema contrainsular para ejercer su accion antidiabetica. Estudios realizados en diabeticos tratados con sulfanilureas fallecidos por causas intercurrentes -- han demostrado la integridad histologica de la corteza suprarrenal (PELLEPER y col. (10), RAUSCHER -- SAROGLANK y SAUER (11)), asi como BROWN y SOLOMON, (12) del tiroides. Experimentalmente en conejos -- tratados con D 860 tampoco se han observado alteraciones en la hipofisis anterior y corteza suprarrenal, demostrandose tambien que la aplicacion de sulfanilureas a animales a los que se ha extirpado la corteza suprarrenal no solo siguen respondiendo con una hipoglucemia (BAENDER y SCHOLTZ (13) KRAOHT y col. (14) y MOUSSAY y PENROS (15)) sino, que se hacen incluso diez veces mas sensibles.

BAENDER ( 19) ha podido observar incluso la liberacion de adrenalina tras la aplicacion de D - 860 demostrable por el aumento de la presion arterial pero cuyo efecto hiperglucemico es sobre-cubierto por la hipoglucemia producida. La extirpa -

ción de la hipófisis tampoco evita el efecto hipoglucemiante, pudiéndose excluir que estas glándulas jueguen un papel en el mecanismo de acción de las sulfanilureas.

Tras las numerosas investigaciones realizadas en este campo se han invocado las teorías siguientes como las que pueden explicar el mecanismo de acción de estos fármacos.

1.- Lesión de las células A del páncreas o inhibición de la producción de glucagón que para FERBER regularía en el organismo normal la glucemia y sería en los diabéticos el responsable de la hiperglucemia. Esta teoría defendida principalmente por MARIE y FUCHS. (5) BERMAN y col. (7,20) y FERNER y RUNGE (21,22), apoyada por los trabajos de v. HOLT y col. (23) comprobando la lesión de las células A tras la aplicación de sintalina e IPTD a muy altas dosis en el conejo y en la rata; en los animales diabéticos por la aloxana había una correlación entre la lesión de las células A y el efecto sobre la glucemia (23,24,25,26).

A esta teoría se opone por un lado que CHURCHILL y SCHLESING (27,28) no pudieron comprobar las investigaciones de v. HOLT tras IPTD aun cuando encontraron, - alteraciones protoplasmáticas en las células no observaron ninguna disminución importante de su número ni co -

relación con la hipoglucemia. Por otro lado ELPIS, CRISTOPHE y BELLEAS (29) discuten si estas alteraciones sean debidas a una degeneración ya que no pudieron demostrar pérdida de células A. FERNER y RUNGE solo han visto muy ligeras alteraciones tras dosis muy altas de BZ 55, alteraciones que no han podido ver en el estudio histológico del páncreas de diabéticos tratados con dosis terapéuticas. -- Posteriormente la aplicación de dosis no tóxicas, de BZ 55 en la experimentación a animal ha dado ocasión a comprobar la falta de lesión de las celulas A.

CREUTZFELDT y FIRTER (34) a pesar de haber producido shocks tras la aplicación de D 860 no han podido demostrar lesiones en las células A y solamente en experimentos de larga duración observaron una atrofia y disminución de las células, lo mismo que ocurre tras la aplicación crónica de insulina. CREUTZFELDT (35) tampoco ha observado lesión en los páncreas de doce diabéticos tratados con éxito durante seis meses.

Falta por tanto un substrato morfológico que demuestre que la acción hipoglucemiante de los derivados de la sulfanilurea se haga a través de la lesión de las células A.

Por otro lado la inhibición de la producción de glucagón está en contradicción con un contenido normal de este en el páncreas.

(CREUTZFELDT (35) y CZYZIK (36) y en plasma (TYBERGILYN y WILLIAMS (37) GOLDNER y col. (38) a pesar de haber encontrado una ligera inhibición de la hiperglucemia debida al glucagon crean que mas que a una acción directa sobre este se deba a una potenciación del efecto insulínico.

GRANDI GIOVANI (42) por el resultado de sus observaciones habia dudado del papel de las células A en la diabetes aloxánica y el hecho de que la aplicación de IPTD - (LA BARRÉ Y ROUSE (39)), BZ 55 (ACELLIS y HARDEBERG (6) - MIRACOMI y col. (30) y EBRINGER Y LINDNER (40)) y D 860 - (CREUTZFELDT y BOBROWER (41) no produzca efecto en los animales con diabetes aloxánicas ha comprobado esta observación. Por último la mejoría del estado metabólico tras la aplicación de sulfanilureas debería mejorar en todos los diabéticos en los que hay disminución en mayor o menor grado de células B mientras que las A están intactas, resultando que tras las ultimas investigaciones tiene que ser puesta en duda la acción diabotogena del glucagon (CREUTZFELDT (45) VOLK y col. (46)).

2.- MIKSKI (47) pudo obtener tras la aplicación de BZ 55 y D 860 in vivo o in vitro, una inhibición de la ~~la~~ insulinasa por el descrita. Mientras que YAMAYA y KIZIMA (48) no pueden comprobar que la inhibición de insulinasa, sea un motivo suficiente para explicar la hipoglucemia y VAUGHAN (49) tampoco encuentra inhibición de la insulinasa



a concentraciones terapéuticas de BZ 55 y D 860.

3.- LOUBATIERES (51,52,53) en sus primeros experimentos tomo el pancreas como el punto de acción de estas sulfonamidas; en perros pancrea tectomizados no pudo encontrar ninguna acción hipoglucémica, mientras que si solo se realizaba una pancreatectomia parcial se podía observar una acción hipoglucémica significativa.

LA BARRE Y REUSE (39) completaron estos experimentos sistematizandolos, encontrando que en animales tratados con diferentes dosis de aloxana habia una correlacion entre la dosificación de esta y la disminucion de la glucemia; de modo que con dosis muy altas de aloxana falta toda acción hipoglucémica. Como siempre es necesaria la presencia de células B se llega a la conclusion de que la acción hipoglucémica de las sulfanilureas sea debida a una estimulación de estas.

Posteriormente ACHLIS y MARDBECK con BZ 55 comprueban que en la diabetes aloxanica muy ligera se produce hipoglucemia. Para el D 860 se realizan las mismas observaciones en conejos por CRUZZELLEDDI y SCHNEIDER (41) a los que fue posible incluso en diabetes aloxanicas no acióticas provocar con dosis altas de D 860 una mejoría del estado metabólico llegando incluso a shock hipoglucémico con dosificaciones máximas.

La experiencia clinica apoya estos estudios experimentales comprobando que en los diabeticos juveniles, caracterizados por un gran defecto en insulina y por predisposición a la acidosis no tiene efecto la terapeutica con sulfanilureas (SERRAM, BERDHALDT y OTTO (7,53)

Sin embargo otros hechos experimentales, observaciones microscopicas del sistema celulas B, no permiten comprobar que la acción hipoglucemante de las sulfanilureas sea debida a una sencilla estimulación de la secrecion de insulina. OLSEN-FALST y FINLIER (34) encontraron que tras diferente tiempo de aplicación habia una correlacion con la degranulación de las celulas B. Morfológicamente esta observacion puede ser debida ya bien a haber salido toda la insulina de las celulas o a haberse producido una calma en la secreción; el cuadro de la degranulacion se desarrolla progresivamente, aparece despues de mayor tiempo de aplicación - de 1/860, haciéndose mas llamativo, si bien el efecto, hipoglucemante puede observarse desde el principio.- Este cuadro morfológico debe interpretarse pues como, una calma en la función.

Al contrario que cuando se produce una estimulación de las células B por la cortisona, muchas cario-

metricas no han permitido a CREUTZFELDER, DETARING y WHITE (54) observar un aumento de los núcleos celulares. HALLST (55) ha encontrado también degranulación en estudios realizados con páncreas de ratas tras larga aplicación de insulina. Finalmente HALLST (56) estudiando la función de las islas <sup>de</sup> LANGEHRAN del conejo por su contenido en zinc demostrable histoquímicamente, que marcha paralelo con el contenido en insulina, lo encuentra aumentado tras una corta aplicación de D 860, igual que tras la aplicación de insulina. La disminución del contenido en zinc que hablara en favor de la liberación de insulina y que sería característico de ella no ha sido encontrado, indicando que la aplicación única de D 860 inhibiría por la hipoglucemia producida la salida de insulina, que se concentraría en las islas; la aplicación crónica de D 860 produciría en las células un equilibrio -- entre la producción y la salida de insulina (gran degranulación de todas las células con un contenido normal en zinc.).

GOETZ y col. (57) han estudiado también la concentración de insulina en plasma que encuentran aumentada tras D 860 pero no han encontrado efecto hipoglucémico con las concentraciones medidas de D 860.

La presencia de células B para ejercer la acción hipoglucémica, la necesidad de un mínimo de tejido pancreático funcionando, aunque parece ser el lugar de acción más probable de las sulfonamidas hipoglucemiantes no ha permitido encontrar una demostración, que deje sin lugar a dudas, que lo que se produce sea una sencilla estimulación de la secreción de insulina.

4.- Por último se ha invocado la inhibición de los fermentos hepáticos, especialmente de aquellos que intervienen en la glucogenólisis.

La acción más llamativa que poseen las sulfonamidas hipoglucemiantes es el marcado aumento de glucógeno hepático que se presenta tras IPTD (61, 62, 63) y por CREBUTINOLIT y SUELENIE (59, 60) se ha encontrado además que falta el aumento del glucógeno muscular como ocurre con la insulina, es decir efecto totalmente opuesto lo que habla también en contra de la teoría de estimulación de la secreción de insulina como tal. Por otro lado en el animal hipofisectomizado no aumenta el glucógeno hepático (para REISSER (119) por pérdida de la capacidad de fijación, tampoco aumenta el muscular y no falta la acción hipoglucémica. La aplicación simultánea de D 860 y glucosa no produce un mayor aumen-

to de glucogeno lo que habla en contra de que este proceda del azucar sanguineo. Tras comprobar que insulina intrapor tal produce el mismo efecto que subcutanea, llegan a la conclusion de que el mecanismo de accion no se basa en una sencilla estimulacion de la produccion de insulina. - Ello ha hecho derivar la atencion de los investigadores sobre aquellos fermentos que son responsables de la glucogenolisis (Fosforilasa) y de la formacion de glucosa libre (glucosa-6-fosfatasa).

