

## Estudio del metabolismo intermediario en la diabetes experimental<sup>4</sup>

EMILIO HERRERA CASTILLÓN, *Cátedra de Fisiología General, Facultad de Ciencias, Universidad de Barcelona*

### *Metabolismo hepático*

El hígado constituye el centro del metabolismo intermediario, jugando un papel principal en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en el organismo y su interrelación con los metabolismos proteico y lipídico. Como se esquematiza en la figura 1, la glucosa sanguínea procedente de la absorción gastro-intestinal o de su síntesis en el mismo hígado a partir de sustratos gluconeogénéticos (en su mayor parte aminoácidos derivados del catabolismo proteico), puede ser fosforilada en los hepatocitos para su posterior acúmulo, en forma de glucógeno o su degradación por la vía glicolítica. A través de la glicolisis, la glucosa puede dar lugar, por un lado a glicero-fosfato, que es sustrato para la síntesis de triglicéridos, y por el otro lado, a acetil-CoA.

El acetil-CoA puede formarse también como producto de la  $\beta$  oxidación de los ácidos grasos, y tiene a su vez tres vías principales de transformación. En primer lugar, puede acoplarse con oxaloacetato para sintetizar citrato, y de esta forma oxidarse a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. En este proceso se desprende  $\text{CO}_2$  y es netamente exergónico. La energía liberada es parcialmente aprovechada para la formación de ATP en la oxidación isostereométrica. En segundo lugar, acetil-CoA es sustrato para la cetogénesis, de tal forma que puede transformarse en cuerpos cetónicos y de esta forma salir a la sangre para su consumo en otros tejidos. Por último, el acetil-CoA es el principal sustrato de la lipogénesis, la cual termina en la formación de los derivados acilados del CoA (acil-CoA), que pueden esterificarse con el glicerofosfato para la síntesis de triglicéridos.

Tanto acil-CoA como glicerofosfato, pueden llegar al hígado procedentes de la sangre. Aunque pueden haberse absorbido como tales por el tracto

<sup>4</sup> El presente trabajo se ha realizado con la colaboración de los Dres. A. A. ARANDA, E. BLÁZQUEZ, M. CASTRO, J. M. CHAVES, M. C. DOMÍNGUEZ, N. FREINKEL, R. H. KNOPP, M. LOBERA, E. MONTÓYA, R. SANDLER y M. J. SEIBEL, a todos los cuales deseo expresar mi más sincero agradecimiento.

## METABOLISMO HEPÁTICO

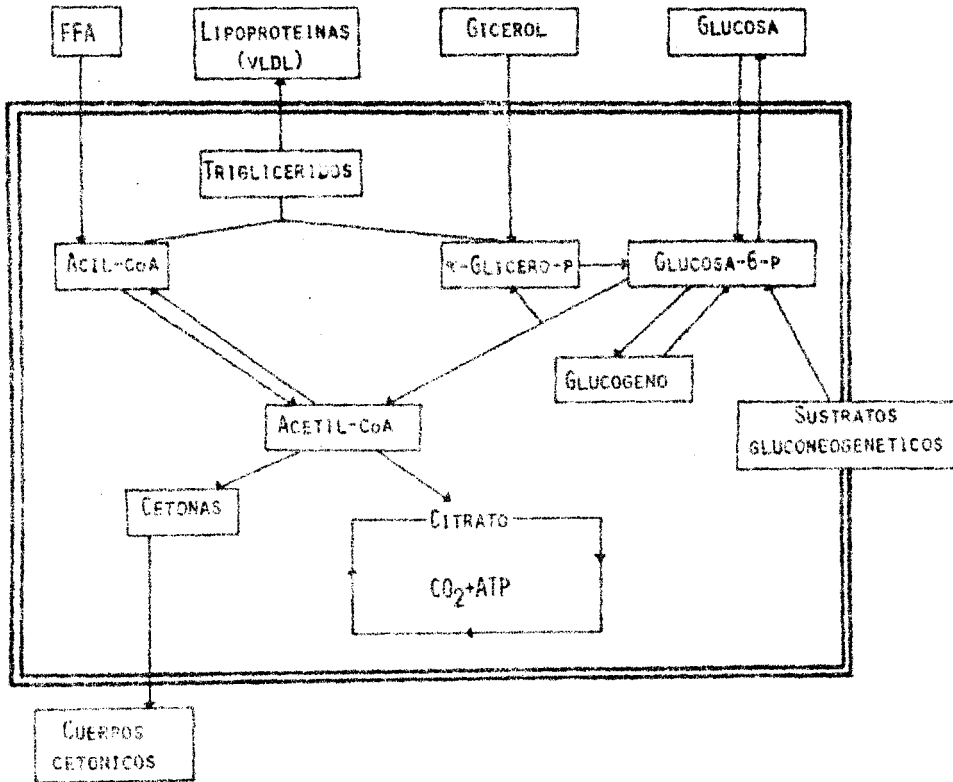


Figura 1.

gastro intestinal, en su mayor parte derivan del tejido adiposo como resultado de la lipólisis catalizada por la lipasa sensible a las hormonas.