Se ha estudiado la actividad de la glucosa-6-fosfatasa en homogenados de higado de animales sin tratar y tratados con sulfanilureas. En los homogenados de animales sin tratar se encontro una directa inhibicion de la actividad de estos fermentos, pero la concentracion de sulfanilurea necesaria para obtener esta inhibicion es muy variable (VAUGHAN (49), MORRIS y LINDSON (64), BERNETT y col. (33) ASHCROFT y CAMILL (65) y generalmente todas se hallan muy por encima de las concentraciones terapeuticas.

En homogenados de higado de animales que habian recibido antes de la muerte dosis de D 860 o BZ 55 estaba enormemente reducida la actividad de la glucosa-6-fosfatasa - (TYBERGHEIN y col. (61), PARKES y col. (66) y WALTERFELDS, SUMI y ORLUTZFELDT (67) y de acuerdo con ello la produccion de glucosa por el higado de estos animales esta disminuida en contra de los controles no tratados.

Sobre la naturaleza de los factores que llevan a una inhibición de la glucosa-6-fosfatasa no es conocido aun nada cierto. Un aumento ~~purfo~~ de la acción de insulina como consecuencia de una secreción estimulada no puede excluirse del todo ya que la inhibición del fermento despues de la inyeccion de insulina aparece primero en el transcurso de 6 a 12h (ASHMORE y col. (69)) mientras que tras las sulfanilureas aparece bastante tiempo antes. También se ha observado que la acción de la insulina levantando el bloqueo que se encuentra tras los triosa-fosfatos, se obtiene también con BZ 55 y una decima parte de la insulina -- que antes habia sido necesaria.

Ante los Resultados obtenidos en el estudio de la -- concentración o actividad enzimatica en homogenados de -- higados de ratas, WALLERFELS, SUMI Y CREUTZFELDT quiere -- ren admitir que las sulfanilureas actuan directamente en el higado sobre numerosas dehidrasas que dependen de los piridinnucleotidos, modificando sus actividades, contanto con una segunda accion indirecta sobre la glucemia, extendiendose la misma modificación del metabolismo a otros tejidos, probablemente al insular, con lo que puede ser influida la secrecion y produccion de insulina.

Las investigaciones realizadas hasta ahora in vitro acerca de una acción directa sobre los **enzimas** hepaticos que intervienen en el **metabolismo hidrocarbado** son en parte contradictorios y no explican que in vivo, a concentraciones de 20 a 30 mgrs.% que generalmente se alcanzan en sangre con las dosis terapeuticas se encuentre regularmente un efecto hipoglucemico, para el que deben ser también necesarios factores extra-hepaticos.

SOBEL, RODRIGUEZ-IÑIGO y MORTON (71) han visto en el perro hepatectomizado la acción hipoglucemica como en el normal, e igualmente FRANKLEY y col. (72); SUE -- DROF admite, como resultado de sus investigaciones que el higado no es el unico organo donde ejercen su acción las sulfonamidas hipoglucemiantes y GARATTINI y col. - (74) observan que tras BZ 55 se modifica la permeabilidad de la membrana para la glucosa marcada con C14, -- pero que si aumenta su oxidación y su introducción en la molecula de glucogeno.

Para CREUTZFELDT (70) existiria una reacción de -- las sulfanilureas en las células B, formandose una -- combinación que no seria susceptible de almacenamiento en los islotes y de acción preferentemente sobre el higado. Este proceso no se debe equiparar a una simple estimulación.

de las células B, la genesis de tal complejo sulfanilurea-insulina en las células B explicaria sus alteraciones morfológicas asi como la necesidad de su presencia para la acción hipoglucemiante de las sulfanilureas y al mismo tiempo los diversos efectos no similares a la insulina que estas sustancias producen en el hígado como consecuencia de una reaccion directa de las sulfanilureas en tejido insular o una reaccion indirecta por un producto metabólico -- formado en mayor grado bajo el efecto de estas, en el hígado o en el mismo tejido insular.

Hasta ahora hemos estudiado el efecto que la administración de la sulfanilurea produce sobre la morfología celular del pancreas el efecto sobre el glucogeno hepatico, y muscular y el efecto sobre alguno de los enzimas que intervienen en el metabolismo hidrocarbonado. Tambien se ha buscado solución al problema planteado sobre el mecanismo de acción de las sulfanilureas, por el estudio de las alteraciones que produce su administración, sobre metabolitos del metabolismo hidrocarbonado, concretamente ácido lactico, ácido piruvico y ácido alfa-cetoglutarico.

Si anteriormente hemos encontrado con resultados contradictorios vemos que tampoco en este aspecto encontramos



resultados análogos entre los diferentes autores.

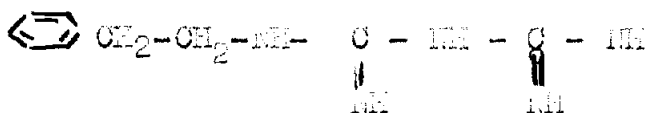
Para RENOOLD (75) el D 860 no produciría alteraciones sobre la lactacidemia y piruvemia, mientras - que para LEMES y col. (76) SEGAL y col. (77) BARRIZOLA y col. (78) y FOA y su grupo (79, 80, 81) la inyección de sulfenilureas a animales de experimentación produce un descenso de la lactacidemia y piruvemia; para, estos la disminución de piruvico y lactico que puede proceder al máximo efecto hipoglucemiante sería el resultado de la disminución de la glucosa, y / o una inhibición de los metabolitos ~~los~~ <sup>los</sup> ~~causa~~ a pesar de un aumento de la secreción de insulina.

STEIGERWALD y col. (82) estudiaron en hombres diabéticos y sanos la concentración de los metabolitos ~~ob-~~ <sup>ob-</sup> ~~teniendo~~ resultados paralelos, aunque algo retrasados, tras D 860 con respecto a la administración de insulina, lo que obliga a pensar que el retardo es producido por el tiempo necesario para la movilización de la insulina de las células B, lo que entonces produce el mismo efecto. Sin embargo, el efecto paralelo se limita solo a las concentraciones de ácido piruvico y lactico, mientras que llamativamente obtienen un efecto contradictorio sobre el ácido alfa-cetoglutarico en el sujeto de metabolismo normal.

B) DBI

Ya hemos expresado anteriormente que el DBI es un derivado de la guanidina, cuya acción hipoglucemiante es conocida ya desde hace mas de cuarenta años, pero cuyo empleo en la clinica no pudo generalizarse pues, presentaba efectos tóxicos que imposibilitaban su uso, ocurriendo lo mismo con sus dos derivados, SINTALINA - A y B. Hoy se ensaya, desde 1957, la efectividad del DBI cuyos efectos tóxicos son mínimos, aunque ya hemos visto y posteriormente volveremos a considerar que en muchos casos se presentan sintomas de intolerancia gastrica que impiden su aplicación.

La formula de la FENILBISGUANIDA o DBI es:



Sobre el mecanismo de acción hipoglucémica no ha habido tanta discusión como sobre el de las sulfanilamidas, si bien tampoco se conoce con exactitud.

Para el DBI tambien se ha invocado su acción destructora de las células A o sea que ejercería su acción hipoglucemiante destruyendo la producción de glucagón.

Substancias que selectivamente producen una destrucción de las células A como el cloruro de cobalto, no producen en el cobaya una hipoglucemia. En oposición a esto

se encuentran las observaciones descritas por DAVIS (86) por primera vez de que la aplicación de Sintalina A al conejo produce gra. degranulación y vacuolización de las células A junto con una grave hipoglucemia, pero ya DAVIS no tomó la destrucción de las células A como origen de ella. En favor de esto hablaban los hechos conocidos de que la sintalina A -- producía en el perro pancreatectomizado (87) (88) y eviscerado (88) (90) una hipoglucemia. Por tanto aparece como improbable la teoría de v. MOULT (23,24,25) que explica por la lesión de las células A el efecto hipoglucemiante de la sintalina.

CREUTZFELDT (27,28) pudo demostrar que no existe paralelismo entre las lesiones celulares y la hipoglucemia tras sintalina; en el conejo a pesar de la grave hipoglucemia, la mayor parte de las células A están intactas. Para DAVIS la sintalina B no produce ninguna lesión de las células A a pesar de lo que también produce hipoglucemia, CREUTZFELDT deduce que sería solamente un efecto secundario, que no explica la disminución de la glucemia mientras que podía estar producido por la lesión hepática que llevaría a un mayor consumo de glucagon.

DBI produce en el cobaya regularmente una hipoglucemia a ~~la~~ ~~siendo~~ de los animales de experimentación,

el que mejor responde a este efecto, sin que se hayan podido demostrar lesiones constantes de las células  $\beta$  que podrían estar producidas por alteraciones del metabolismo hepático, muchas veces no demostrables histológicamente.-

De todo ello podemos deducir que la lesión celular no es responsable de la hipoglucemia producida por la sintactalina y mucho menos explicaría la producida por el D.I.-

Desde las investigaciones cuidadosas de GRAUB (89) -- así como las de LODOU y MARKS (90) colocamos que la sintactalina disminuye el consumo de oxígeno, que produce un aumento de la formación de ácido láctico, es decir, lleva a una glicolisis anaerobia. Aumenta al mismo tiempo la concentración de ácido cítrico en sangre e inhibe in vitro el paso que une la oxidación con la fosforilización, probablemente a nivel del citocromo C según los estudios enzimáticos de HOLMBERG (91).

Las investigaciones de WILLIAMS y col. (92,93,94,95,96) han demostrado sin lugar a dudas que el lugar de acción es extrapancreático, que el D.I. es eficaz en el animal pancreatectomizado, que es eficaz en el diabético juvenil, si bien no permite en todos los casos la sustitución de la insulina, haría posible la disminución de la dosis de esta.

Conocemos los efectos de la aplicación del DBI especialmente sobre los metabolitos del metabolismo hidrocarbonado. El aumento de la concentración de ácido láctico, expresión de la glucólisis anaerobia aumentada, y del menor consumo de oxígeno marcha paralela con la elevación de la concentración sanguínea de ácido pirúvico: El DBI, produce sobre el hígado una disminución de la gluconeogénesis y una marcada acción glucogenolítica.

Para WILLIAMS (97) la inhibición de los enzimas oxidativos (citocromo oxidasa, succínico-dehidrogenasa) produciría una anoxia tisular, que llevaría por un lado a una glicólisis ~~anaerobia~~, a un aumento del metabolismo de la glucosa en el músculo y por ende a la hipoglucemia; - por otro lado produciría una disminución de la gluconeogénesis, empobrecimiento de glucógeno hepático que daría lugar a la disminución de la glucólisis y con ello a la hipoglucemia.

Muchos han sido los estudios experimentales realizados tanto en animales como en hombres; los estudios experimentales en animales in vivo han permitido observar que el DBI produce hipoglucemia tanto en los animales diabéticos - por la aloxana (9), en los pancreatetectomizados (98) y eviscerado. Para NIELSEN y col. (98) ha sido comprobada la disminución de la gluconeogénesis hepática.

Nosotros, en nuestros estudios experimentales, hemos encontrado también disminuido el glucogeno hepático, de acuerdo con WILLIAMS y col. (92) (Tabla I).

T A B L A I

Efecto del DBI sobre el contenido en glucogeno del hígado.

Controles	1,2 %
Tras 15 mgrs./kg. DBI	0,06%

El aumento de la concentración de ácido láctico en sangre aumenta antes de que comience a producirse la hipoglucemia (TYBERGREN y col. (94), STEINER y col (98)) y nosotros hemos visto que la aplicación de dosis de DBI que no son capaces de disminuir la glucemia llevan ya a un aumento de la concentración de ácido láctico y pirúvico, significativo en relación a los controles mientras que el ácido alfa-cetoglutarico permanece aun inalterado (vease Tablas V y VI).

No se ha observado también una disminución del glucogeno muscular por WILLIAMS y colaboradores. Al contrario que D 860 el DBI no produce un aumento del glucogeno tras la aplicación de anhídrido carbónico marcado  $C_{14}$  o tras la aplicación de glucosa marcada con  $C_{14}$  según las observaciones realizadas por el mismo grupo de autores.

NILSEN y col. (96) así como KRONEBERG y STOPPEL (99)

han encontrado que el DBI inhibe la hipoglucemia producida por la adrenalina, observando al mismo tiempo que esta inhibición era dependiente de la dosis en grado muy marcado consecuencia probablemente también del empobrecimiento --- del hígado en el glucógeno. Los estudios realizados en el cobaya con 10 mgrs./kg. de peso no ha sido capaz de inhibir la hiperglucemia postadrenalina, así como tampoco la inhiben las dosis subletales.

Para KRONEBERG y STOEPFEL el hecho de que en ciertas especies de animales se produzca una hiperglucemia tras la aplicación de dosis terapéuticas, de DBI, en otras la respuesta sea diferente de unos a otros, produciéndose solo a veces una hipoglucemia ha hecho que estudien este problema en los cobayas en los que solamente se produciría el efecto hiperglucémico con dosis subletales, que estaría producido por una acción inespecífica del producto, del tipo de una intoxicación general y por una acción adrenergica, hecho que se demuestra fácilmente al tratar previamente los animales con hydergina y ver que desaparece el efecto hiperglucémico, confirmando las teorías de REINWEIN y HUELLER (100).

Los estudios experimentales realizados in vitro han llevado a la conclusión de que el DBI produciría en el hígado, músculo y tejido adiposo una disminución del con ---

sumo de oxígeno; aumento del ácido láctico y disminución del glucógeno en músculo e hígado. Con preparaciones de mitocondrias ha sido posible a STEINER y col. (98), demostrar la inhibición de la succínico-dehidrogenasa y de la citocromo-oxidasa, WICK (101) ha observado también una disminución de la síntesis de grasas por el tejido adiposo.

En el hombre normal ha sido posible observar por FÄJANS y col. que el DBI no produce hipoglucemia mientras, que es capaz de producirla en el diabético estable e inestable (POMERANCE, (103), ODELL (104) y FRAIL (105).

DBI tiene además el inconveniente de poseer una amplitud de dosificación muy estrecha, hemos visto anteriormente que la aplicación en dosis de 10 mgrs/kg. no, producía un descenso significativo de la glucemia mientras que 15 mgrs./kg. nos han hecho obtener un descenso significativo de la glucemia de alrededor del 50% (Fig. 42); KRONENBERG y STOEPEL han tenido ocasión de observar que en el cobaya, o sea utilizando el mismo animal que nosotros, que hasta 20 mgrs/kg. se obtiene un descenso de la glucemia dependiente de la dosis administrada, mientras que dosis de 25 a 50 mgrs/kg. tienen ya una acción letal.

El DBI tiene las siguientes acciones similares a la



insulina: produce hipoglucemia; aumenta la utilización de la glucosa por los tejidos y disminuye la gluconeogenesis. Por el contrario produce efectos distintos a la insulina en los siguientes puntos: produce anoxia; - inhibe la fosforilización oxidativa; produce inhibición de la citocromo-oxidasa y succinico-deshidrogenasas; causa acumulación de alguno de los productos del ciclo de KREBS y finalmente aumenta la concentración sanguínea - de fosfatos.

Puede suponerse que algunos de los efectos indeseados que han sido observados en algunos pacientes se deban a la inhibición de la fosforilización oxidativa, a la disminución de los enlaces fosforicos ricos en energía y a la disminución de la actividad del ciclo de KREBS.

Existen además del DBI o ~~fenetilbiguanida~~ otros derivados, n-AMIL y n-BUTIL, que difieren del primero en el grado de la acción hipoglucemiante y en las acciones, colaterales. Un estudio mas detenido de ellos evitamos - hacerlo por no entrar dentro de nuestros propósitos, bastandonos con un representante de este grupo, tal como hemos hecho con las sulfanilureas y el D 860.

IV

H I P O T E S I S   D E   T R A B A J O  
=====

Los trabajos clinicos de MEHNERT y SEITZ (106) y BERINGER (107) proponiendo la idea de la combinaci3n de las sulfanilureas (D 860) con la fenitilbiguanida (DBI), llega para los primeros por la necesidad de disminuir la dosis de DBI por la intolerancia gastro intestinal (mal sabor de boca, anorexia, nauseas vomitos, diarreas, etc) que se presenta en gran n3mero de enfermos tratados con esta substancia.

Nosotros nos habiamos propuesto comprobar con este trabajo experimental lo que MEHNERT y SEITZ habian tomado como posible, ya que el analisis un poco detenido de sus condiciones de trabajo y material empleados hacian ver como improbable que D 860 y DBI -- sean susceptibles de aumentar su poder terapeutico -- al ser administrados conjuntamente, como podria deducirse al estudiar los mecanismos de acci3n tan diferentes que parecen tener ambas substancias (D 860 necesita de tejido pancreatico funcionando mientras -- que DBI es activo en el animal pancreatico); obteniendo asi una acci3n sinergica que hiciera posible dar a la combinacion una mayor acci3n, resultando al mismo tiempo la posibilidad de reducir la dosis de DBI con lo que se evitaria los transtornos de in-

tolerancia gastrica a que da lugar.

KRALL (108) en 1959 propone la misma idea de asociacion remarcando que esta posibilidad no ha sido aun estudiada adecuadamente.

Mas recientemente en 1960 MEHNERT y KRALL (109) publican nuevamente resultados en los que la combinacion sulfanilurea - fenetilbiguanida les hace pensar que puede ser empleada con exito en aquellos diabeticos que no han respondido a las sulfanilureas o en los que despues de cierto tiempo de haber podido ser tratados con exito, por alguna razon dejan de responder beneficiosamente.

En la fig.2ª exponemos lo que fue nuestra idea al iniciar nuestro trabajo experimental, en ella vemos que D 860 actua siempre que exista una cierta cantidad de insulina endogena, mientras que para que el DBI actue como se ha visto del resultado de los numerosos trabajos experimentales expuestos anteriormente no es necesaria la presencia de insulina endogena para tener una accion hipoglucemiante. Hay pues, que las limitaciones que se oponen a la accion terapeutica del D 860 son mayores que las que se oponen al DBI, pero este tiene el grave inconveniente de que si se hacen necesarias dosis muy elevadas presenta manifestaciones toxicas, no en el sentido de lesion organica ( hepatica o renal, etc.)

sino por la aparición de síntomas de intolerancia gastro-intestinal, ya mencionados.

En nuestra figura encontramos que el área cuadrada representa el beneficioso aumento que la acción sinérgica de ambos medicamentos podría proporcionar al diabético, elevando el número de los que son susceptibles de ser tratados por vía oral con una de ambas sustancias, de modo que al combinarlas fuera menor el número de enfermos que requiriese la inyección diaria de insulina.

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

Como material de experimentación hemos utilizado el cobaya, ya que esta entre las especies que mejor, responden a la acción del DBI detras del que solo se encuentran el mono y el hombre, nuestros cobayas han sido utilizados por las experiencias des ues de un ayuno de 12 horas, siendo inyectados siempre a la misma hora y muertos, uno, dos o tres horas después, de la inyección, para evitar alteraciones producidas por el ritmo diario de estos animales. Fueron sacrificados por golpe subito en el cuello, abriéndose este para obtener la sangre por hemorragia de los vasos yugulares, que recogida sirvió para realizar todas las determinaciones.

La glucemia fue determinada por el método de HA  
GEDORE - JENSEN (110).

Los acidos lactico, piruvico y alfa-cetoglutarico han sido determinados por técnicas enzimaticas basadas en el test optico de WARBURG (111), por el que es posible hoy determinar de un modo exacto y específico cierto número de substratos y la actividad de algunos enzimas, por las variaciones que en cuanto a la absorción a la luz ultravioleta producen algunos, de los enzimas que toman parte en la reacción.

En las reacciones que vamos a utilizar aprovechamos el aumento o disminución de la extinción que a la luz ultravioleta produce el difosfopiridinucleotico, según se encuentra en forma reducida (DPN-H) o en forma oxidada (DPN), pues DPN-H en presencia de un sustrato y de un ~~ap~~fermento se oxida y esta oxidación lleva a la disminución de la extinción que se puede medir y cuyo máximo está en 340  $m\mu$ . teniendo un coeficiente de absorción de  $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2 / \text{Mol.}$  o lo que es lo mismo, el logaritmo del coeficiente de la intensidad inicial dividido por la intensidad transmitida a 340  $m\mu$ . para 1 cm. de espesor equivale a 6,22. Si la lectura se hace en 366  $m\mu$  el coeficiente de extinción es aproximadamente de la mitad,  $3,3 \times 10^6 \text{ cm}^2 / \text{Mol.}$

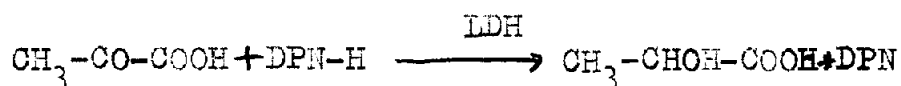
En estas reacciones el cofermento reacciona estequiometricamente, equivalente a equivalente, con lo cual la variación del cofermento nos da una medida cuantitativa de la transformación del sustrato.