La capacidad del hígado para acumular triglicéridos es limitada y, en su mayor parte, son acoplados con proteínas y pequeñas cantidades de colesterol y fosfolípidos, saliendo a la sangre en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).

### *Alteraciones metabólicas en hiper e hipo-insulinismo*

Las reacciones que participan en el metabolismo hepático están reguladas por numerosos factores. Entre ellos podemos citar la concentración y la actividad de los enzimas que las catalizan, la asequibilidad de sustrato, la

METABOLISMO HEPATICO EN HIPER-INSULINISMO

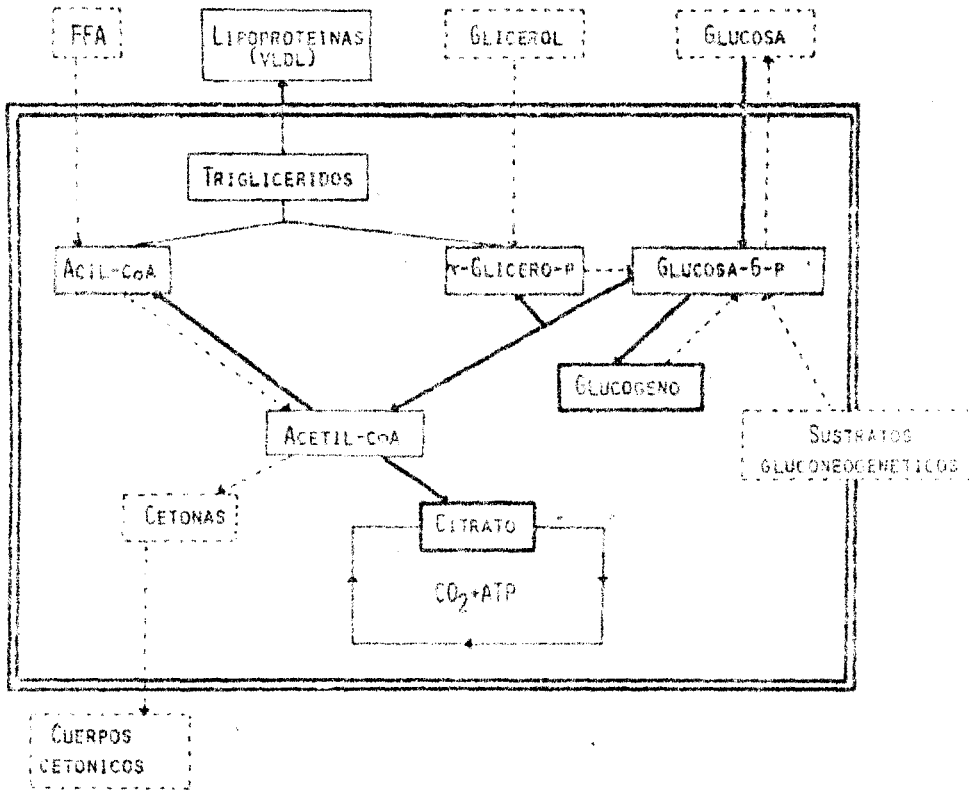


Figura 2.

compartimentación celular, etc. De forma más o menos directa, numerosas hormonas modulan también las interrelaciones mutuas de las distintas vías metabólicas que tienen lugar en el hígado.

La insulina es especialmente potente, regulando los mencionados procesos. De forma general, podemos indicar que el hiperinsulinismo (Fig. 2) produce una inhibición de las vías que llevan a la producción de glucosa por el hígado: gluconeogénesis y glucogenólisis. En esta situación hay, sin embargo, un aumento de la captación, acúmulo y metabolización de la glucosa en este órgano, que se manifiesta por una mayor concentración de glucógeno y una más activa glicólisis. Esta yuxtaposición de efectos repercute en una inhibición de la producción neta de glucosa hepática a la sangre. Otra de las manifestaciones que se observan cuando los niveles de insulina en sangre son elevados es el aumento de la concentración hepática de citrato