Aunque las reacciones son reversibles, el equilibrio suele estar desplazado en un sentido. Esto quiere decir, que si realizamos las determinaciones en el sentido directo de la reacción, cuando tiene lugar prácticamente la consumción del sustrato se llega a una es-

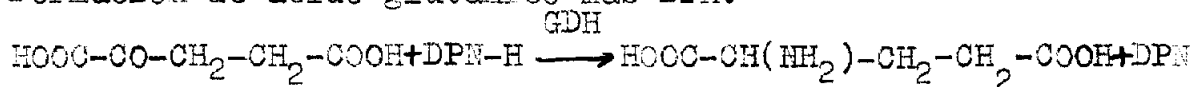
tabilización, reflejada en la extinción; mientras que si la determinación se hace en sentido inverso el producto, final hay que irlo captando a medida que se produce, para lograr un desplazamiento del equilibrio en dicho sentido.

Las reacciones que tienen lugar en las determinaciones que hemos realizado son las siguientes:

I) Acido piruvico con DPN-H en presencia de dehidrogenasa del acido láctico (LDH) forma acido lactico mas DPN.



II) Acido alfa-cetoglutarico con DPN-H en presencia de dehidrogenasa del ácido glutamico (GDH) dá lugar a la formación de ácido glutamico mas DPN.



En las reacciones I y II el equilibrio esta desplazado a la derecha. La determinacion de acido lactico basada en la reacción I hace necesaria la adición de semicarbáida para captar el acido piruvico que se va produciendo con lo cual se desplaza el equilibrio en sentido de la formación de dicho acido.

Para la determinación del sustrato tenemos en cuenta el resultado absoluto de la transformación mientras que para medir la actividad enzimática nos interesa la ve-





Calculo:  
Acido piruvico:  $\frac{E}{3,3} \times F_1 \times F_2 \times \frac{4,035}{2} \times \frac{1}{2} = \mu\text{mol/ml.}$

$F_1$  = factor de dilucion sangre/ac.perclorico.  
 $F_2$  = factor de dilucion en la neutralizacion.

Acido alfa-cetogutarico:

$$\frac{E}{3,3} \times F_1 \times F_2 \times \frac{4,055}{2} \times \frac{1}{2} = \mu\text{mol/ml.}$$

A 0,2 ml. del sobrenadante neutralizado se añaden 1,72 ml. de puffer de glicocola (conteniendo semicorbacida), 0,06 ml. de DPN y 0,02 ml. de LDH (5 mgrs./ml.) midiendo el aumento de la extinción hasta su estabilización en cubeta de 1 cm. de espesor a 366  $\mu$ .

Calculos:

Acido lactico:  $\frac{E}{3,3} \times F_1 \times F_2 \times \frac{2,00}{0,2} = \mu\text{mol/ml.}$

El glucogeno hepatico fue determinado con arreglo a la tecnica de SEIFLER y col. (112) que tiene la ventaja de la poca cantidad de tejido hepatico necesario para ella. Esta tecnica, con pequeñas modificaciones, para la determinación indirecta del glucogeno es la siguiente:

un trozo de higado de 40 a 120 mgrs. de peso es pesado rapidamente en una balanza de torsión e introducido rapidamente en un tubo de centrifuga con tapon que contiene 1 ml. de HOK al 30% y calentado en agua hirviendo durante 20 min. A continuacion se enfria y se añaden 1,5 ml. de etanol al 95% para precipitar el glucogeno, calentando nuevamente hasta la ebullición tras enfriarse centrifuga 20 min. a 3.500-4000 r/min.

El sobrenadante se tira y el tubo se deja invertido unos minutos sobre papel de filtro para secar. El glucogeno sedimentado se diluye exactamente en 5 ml. de agua destilada; paralelamente en un tubo se ponen 5 ml. de agua como control y otros 5 ml. de una solución standard de glucosa (20 gammas/ml.) Introducidos en agua fria se añaden con pipeta 10 ml. de reactivo antron (0,2 grs. en 100 ml. de ácido sulfurico al 96%) Calentado 10 min. en agua hirviendo y enfriado inmediatamente Lectura a 620  $\mu$ . en cubeta de 2 cm. Con una curva standard se calcula el contenido en glucogeno, expresando el resultado en por ciento de tejidos fresco.

En primer lugar se realizaron las determinaciones en un grupo de 25 cobayas para obtener las cifras controles de todas las determinaciones y despues en grupos de diez se estudio el efecto de las diferentes sustancias administradas para tener valor estadistico.

Como sulfanilurea fue utilizado el D 860 (Roche) y el DLI de la firma Grue

VI

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N

Los valores obtenidos en 25 cobayas tras un ayuno de 12 horas se expresan en la tabla II.

T A B L A II

Valores controles

Glucemia	87	mgts. %
Acido lactico	7	"
Acido piruvico	0,50	"
Acido alfaacetoglutamico	0,11	"
Glucogeno hepatico	1,2	%

En primer lugar fueron estudiadas las alteraciones producidas por la inyección aislada de insulina, D 860 y DBI y sacrificamos los animales una, dos o tres horas despues según el criterio obtenido del estudio de los resultados.

a) insulina

La insulina fue administrada subcutaneamente a dosis de 2U. por kg. de peso, obteniendo un descenso de la concentración de glucosa en sangre del 50% aproximadamente a las tres horas de la inyección.

El primer grupo fue sacrificado dos horas después de la inyección. (Tabla III).

T A B L A III

Glucemia	55,5	mgts. %
Acido lactico	13,5	"
Acido piruvico	1,09	"
Acido alfaaceto glutamico	0,07	"

Un segundo grupo fue muerto tres horas despues de la inyección:

T A B L A IV

Glucemia	42,7	mgcs.%
Acido lactico	10,3	"
Acido piruvico	0,51	"
Acido alfaacetoglutamico	0,12	"
Glucogeno hepatico	0,87%	

Del analisis de las tablas III y IV, vemos que la glucemia alcanza el descenso maximo al cabo de tres horas y que este corresponde al 50% aproximadamente del valor en ayunas. Los ácidos lactico y piruvico tras un ascenso en la segunda hora disminuyen aproximadamente a los valores normales sin haber obtenido el ascenso tan duradero como la hipoglucemia descrito por HENNES (76), MCORHOUSE (113) D'AMICO y col. (79), GALAMBOS y col. (80-81), mientras que el acido alfaacetoglutamico que en la segunda ha sufrido un ligero descenso ( $p > 0,1$ ) vuelve al valor normal igualmente a las tres horas de la inyección. El glucogeno hepatico analizado en el segundo grupo ha experimentado un descenso como era de esperar de acuerdo con los trabajos ya conocidos de CORI (114,115), CRESTFELDT y SUETTERLE (59,60).

B) DBI

Utilizado en primer lugar a dosis de 10 mgcs. por kg. de peso se sacrificaron los grupos de cobayas una y dos horas despues de la inyeccion (Tabla V y VI).

T A B L A V

Glucemia	85,6	mgs. %
Acido lactico	7,5	"
Acido piruvico	0,61	"
Acido alfaacetoglutamico	0,11	"

T A B L A VI

Glucemia	83,2	mgs. %
Acido lactico	10,2	"
Acido piruvico	0,79	"
Acido alfaactoglutacion	0,11	"

Vemos que la dosis empleada no produce alteraciones significativas en la primera hora (acido piruvico -  $p > 0,1$ ) mientras que en la segunda hora se obtienen ya aumentos significativos de acido lactico ( $p < 0,001$ ) y acido piruvico ( $p < 0,001$ ) mientras que la concentración de acido alfaacetoglutamico sigue inalterada, así como tampoco se ha producido un descenso apreciable de la glucemia.

Aumentando la dosis a 15 mgs. por kg. de peso y sacrificando los animales tres horas despues de la inyección se obtuvieron los resultados siguientes:

T A B L A VII

Glucemia	40	mgs. %
Acido lactico	70,5	"
Acido piruvico	2,32	"
Acido alfaacetoglutamico	0,04	"
Glucogeno hepatico	0,06	%

Vemos que a esta dosis la glucemia experimenta ya un descenso del 50%, mientras que los aumentos máximos de ácidos láctico y pirúvico corresponden a los resultados obtenidos por otros autores, TYBERGHELLI y WILLIAMS (94) entre ellos; ello sería expresión de la glucólisis anaerobia que produce el DBI por bloqueo de los fermentos respiratorios, inhibición de la citocromo oxidada. Este experimento in vitro de innegable interés no explica del todo como ejerce el DBI su acción hipoglucemiante, pues las concentraciones requeridas son más elevadas que las necesarias para ejercerla.

Llama la atención por el contrario, el marcado descenso, mayor del 50%, que experimenta la concentración sanguínea de ácido alfaetoglutarico. De ello, junto con los trabajos de UNGAR (116) que ha encontrado también aumentado el ácido cítrico, hecho conocido ya como producido por la simpatina, parece deducirse que el DBI produce efectivamente un bloqueo del ciclo de los ácidos tricarbónicos.

El glucógeno hepático lo encontramos también disminuido como corresponde a la marcada glucogenólisis que produce el DBI, descrita por NIELSEN (96) y WICK (19).

C) D 860

Administrado a dosis de 200 mgrs. por kg. de pe

so, un grupo de cobayas <sup>fu</sup>sacrificadas dos horas despues de la inyección. (Tabla VIII)

T A B L A VIII

Glucemia	54,9	grms. %
Acido lactico	6,42	"
Acido piruvico	0,55	"
Acido alfaacetoglutarico	0,07	"

La glucemia ha descendido ya de un modo marcado - mientras que no hay alteraciones en las concentraciones de acidos lactico y piruvico, de acuerdo con los resultados obtenidos por LEWIS (75) y en contraposición a los de GALLASINO y col. (80,81), LARIZZA (78), SEGAL (77) y HEMES (76); el acido alfaacetoglutarico ha experimentado un ligero descenso no significativo, --- ( $p > 0,1$ ).

El segundo grupo fue sacrificado tres horas despues de la inyección de la misma dosis de D 860; vemos aqui que la glucemia ha descendido un poco mas, que siguen inalteradas las concentraciones de los acidos lactico y piruvico en sangre, mientras que el ácido alfaacetoglutarico ha vuelto a la concentración normal. (Tabla IX).

T A B L A IX

Glucemia	50,3	grms. %
Acido lactico	7,3	"
Acido piruvico	0,4	"
Acido alfaacetoglutarico	0,10	"
Glucogeno hepatico	2,62	%

El glucogeno hepatico ha experimentado un considerable aumento como corresponde a la inhibición de la glucogenelisis que producen las sulfanilureas como ya conocemos de los numerosos trabajos citados anteriormente. Recientemente SUMI, ORLUFFELDT y WALLERFELS (116) han publicado resultados que hablan en favor de una glucogeogenesis a partir del  $CO_2$  y de un metabolismo mas rápido de glucogeno bajo D 860.

Vemos pues, que a la dosis elegida hemos conseguido un descenso de la glucemia del 50 % en todos los casos. Ello nos permite sentar unas bases que luego nos permitan estudiar la acción combinada de estos farmacos, por un lado D 860 - DBI, por otro INSULINA, DBI; con ello entramos ya en lo que seria la cuestión fundamental de nuestro trabajo, tal como lo planteabamos.

Puesto que en todos los grupos analizados hasta ahora hemos obtenido una respuesta optima al cabo de tres horas de efectuada la inyección, en los grupos siguientes nos habiamos propuesto sacrificar los animales al cabo de este tiempo. Las substancias se han inyectado por separado, con una diferencia de segundos en regiones opuestas del cuerpo de los animales. Se utilizaron soluciones cuya concentracion se calculo de forma que el volumen a inyectar fuera sensiblemente igual para evitar errores que pudieran desprenderse -



por diferentes velocidades de absorción de volúmenes muy desiguales.

En la tabla vemos el resultado de la combinación de 200 mgrs./kg. de peso de D 860 y 10 mgrs./kg. de DBI.

T A B L A X

Glucemia	50,7	mgrs. %
Acido lactico	9,17	"
Acido piruvico	0,88	"
Acido alfaacetoglutamico	0,17	"
Glucogeno hepatico	1,2	%

En ella observamos el descenso de la glucemia de alrededor del 50 % que los acidos lactico y piruvico - han experimentado un ligero aumento que es significativo en relación con la concentración alcanzada por la administración de la dosis aislada de D 860 ( $p < 0,001$ ) y que el acido alfaacetoglutamico esta en las mismas condiciones. El glucogeno hepatico permanece en la concentración obtenida en los animales controles.

Interpretamos el descenso de la glucemia como obtenido por la acción del D 860, mientras que el DBI ha mantenido su acción elevando la concentración de ácido piruvico en sangre y evitando el aumento de la concentración de glucogeno hepatico.

Otro grupo de cobayas fue inyectado con 200 mgrs. por kg. de peso de D 860 y 15 mgrs./kg. de DBI, sacri-

ficándose los animales tres horas después de la inyección, obtuvimos los resultados siguientes:

T A B L A X I

Glucemia	43,2	mgms. %
Acido lactico	48,5	"
Acido piruvico	2.06	"
Acido alfa-cetoglutarico	0.04	"
Glucogeno hepatico	0,09	"

La glucemia ha experimentado un descenso mayor que el producido por la misma dosis de D 560 aislada, mientras que es inferior el alcanzado ahora, al producido por la misma dosis aislada de DBI, así como el aumento de las concentraciones de los acidos, lactico y piruvico es inferior al experimentado con el DBI aislado. La concentración sanguínea de ácido alfa-cetoglutarico es la misma que la alcanzada por la acción del DBI aislado, mientras que la concentración de glucogeno hepatico, si bien disminuido con arreglo a los valores controles no ha descendido tanto como se expresa en la tabla VII.

En este grupo interpretamos el descenso de la glucemia como debido a la acción ejercida por el DBI pues esta se mantiene sobre los metabolitos del metabolismo hidrocarbonado, lactico, piruvico y alfa-cetoglutarico y sobre la concentración de glucogeno hepatico, que aunque algo frenada por el D 560, este no ha sido capaz ya de aumentarla sino de mantenerla normal.

En este grupo y en los siguientes hemos de llamar la atención sobre el hecho de que hemos recogido sangre de la pata posterior del cobaya en cantidad suficiente para determinar el valor en ayunas de la glucemia y descartar el máximo diferencias que pudieran surgir como consecuencia de no ser estrictamente iguales las condiciones nutritivas a las que habían estado sometidos los cobayas antes del ayuno.

Posteriormente hemos administrado 200 mgrs./kg. de D 860 y 20 mgrs./kg. de DBI, obteniendo ahora ya, en primer lugar síntomas hipoglucémicos (apatia, shock, -- convulsiones) al cabo de dos horas de efectuada la inyección, lo que nos obligo al sacrificio de los animales antes de las tres horas previstas. De los valores ~~x~~ medios dados en la tabla XII se han excluido animales que tenían una concentración de glucosa muy por encima, del valor en ayunas (efecto adrenérgico de la dosis de DBI) así como de los valores medios de ácido láctico y pirúvico, los de aquellos animales que habían presentado convulsiones.

T A B L A      X I I

Glucemia	32,4	mgrs. %
Acido láctico	57,3	"
Acido pirúvico	1,82	"
Acido alfaacetoglutarico	0,05	"
Glucogeno hepatico	0,03	%

El descenso de la glucemia es mas marcado que en el grupo anterior y se efectuo dos horas despues de la inyección; la concentración de acido lactico ha experimentado un ligero aumento, un descenso la de acido piruvico, mientras que la de ácido alfaacetoglutarico es practicamente igual, el glucogeno hepatico ha descendido aún mas con arreglo al grupo anterior, haciendose aún mas patente la incapacidad de D 860 para conservar la concentración normal de glucogeno hepatico.

En la tabla XIII exponemos los resultados obtenidos con el ultimo grupo de animales tras la inyección de 2 U./kg. de INSULINA y 15 mgrs./kg. de DBI.

TABLE XIII

Glucemia	19,3	mgrs %
Acido lactico	47,8	"
Acido piruvico	1,6	"
Acido alfaacetoglutarico	0.06	"
Glucogeno hepatico	0.06	%

En este grupo la presentación de sintomas hipoglucemicos en los animales, tambien nos obligo a sacrificarlos dos horas despues de la inyección. La glucemia ha descendido a concentraciones minimas, se mantiene el aumento de los ácidos lactico y piruvico, así como el descenso en la concentración de ácido alfaacetoglutarico y glucogeno hepatico. De ello podemos deducir que la adición de INSULINA - DBI es eficaz, se obtiene una ac-

ción sinérgica que se manifiesta por un descenso significativo de la glucemia con arreglo al obtenido por la insulina y DBI individualmente a las mismas dosis y obtenido en un espacio menor de tiempo.

Gráficamente exponemos a continuación, en X la fig. 4ª el efecto que sobre la glucemia ha tenido las diferentes dosificaciones de las sustancias empleadas; se pone de manifiesto, que insulina, D 860 y DBI han provocado con estas dosificaciones un descenso sensiblemente igual de la glucemia, que el efecto de la combinación D - 860 - DBI a las dosis expresadas no es eficaz para producir un descenso significativo de la glucemia con arreglo a las mismas dosis inyectadas aisladamente. Es significativo el descenso de la glucemia consecuencia de la acción de la combinación insulina DBI.

En las figs. 5ª y 6ª vemos gráficamente el efecto sobre las concentraciones de ácido láctico y ácido piruvico en sangre, respectivamente; insulina y D 860 mantienen las concentraciones normales de ambos cuerpos, no nos ha sido posible, observar el aumento duradero tras la aplicación de insulina. En los grupos en los que interviene el DBI la concentración está francamente aumentada, el máximo como consecuencia de la acción aislada disminuye en la combinación con D 860, sien-

do todavia menor en la combinaci3n con insulina. Hubiera sido logico esperar que en este ultimo grupo, si la insulina produce un aumento de la concentraci3n sanguinea de 3cido lactico y piruvico como describe FOA y col. (80) entre otros, que la combinaci3n insulina - DBI debiera producir un aumento mas marcado que el producido por DBI aislado. Ya hemos visto que nosotros no hemos obtenido este aumento auradero tras la aplicaci3n de insulina.

En la fig. 7<sup>a</sup> vemos tambi3n graficamente, las alteraciones en la concentraci3n sanguinea de 3cido alfaetoglut3rico. Insulina y D 860 mantiene las concentracion normal, mientras que en los grupos en los que interviene el DBI esta francamente disminuida.

Finalmente en la Fig. 8<sup>a</sup> vemos el efecto sobre la concentraci3n de glucogeno hepatico. El aumento marcado producido por el D 860, disminucion con insulina y DBI, que este mantiene en su combinacion con D 860.

VII

CONCLUSIONES

1ª.- La administración subcutánea de insulina no nos ha permitido observar un aumento duradero de la concentración sanguínea de los ácidos láctico y pirúvico, a pesar de la hipoglucemia conseguida.

2ª.- Tres horas después de la inyección de insulina se comprobaba su acción glucogenolítica.

3ª.- Una dosis insuficiente de DBI para provocar una hipoglucemia, produce ya elevaciones significativas de la lactacidemia y piruvemia.

4ª.- El aumento de la dosis de DBI en 9 mgrs. por kg. de peso lleva a una disminución considerable de la glucemia (50%).

5ª.- El DBI produce un gran aumento de la concentración sanguínea de los ácidos láctico y pirúvico.

6ª.- El DBI produce una marcada reducción de la concentración sanguínea de ácido succínico, lútranico.

7ª.- Se comprobaba la gran deplección de glucógeno hepático tras la administración de DBI.

8ª.- Las conclusiones 5ª y 6ª hablan en favor de la producción de un bloqueo del ciclo del ácido cítrico tras la administración de DBI.

9ª.- No se observan alteraciones tras la administración

tración de D 860 en la concentración sanguínea de los metabolitos del metabolismo hidrocarbonado a pesar de la excelente respuesta hipoglucémica obtenida.

10ª.- Compruebanos la marcada inhibición de la - glucogenolisis que produce el D 860.

11ª.- no se produce una acción sinérgica al asociarse D 860 y DBI a dosis que anteriormente se habían mostrado como eficaces.

12.- El D 860 no es capaz no ya de aumentar, - sino de mantener la concentración normal de glucógeno hepático, en la combinación con DBI, hecho que - - aun dada la conclusión 11ª podría hablar en favor de la combinación de ambos, con fines terapéuticos.

13ª.- DBI e insulina administrados conjuntamente llevan a una marcada hipoglucemia, que se produce además en un período menor de tiempo a que antes habían sido eficaces ambos administrados separadamente.

14ª.- La combinación DBI-insulina no lleva a un aumento más marcado de la lactacidemia y piruvemia que la producida por el DBI aislado.

15ª.- Por tanto, tras el resultado de nuestro trabajo experimental no consideramos indicada la asociación D 860-DBI.



VIII

R E S U M E N

Tras una introducción histórica, se hace la revisión bibliográfica acerca de la farmacología y mecanismo de acción de los agentes hipoglucemiantes activos -- por vía oral, con especial detenimiento del D 860 y -- DBI.

Se ha estudiado primero la acción aislada de insulina, DBI y D 860 sobre la glucemia, y sobre las concentraciones de ácidos láctico, piruvico y alfaacetglutárico en sangre y glucógeno hepático.