### METABOLISMO HEPATICO EN HIPO-INSULINISMO

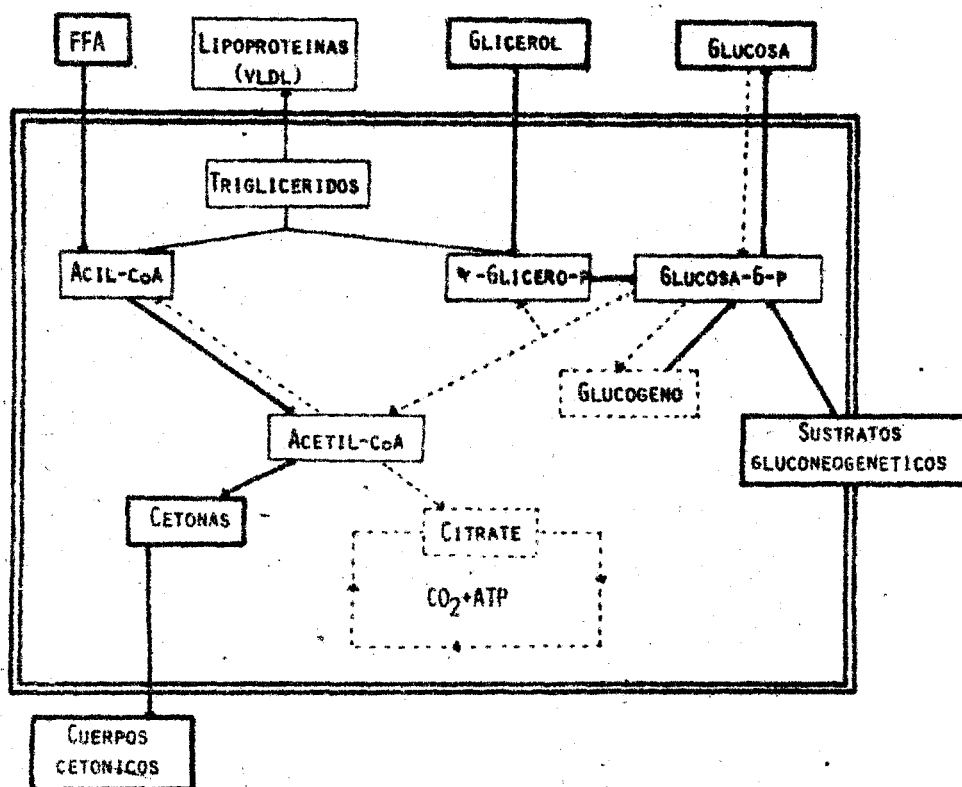


Figura 3.

concomitante con una activación de la lipogénesis y una inhibición de la cetogénesis y de la oxidación de ácidos grasos.

Esta mayor producción de sustratos para la síntesis de triglicéridos es compensada por la disminuida llegada de ácidos grasos y glicerol al hígado en el hiper-insulinismo, ya que es bien conocido el efecto antilipolítico de esta hormona. Como resultado de esta mezcla de alteraciones metabólicas, la producción de lipoproteínas hepáticas puede ser normal, ya que la aumentada lipogénesis es compensada por la inhibida movilización de los depósitos grasos extrapancreáticos.

Es lógico prever que en el hipoinulinismo, las alteraciones metabólicas en el hígado sean las opuestas a las anteriormente indicadas (fig. 3). De hecho, la activación de la gluconeogénesis y de la glucogenólisis hepáticas sabemos que participan en la hiperglucemia del diabético. En este caso, el

aporte de glucosa por el hígado a la sangre es netamente positiva, lo que es potenciado por una inhibición de la actividad glicolítica de los hepatocitos. La falta de insulina o su inactividad hormonal hacen desaparecer los efectos antilipolíticos de la hormona, por lo que la movilización de los glicéridos extrahepáticos y la llegada de ácidos grasos y glicerol al hígado es intensa. Los ácidos grasos son degradados a acetil-CoA, que es preferentemente utilizado para la síntesis de cuerpos cetónicos, mientras que el glicerol es utilizado como otro sustrato gluconeogénico.

### *Planteamiento experimental*

El cuadro metabólico general que hemos presentado para el hipo-insulinismo nos pone de manifiesto las principales alteraciones que se observan en la forma típica de diabetes primaria. Sin embargo, hay numerosos factores que afectan este cuadro y, de hecho, no siempre se observan todas y cada una de estas manifestaciones en el individuo diabético.

Existen mecanismos patogénicos que inducen a distintos tipos de diabetes o que predisponen al desarrollo de la diabetes. Estos mecanismos son muy diversos y entre ellos podemos citar el hipo-insulinismo primario, la alimentación, la obesidad, la insensibilidad a la insulina y las alteraciones endocrinas extrapancreáticas. Para determinar las alteraciones metabólicas que se presentan en estas condiciones es importante disponer de modelos experimentales en los que se reproduzcan en animales del laboratorio las características diabetogénicas que se dan en humanos. Nosotros hemos relacionado y estudiado un modelo experimental para cada uno de los mecanismos patogénicos, con la esperanza de aportar datos originales que ayuden a comprender las alteraciones metabólicas del diabético.

### *Estudios realizados con el estreptozotocín.*

La forma más simple de hipoinsulinismo primario puede conseguirse destruyendo específicamente las células  $\beta$  del páncreas endocrino. Con esta finalidad, nosotros hemos utilizado el estreptozotocín, que es una N-nitrosurea de la glucosamina. Esta droga ejerce su acción citotóxica sobre las células  $\beta$ pancreáticas (1, 2), dejando intactas las células  $\alpha$  y el páncreas exocrino (3, 4).

Como ya hemos publicado con anterioridad (5), tres días después de la administración de una inyección de estreptozotocín (65 mg./Kg.), las ratas presentan hiperglucemia, hipercetonemia e hipoinsulinemia. Los pesos corporales y del hígado disminuyen en los animales tratados con la droga, mientras que las concentraciones hepáticas de-DNA, fosfolípidos, proteínas y acetil-CoA aumentan en los mismos animales. Las concentraciones de glucógeno y ácido cítrico en el hígado son inferiores en las ratas a estreptozotocín que en controles que no recibieron la droga. Estas diferencias en todos los parámetros indicados entre los dos grupos disminuyen con el ayuno debido a una falta de respuesta en los animales tratados con la droga.

Con la finalidad de conocer los cambios metabólicos globales que ocurren en el animal in vivo durante esta transición al ayuno, determinamos la excreción urinaria de urea y amoníaco, como índices del catabolismo proteico, y de cuerpos cetónicos, como reflejo de la oxidación de los ácidos grasos. Como se observa en las figuras 4, 5 y 6, estos tres parámetros, amoníaco, urea y cuerpos cetónicos, aumentan considerablemente en la orina de los animales tratados con el estreptozotocín, cuando alimentados. En ayunas desaparecen estas diferencias entre los animales experimentales y sus respectivos controles, como resultado de una mayor disminución en la concentración de estos compuestos en la orina del primer grupo.

### EXCRECIÓN URINARIA DE AMONIACO EN RATAS HECHAS DIABETICAS CON ESTREPTOZOTOCIN

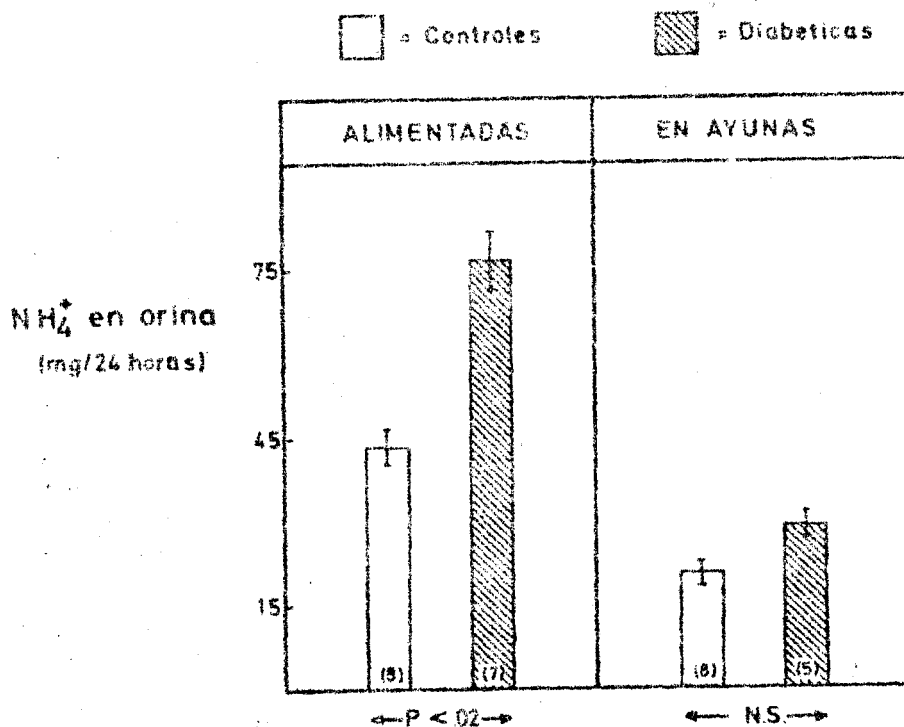


Figura 4.

## EXCRECIÓN URINARIA DE UREA EN RATAS HECHAS DIABÉTICAS CON ESTREPTOZOTOCIN

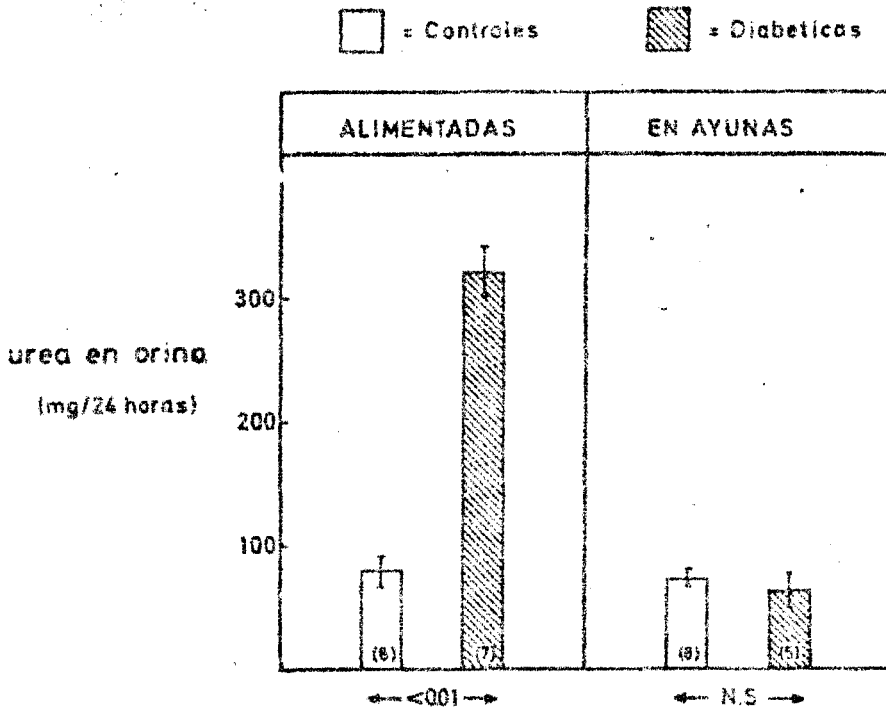


Figura 5.