El problema planteado de buscar una base experimental a la combinación D 860-DBI que hiciera posible un mayor campo de aplicación de estos agentes hipoglucemiantes, se resuelve negativamente al comprobar que -- la aplicación conjunta de los que antes habían sido eficaces aisladamente, no produce una mayor hipoglucemia. Se comprueba el mejor efecto de la asociación DBI-insulina por conseguirse una marcada hipoglucemia, en un espacio menor de tiempo.

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

- 1.- Frank, E., M. Nothmann y A. Wagner:  
Klin. Wschr. 5 (1926) 2100.
- 2.- Ruiz, C.L., L.L. Silva y L. Libenson:  
Rev. Soc. Argent. Biol. 6 (1930) 134.
- 3.- Jambon, M., J. Chaptal, A. Vedel y J. Schaap:  
Montpellier Medical (1942) 441.
- 4.- Jambon, M., P. Lazerges y J.H. Metropolitanski:  
Montpellier Medical (1942) 489.
- 5.- Franke, H. y J. Fuchs:  
Dtsch. med. Wschr. 80 (1955) 1449.
- 6.- Achelis, J.D. y K. Hardebeck:  
Dtsch. med. Wschr. 80 (1955) 1452.
- 7.- Bertram, F., E. Bendtfeldt y H. Otto:  
Dtsch. med. Wschr. 80 (1955) 1455.
- 8.- Creutzfeldt, W., F. Andreu Kern y R. Discher:  
Ann. N.Y. Ac. of Sci. 82 (1959) 537.
- 9.- Ungar, G., L. Freedman y S.L. Shapiro:  
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. N.Y. 95 (1957) 190.
- 10.- Pfeiffer, E.F., K. Schoeffling y H. Steigerwald:  
Dtsch. med. Wschr. 81 (1956) 838.
- 11.- Rausch-Stroomann, J.G. y H. Sauer:  
Klin. Wschr. 34 (1956) 707.
- 12.- Brown, J. y D.H. Solomon: Metabolism 5 (1956) 813.
- 13.- Baender, A. y J. Scholz: Dtsch. med. Wschr. 81 (1956) 889.
- 14.- Kracht, J., W. Kroener, L.v. Holt y C.v. Holt:  
Naturwiss. 44 (1957) 16.
- 15.- Houssay, B.A. y J.C. Penhos: Metabolism 5 (1956) 727.
- 16.- Holt, C.v., L.v. Holt y B. Kroener:  
Naturwiss. 41 (1956) 162.
- 17.- Dulin, W.E., E.H. Morley y D.E. Nezhans:  
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 93 (1956) 132.
- 18.- Lang, S. y S. Sherry: Metabolism 5 (1956) 733.
- 19.- Baender, A.: Arzneimittel Frschg. 7a (1956).
- 20.- Bertram, F.: Wien. med. Wschr. 106 (1956) 965.
- 21.- Ferner, H. y W. Runge: Dtsch. med. Wschr. 81 (1956) 731.
- 22.- : Arzneimittel Frschg. 6 (1956) 256.
- 23.- Holt, C.v., L.v. Holt, B. Kroener y J. Kuehnau:  
Naturwiss. 41 (1954) 166.
- 24.- Arch. exper. Path. Pharmak. 224 (1955) 6
- 25.- 224 (1955) 7
- 26.- Holt, C.v., L.v. Holt y H. Ferner:  
Zschr. Zellforsch. 42 (1955) 305.
- 27.- Creutzfeldt, W. y E. Tecklenborg:  
Arch. Exper. Path. Pharmak. 227 (1955) 23.
- 28.- Klin. Wschr. 33 (1955) 43.

- 29.- Gepts, W., J. Cristophe y R. Bellens:  
Ann. Endocr. Paris. 16 (1956) 946.
- 30.- Kracht, J. y J. G. Rausch-Stroomann:  
Naturwiss. 43 (1956) 180.
- 31.- Gepts, W., J. Cristophe y R. Bellens:  
Ann. Endocr. Paris. 17 (1956) 278.
- 32.- Volck, B. W., Sh. Weisenfeld, S. S. Lazarus y M. Goldner:  
Metabolism 5 (1956) 894.
- 33.- Berthet, J., E. W. Sutherland y M. H. Makman:  
Metabolism 5 (1956) 768.
- 34.- Creutzfeldt, W. y H. Finter: Dtsch. med. Wschr. 81 (1956) 89.
- 35.- : Dtsch. med. Wschr. 81 (1956) 841.
- 36.- Czyzyk, A.: Arzneimittel Frshcg. 6 (1956) 700.
- 37.- Tyberghein, J. M. y R. H. Williams:  
Clin. Fed. Proc. abril 1956.
- 38.- Goldner, M., Sh. Weisenfeld y G. Hughes:  
Arzneimittel Frschg. 7a (1958).
- 39.- ~~HA~~ Barre, J. y J. Neuse: Arch. Neerl. Physiol. 28 (1947) 475.
- 40.- Beringer, A. y A. Lindner: Wien. klin. Wschr. 68 (1956) 316.
- 41.- Creutzfeldt, W. y K. Boettcher:  
Dtsch. med. Wschr. 81 (1956) 896.
- 42.- Grande Covian, F.: Medicamenta 11 (1953) 229.
- 43.- MacLean, N. y R. S. Ogilvis: Diabetes 4 (1955) 367.
- 44.- Creutzfeldt, W. y A. Theodossiou:  
Beitr. Pathol. Anat. (1957) 117.
- 45.- Creutzfeldt, W.: Diabetes 6 (1957) 135.
- 46.- Volck, B. W., S. S. Lazarus y M. Goldner:  
Arch. Int. Med. 93 (1954) 87.
- 47.- Mirsky, I. A., D. Dineott y H. Dolger: Metabolism 5 (1956) 15.
- 48.- Tamiya, K. y K. Kizima: Arzneimittel Frschg. 7a (1958).
- 49.- Vaughan, N.: Science 123 (1956) 885.
- 50.- Loubatieres, A.: Compt. Rend. Soc. Biol. Paris 138 (1944) 766.
- 51.- : These Doc. Montpellier (1946) 86.
- 52.- , L. Goldstein, J. Metropolitanski y  
J. D. Schaap: Comm. XLII Congr. Medic. alienistes et  
Neurologistes. Montpellier 28. (1942) 30.
- 53.- Bertram, F. E. E. Bendtfeldt y H. Otto:  
Dtsch. med. Wschr. 81 (1956) 274.
- 54.- Creutzfeldt, W., L. Detering y O. Welte:  
Dtsch. med. Wschr. 82 (1957) 1564.
- 55.- Haist, R. E.: 2 Congr. Int. Diabetes Fed. Cambridge 1955.
- 56.- Maske, H.: Dtsch. med. Wschr. 81 (1956) 899.
- 57.- Goetz, F. C. y R. H. Egdahl: Fed. Proc. 17 (1958) 55.
- 58.- Beringer, A. y E. Keibl: Wien. med. Wschr. 106 (1956) 792.
- 59.- Creutzfeldt, W. y H. Suetterle: Dtsch. med. Wschr. 82 (1957) 157.
- 60.- : Ann. Endocr. (1957) 184.
- 61.- Tyberghein, J. M., Y. D. Halsey y R. H. Williams:  
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 92 (1956) 322.
- 62.- Miller, M. L. jr y W. E. Tulin: Science 123 (1956) 584.
- 63.- Baender, A. y J. Scholz: Dtsch. med. Wschr. 81 (1956) 889.
- 64.- Mohnike, J. y W. Knitsch: Naturwiss. 43 (1956) 449.

- 65.- Ashmore, J., G.F. Cahill, jr. y A.B. Hastings: *Metabolism* 5 (1956) 764.
- 66.- Hawkins, R.D., M.A. Ashworth y R.E. Haist: *Canad. Med. Ass. J.* 74 (1956) 972.
- 67.- Wallenfels, H., H.D. Summ y W. Creutzfeldt: *Dtsch. med. Wschr.* 82 (1957) 1581.
- 68.- Lamprecht, W. y I. Trautschold: *Arzneimittel.Frschg.* 7a (1958)
- 69.- Ashmore, J., A.B. Hastings, F.B. Nesbett y A.E. Renold: *J. biol. Chem.* 218 (1956) 77.
- 70.- Creutzfeldt, W.: *Dtsch. med. Wschr.* 82 (1957) 1588.
- 71.- Sobel, G.W., J. Rodriguez-Iñigo y W. Morton; R. Levine: *Metabolism* 7 (1958) 222.
- 72.- Frawley, T.F., T.F. Shelley, J.W. Runyan, E.J. Margulies y J.J. Cincotti: *Am. N.Y. Ac. Sc.* 82 (1959) 460.
- 73.- Suedhof, H., W. Eger, S. Altenburg y G. Schumacher: *Arzneimittel Frschg.* 7a (1958).
- 74.- Garattini, S., R. Pauletti y L. Tessari: *Arzneimittel Frschg.* 7a (1958).
- 75.- Renold, A.E., A.I. Winegrad, E.R. Froesch y G.W. Thorn: *Metabolism* 5 (1956) 757.
- 76.- Hennes, A.R., B.L. Wajchenberg, S.S. Fajans y J.W. Conn: *Metabolism* 6 (1957) 63.
- 77.- Segal, S., T.F. Frawley y J. Foley: *Diabetes* 6 (1957) 422.
- 78.- Larizza, P., F. Grignani y P. Brunetti: *Minerva Med.* 49 (1958) 631.
- 79.- D'Amico, G., G. Galansino y P.P. Foa: *Endocr.* 36 (1958) 219.
- 80.- Galansino, G., G. D'Amico, D. Kanameishi y P.P. Foa: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 99 (1958) 447.
- 81.- Galansino, G., D. Kanameishi, F.G. Bulinger y P.P. Foa: *Metabolism* 8 (1959) 587.
- 82.- Steigerwald, H., E. Boehle, K. Schoeffling y E.F. Pfeiffer: *Dtsch. med. Wschr.* 82 (1957) 1554.
- 83.- Boeck, J., A. Lindner y H. Obenaus. *Wien. klin. Wschr.* 70 (1958) 644.
- 84.- Butterfield, J., K. Fry y E. Holling. *Diabetes* 7 (1958) 449.
- 85.- Madison, L.L., y H.U. Unger: *Metabolism* 7 (1958) 227.
- 86.- Davis, J.C.: *J. Path. Bact.* 64 (1952) 575.
- 87.- Frank, E., M. Nothmann y A. Wagner: *Klin. Wschr.* 5 (1926) 2100.
- 88.- Read, W.<sup>o</sup> y J.H. Fodden: *Metabolism* 3 (1954) 456.
- 89.- Staub, H.: *Z. klin. Med.* 107 (1928) 607.
- 90.- Bodo, R. y H.P. Marks: *J. Physiol.* 65 (1928) 83.
- 91.- Hollunger, G.: *Actapharm. Toxicol.* 11 suppl. 1 (1955) 1.
- 92.- Williams, R.H., Tyberghein, J.M., P.M. Hyde y R.L. Nielsen: *Metabolism* 6 (1957) 311.
- 93.- Williams, R.H., D.C. Tanner y W.D. Odell: *Diabetes* 7 (1958) 8
- 94.- Tyberghein, J.M. y R.H. Williams: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 96 (1957) 29.
- 95.- Steiner, D.F. y R.H. Williams: *Clin. Res. Proc.* 6 (1958) 55.
- 96.- Nielsen, R.L., H.E. Swanson, D.C. Tanner, R.H. Williams y M.O. Connell: *Aech. intern. Med.* 101 (1958) 211.
- 97.- Williams, R.H.: *Diabetes*. Hoeber, New York, 1959.