En conjunto, todos estos resultados pueden relacionarse directamente con la incapacidad de los animales tratados con la droga para mantener una elevada secreción de insulina en situación postprandial, lo que les impide una respuesta al ayuno normal, no solamente en lo referente a la secreción de insulina, sino también en todos los parámetros metabólicos dependientes de esta hormona.

### *Diabetogénesis con dieta grasa*

Como hemos indicado anteriormente la alimentación puede influir sustancialmente en la patogénesis de la diabetes. Especial interés a este respecto tiene una abundancia de grasas en la dieta.

## EXCRECION URINARIA DE CUERPOS CETONICOS EN RATAS HECHAS DIABETICAS CON ESTREPTOZOTOCIN

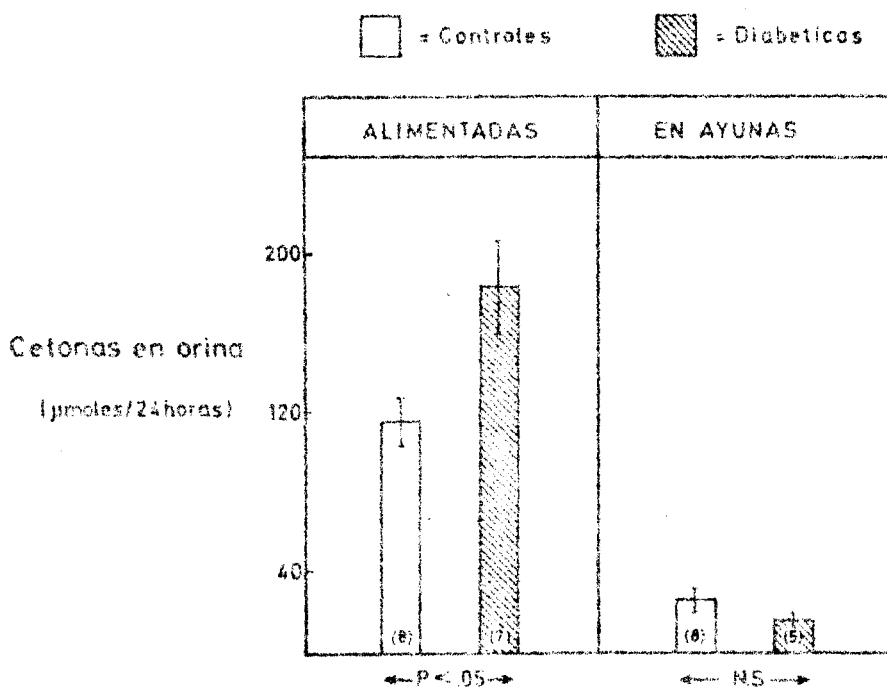


Figura 6.

Con la finalidad de estudiar experimentalmente los factores diabetogénicos de la dieta rica en grasa, comparamos ratas sometidas a una dieta con un 45 % de aceite mineral, con animales controles alimentados con la dieta normal del laboratorio, cuyo contenido en grasas no excede del 4%. Los resultados obtenidos los hemos publicado anteriormente (6 y 7). Tras 18 horas de ayuno, la tolerancia a la glucosa aparece significativamente disminuida en las ratas a dieta grasa con relación a sus controles, lo que demuestra la situación diabetogénica de estos animales.

La formación de glucosa- $C^{14}$  a partir de alanina- $U-C^{14}$  por cortes de hígado incubados *in vitro* es superior en los animales a dieta grasa que en sus controles, mientras que la formación de ácido láctico- $C^{14}$ , ácido pirúvico- $C^{14}$  y  $C^{14}O_2$  varía de forma opuesta entre ambos grupos. Tras un ayuno de 48 horas, los animales controles presentan una mayor actividad gluconeogé-



lica que cuando alimentados, mientras que en las ratas a dieta grasa la actividad de esta vía metabólica no varía con el ayuno, de tal forma que desaparecen las diferencias entre ambos grupos.

Estos resultados se acompañan de una disminución de la secreción *in vitro* de insulina, y una menor concentración de insulina plasmática en las ratas a dieta grasa. La deficiencia insulínica en estos animales es evidente que puede participar de forma activa en un máximo aumento de la gluconeogénesis hepática en el animal alimentado, de tal forma que un posterior aumento con el ayuno no sea posible.

### *La obesidad como factor diabetogénico*

Ya hemos visto que un aumento en la cantidad de grasas que llegan al organismo de fuentes exógenas, desencadena un cuadro diabético. La abundancia de grasas endógenas pueden repercutir en una manifestación similar. De hecho, la diabetes y la obesidad son dos manifestaciones que aparecen juntas, tanto en humanos (8) como en animales experimentales (9).

Con la finalidad de estudiar algunos aspectos del metabolismo intermedio en animales obesos y diabéticos, utilizamos los ratones ob/ob del Jackson Memorial Laboratory. En estos animales, en la misma camada aparecen ratones homocigóticos que manifiestan el carácter recesivo de la obesidad y la hiperglucemia y ratones heterocigóticos, normales de tamaño y glucosa plasmática.

Tanto en los ratones obesos e hiperglucémicos (ob/ob) como en los controles normales, determinamos las variaciones metabólicas que se presentaban en el ayuno prolongado. Los resultados obtenidos se han publicado previamente (10), y pueden resumirse de la forma siguiente:

En los ratones controles, la celularidad hepática se preserva con el ayuno, mientras que las concentraciones de glucógeno, agua, proteínas, fosfolípidos y ácido cítrico por hepatocito disminuyen significativamente. Acetil-CoA varía de forma bifásica, aumentando con un ayuno de 6 horas, y disminuyendo tras un ayuno más prolongado. La concentración de ácidos grasos esterificados por hepatocito aumenta progresivamente hasta las 72 horas de ayuno. En los hígados de los ratones ob/ob hay hipertrofia e hiperplasia, y la mayoría de los componentes estudiados se encuentran aumentados con relación a los controles respectivos. Sin embargo, las concentraciones de ácidos grasos esterificados, y de acetil-CoA por hepatocito, disminuyen progresivamente con el ayuno. La glucosa sanguínea en los ratones obesos es superior que en los controles, mientras que los cuerpos cetónicos en sangre están aumentados en los primeros solamente, cuando alimentados.

Los resultados obtenidos permiten sugerir que la movilización de grasas con el ayuno en los ratones normales es muy superior a la de los obesos. Los cambios en el hígado de los ratones obesos en ayunas parecen reflejar una "insulinización" hepática. De hecho, el cuadro metabólico que se presenta en estos animales es similar al que aparece en la rata preñada (11), donde también se presenta una hiperinsulinización hepática, así como una hiperglucemia (12) acompañados de una aumentada resistencia a la insulina (13).

### Alteraciones metabólicas en el embarazo

En el embarazo, la madre se encuentra de nuevo con un activo parásito, el feto, que se diferencia, crece y finalmente es expulsado después de un período definido de tiempo. El anabolismo fetal se realiza a expensas de la madre, la cual ha de compensar la continua succión de materiales nutritivos por el feto, comiendo más. La propia madre se aprovecha de esta situación y, de hecho, la ganancia de peso materno es mayor que la que podría achacarse al simple crecimiento intrauterino (14, 15, 16).

Con la finalidad de determinar las adaptaciones metabólicas que ocurren en la madre para mantener esta situación de continuo catabolismo que permite el ininterrumpido crecimiento fetal, nosotros hemos estudiado distintos parámetros en ratas el día 19 de gestación. Como hemos ya publicado (11, 15 y 18), la rata preñada presenta hipolipemia e hipoglucemia, y

#### EFFECTO DEL EMBARAZO SOBRE LIPOLISIS Y ESTERIFICACION POR TEJIDO ADIPOSEO INCUBADO "IN VITRO" EN LA RATA.

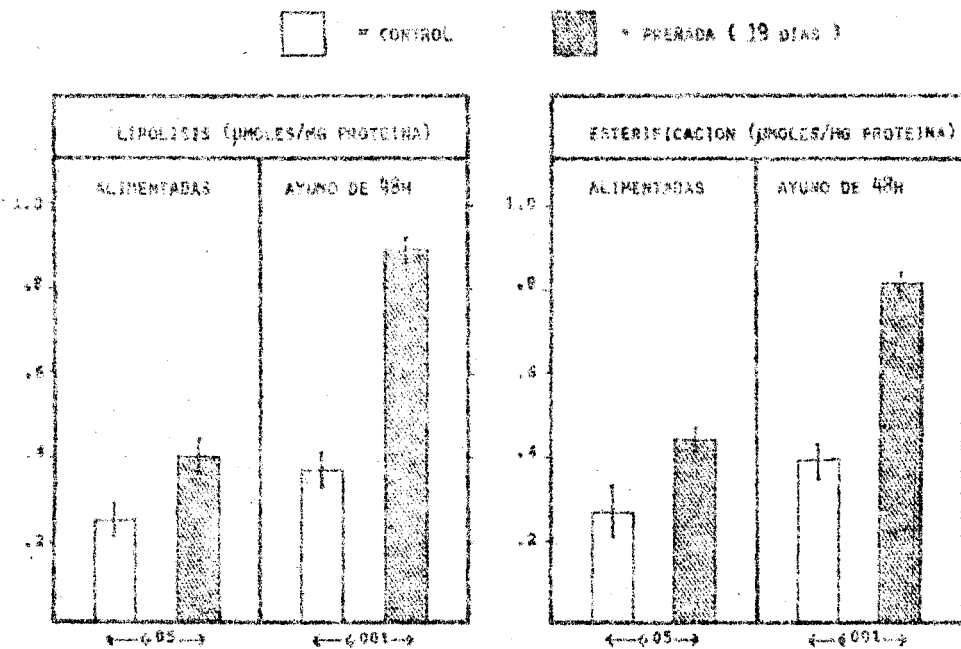


FIGURA 7.

cuales son especialmente aparentes cuando se ha sometido a un ayuno de 48 horas.

En estas condiciones, todo el metabolismo materno está dirigido hacia una máxima eficiencia. La aumentada actividad gluconeogénica y los niveles hepáticos de metabolitos (11) permiten a la madre un máximo aprovechamiento de la dieta para la formación de compuestos capaces de utilizar la placenta, como son la glucosa y los aminoácidos.