- 98.-Steiner,D.F., J.M.Tyberghein y R.H.Williams:  
Biochim. et Biophys.Acta 30 (1958) 329.
- 99.-Kroneberg,G. y K. StoepeI:Arzneimittel Frschg.7a(1958).
- 100.-Mueller,H. y H.Reinwein: Arch.exp.Path.Pharmakol.  
125 (1927) 212.
- 101.-Wick,A.N., E.R.Larson y G.S.Serif.  
J.biol. Chem. 233 (1958) 296.
- 102.-Fajans,S.S., J.A.Moorhouse, H.Doorenbos, L.H.Louis y  
J.W.Conn: Clin.Res. 6 (1958) 252.
- 103.-Pomeranze,J., H.Fujiy y G.T.Mouratoff:  
Proc.Soc. Exper.Biol.Med. 95 (1957) 193.
- 104.-Odel,W.D., D.C.Tanner, D.F.Steiner y R.H.Williams:  
Arch.Int.Med. 102 (1958) 520.
- 105.-Krall,L.P. y R.Camerini-Davalos:Arch: Int.Med.102(1957)22
- 106.-Mehnert,H. y W.Seitz: Münch.med.Wschr. 47 (1958) 1849.
- 107.-Beringer,A.: Wien.med.Wschr. 43 (1958) 880.
- 108.-Krall,L.P.: Ann.N.Y.Ac.Sc. 82 (1959) 603.
- 109.-Mehnert,H. y L.P.Krall: Dtsch.med.Wschr. 85 (1960) 577.
- 110.-Hagedorn,H.E. y B.N. Jensen:Biochem.Z. 185 (1923) 46.
- 111.-Warburg,O. y W.Christian: Biochem.Z. 286 (1937) 81.
- 112.-Seifter,S., S.Dayton, B.Novic y E.Muntwyler:  
Arch.Biochem. 25 (1950) 191.
- 113.-Moorhouse,J.A. y R.M.Kark:Metabolism 5 (1956) 847.
- 114.-Cori,C.F. y G.T.Cori: Biochem.Z. 206 (1929) 39.
- 115.- J.biol.Chem. 85 (1929) 275.
- 116.- Ungar,G. En prensa.
- 117.- Weber,G. y A.Cantero: Metabolism 7 (1958) 333.
- 118.- Summ,H.D., W.Creutzfeldt y K.Wallenfells:  
Klin. Wschr. 38 (1960) 85.
- 119.- Russel, J.A. Giba Foundation. London 1953.

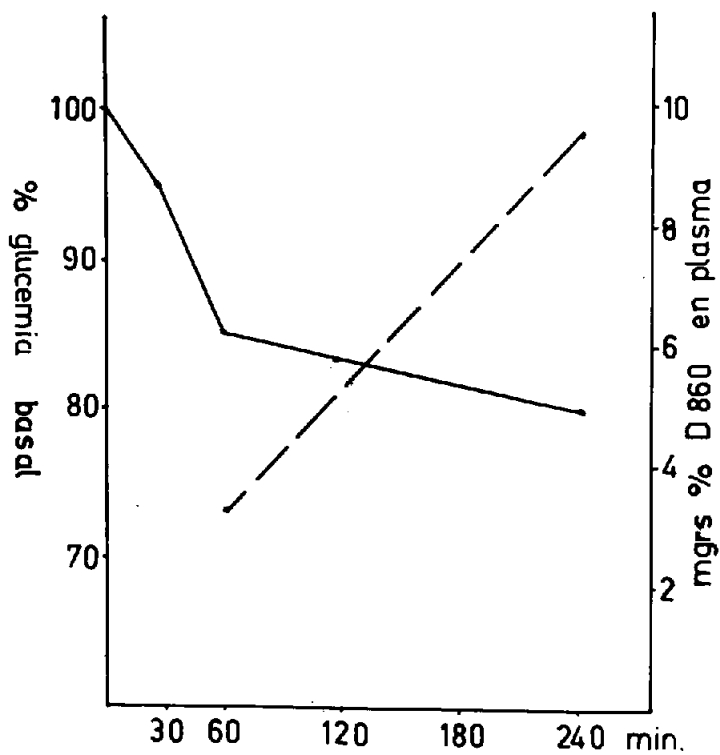


Fig. 1a

DIABETES  
SENIL

DIABETES  
JUVENIL

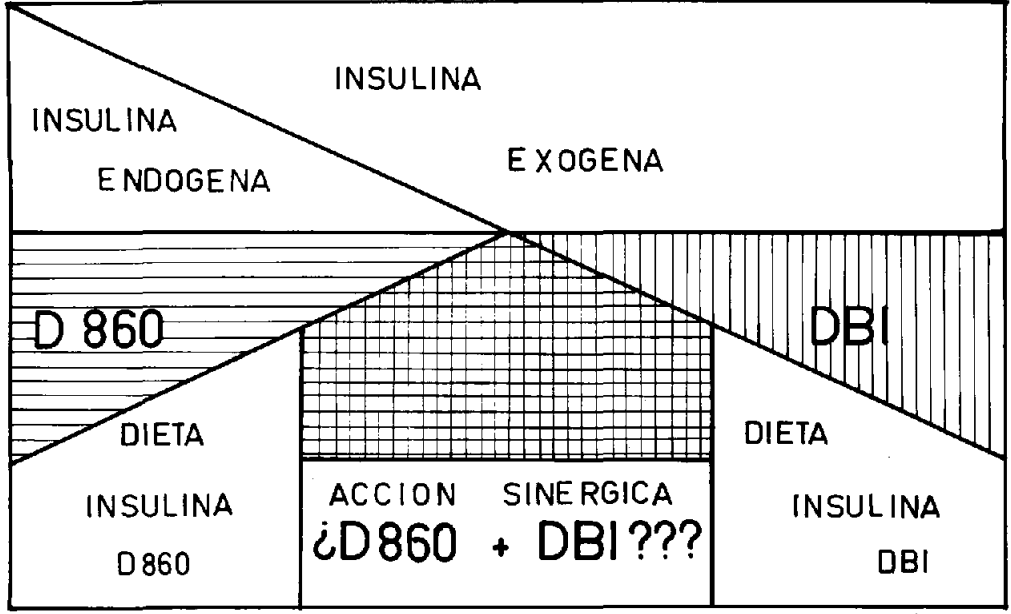
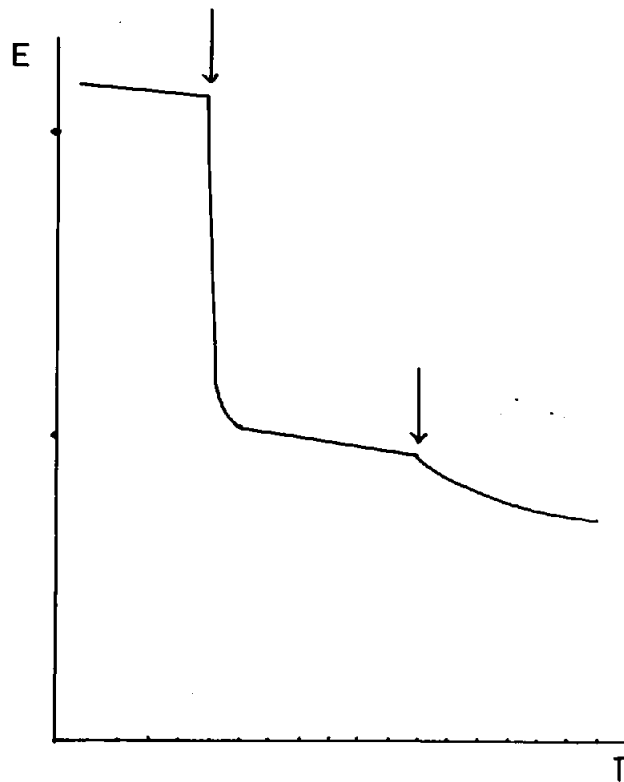