De alguna forma, este cuadro metabólico está parcialmente inducido por una activación del sistema nervioso autónomo, como lo demuestra el aumento en la excreción urinaria de catecolaminas que se presenta en las ayunas (16).

La abundancia de catecolaminas en la rata preñada influye directamente sobre la actividad metabólica del tejido adiposo en estos animales (véase la figura 7) vemos que tanto la lipólisis como la esterificación están aumentadas en el tejido adiposo de la rata preñada, y las diferencias con las de las ratas controles, vírgenes, son máximas cuando los animales se han sometido a un ayuno de 48 horas. En estas circunstancias, el efecto simpático de las catecolaminas es potenciado por la intensa hipoglucemia que presenta la rata preñada.

Todas estas alteraciones metabólicas en la rata preñada hacen pensar en un cuadro diabetogénico, a pesar de que es bien conocido el hecho de que en el embarazo hay una hiperplasia de los islotes pancreáticos (18), acompañada de un aumento en la concentración circulante de insulina (19, 20, 21). Las anteriores consideraciones nos llevaron a la posibilidad de una alterada sensibilidad a la insulina en la rata preñada. Para estudiar este punto de forma directa, administramos insulina intravenosamente a ratas preñadas y determinamos los niveles sanguíneos de glucosa a tiempos cortos del tratamiento. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 8. La respuesta a la insulina de las ratas preñadas era significativamente inferior ( $p < 0,01 - 0,001$ , en todos los casos) a la de animales vírgenes de la misma edad y sexo, y a la de las mismas ratas preñadas después del parto. La resistencia a la insulina era más intensa en las ratas preñadas en ayunas que cuando alimentadas *ad libitum* (fig. 8).

Los anteriores resultados nos confirman la situación diabetogénica en la rata preñada, la cual se normaliza después del parto. Es evidente que la aumentada resistencia a la insulina en la madre le permite un máximo catabolismo endógeno para el mantenimiento del desarrollo fetal. La repetida presencia de este cuadro diabetico en la madre debido a numerosos embarazos, puede producir alteraciones enzimáticas irreversibles y en consecuencia, el mantenimiento de la diabetes incluso después del parto.

#### *Alteraciones endocrinas extrapancreáticas como posibles inductores de diabetes experimental: hipertiroidismo*

Como han revisado recientemente Freinkel y Metzger (22), la incidencia de diabetes en hipertiroidismo en humanos es muy elevada. Nosotros pensamos en la posibilidad de lograr un cuadro diabetogénico en animales ex-

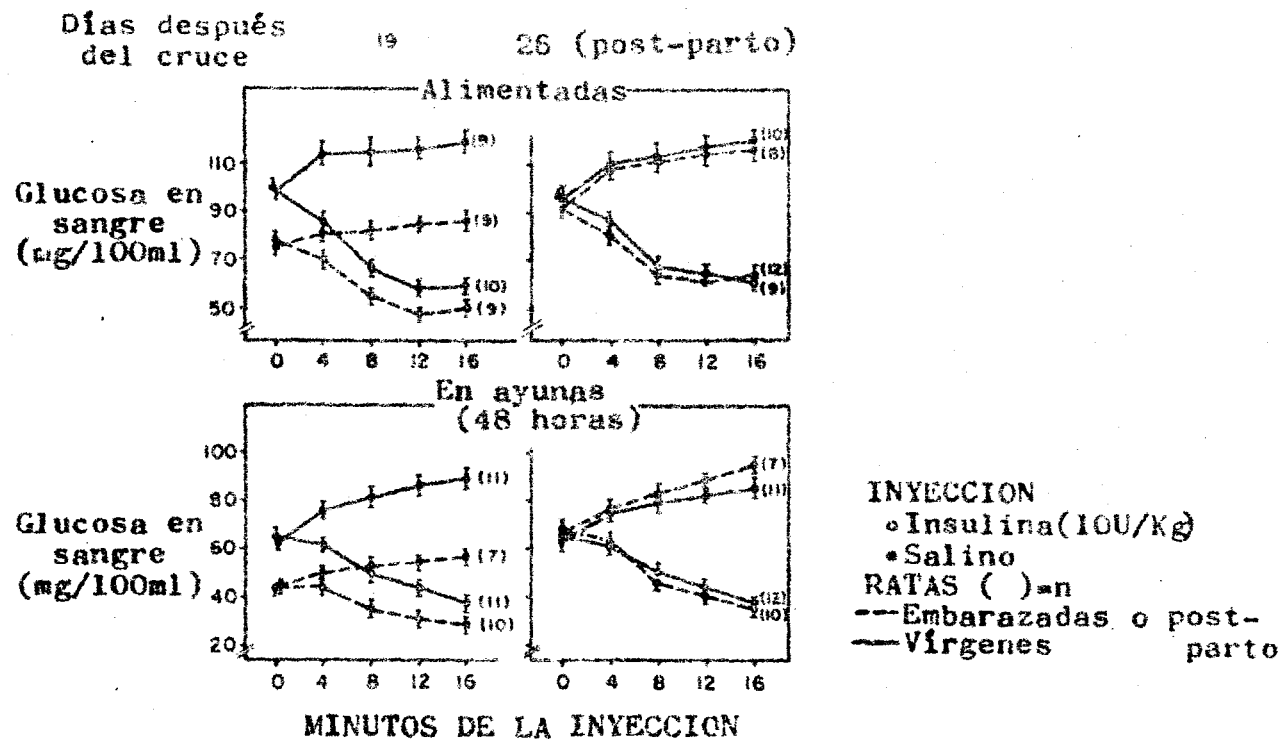


Figura 8.