Fig. 2a



**Fig. 30**



# EFFECTO SOBRE LA GLUCEMIA

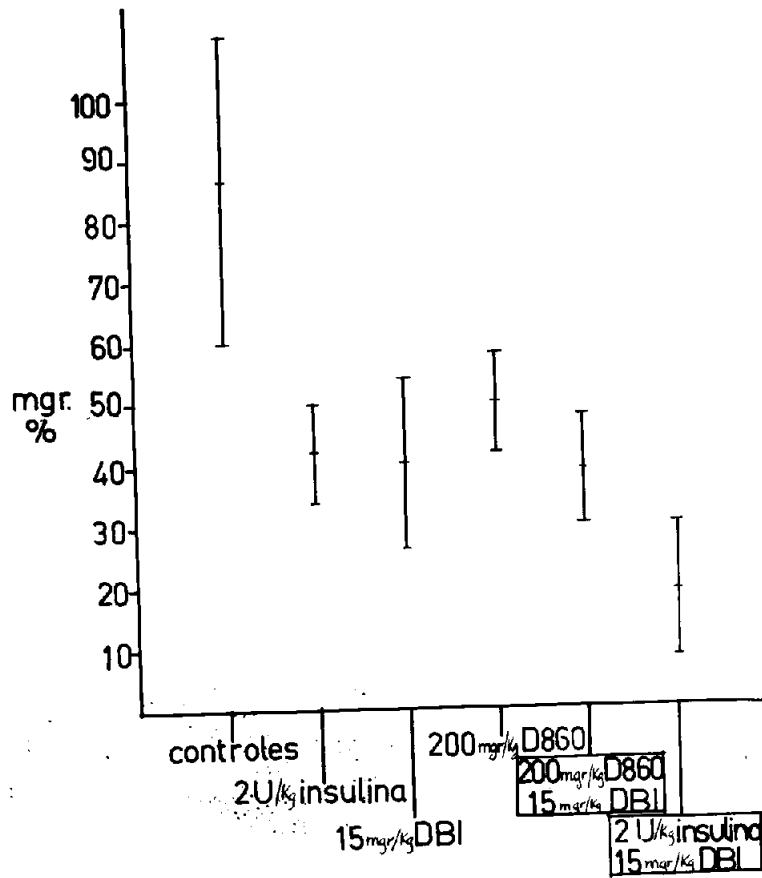


Fig. 4a

EFFECTO SOBRE LA CONCENTRACION  
sanguinea DE ac. LACTICO

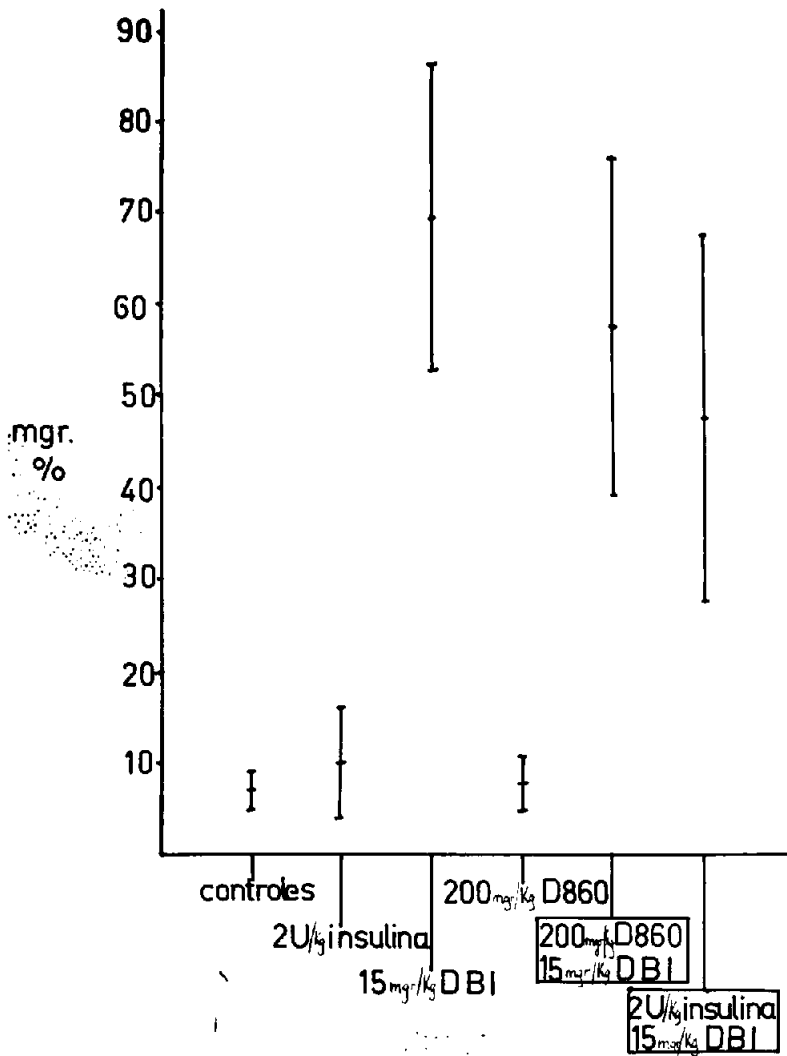


Fig. 5a

EFFECTO SOBRE LA CONCENTRACION  
sanguinea DE ac. PIRUVICO

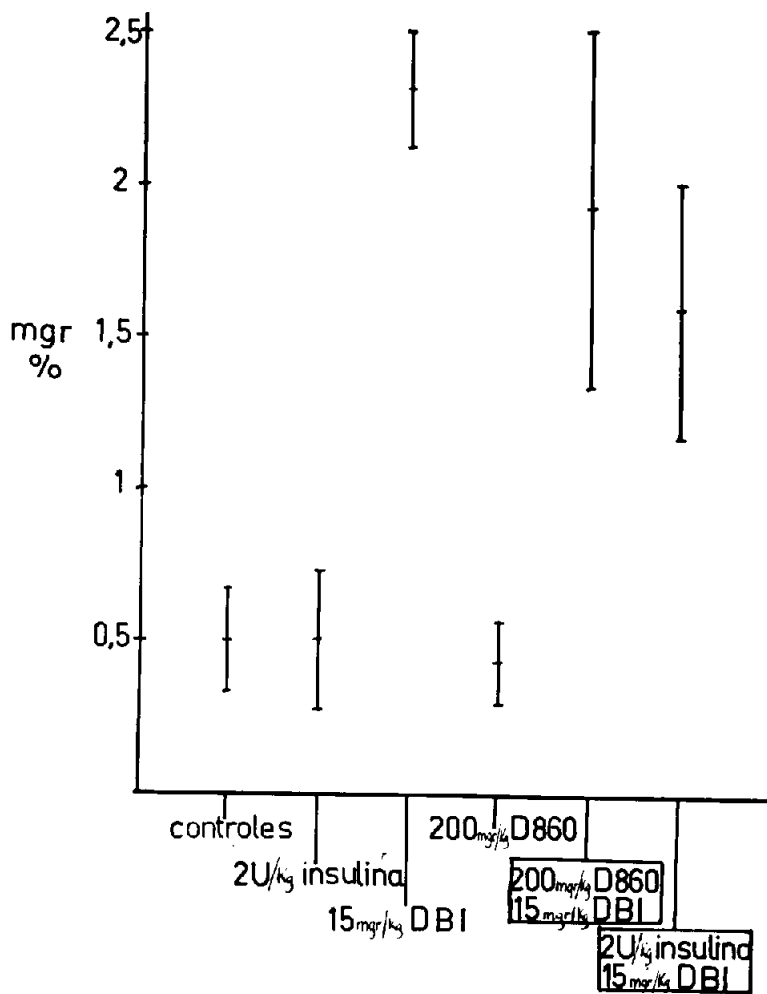


Fig. 6<sup>a</sup>

EFFECTO SOBRE LA CONCENTRACION  
sanguinea DE ac.  $\alpha$ -CETOGLUTARICO

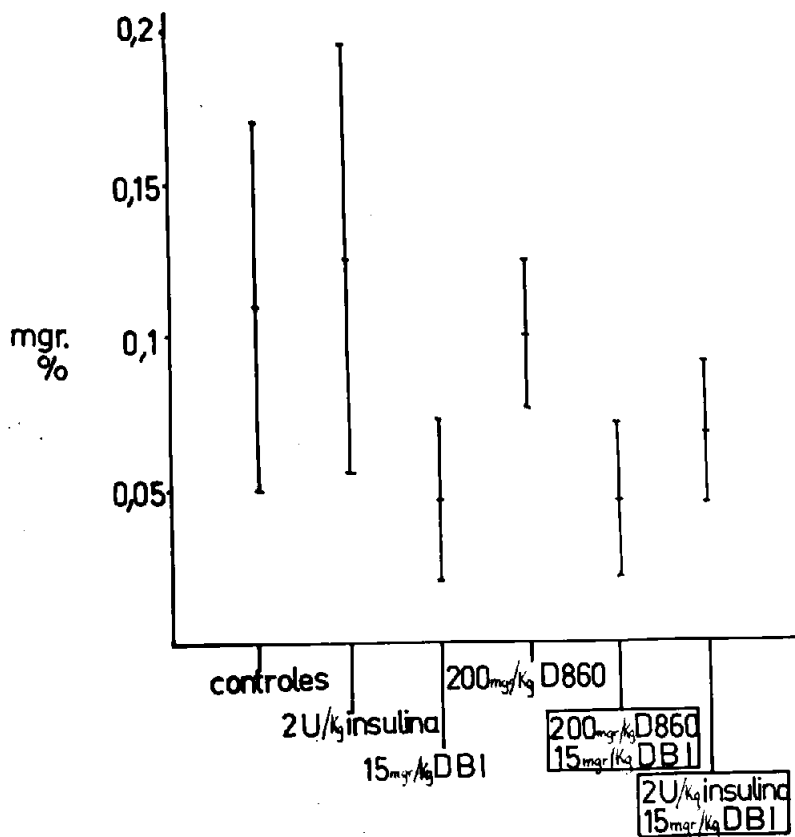


Fig. 7a

EFFECTO SOBRE LA CONCENTRACION DE GLUCOGENO HEPATICO

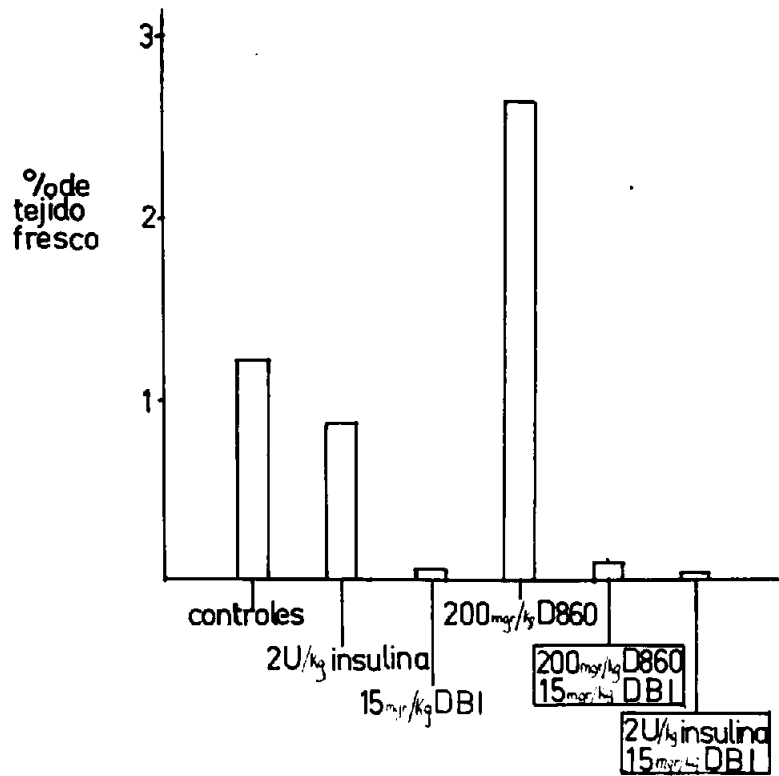


Fig. 8a