Efecto de la administración intravenosa de insulina (10U/Kg. de peso) sobre los niveles sanguíneos de glucosa en la rata embarazada. La respuesta de los animales embarazados (día 19 de gestación) se comparó a la de ellos mismos después del parto (post-parto) y a la de animales vírgenes de la misma edad. Se llevaron a cabo experimentos en los que, en vez de la inyección de insulina, se les suministraba un volumen igual (0,5 ml.) de salino. Detalles de las comparaciones estadísticas entre los grupos se incluyen en el texto.

perimentales tratados con dosis altas de tiroxina exógena, y de esta forma poder estudiar los cambios metabólicos que se presentan en este tipo de diabetes.

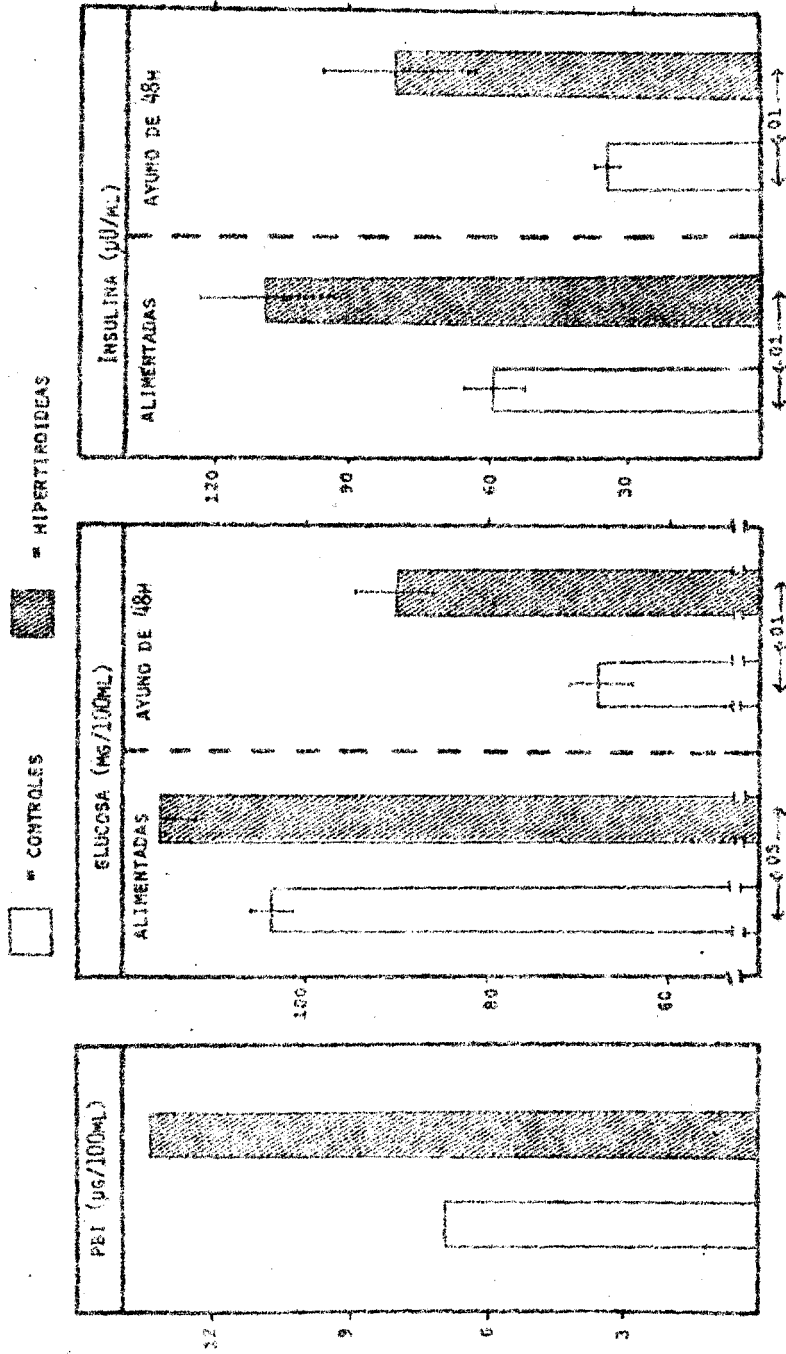
Con la finalidad de obtener un máximo control de la situación experimental, utilizamos ratas tiroidectomizadas, tratadas con 25 µg de L tiroxina (L-T4)/100 g. de peso corporal/rata/día, durante 40 días. Al final de este tratamiento los animales presentan unos niveles plasmáticos de iodo ligados a las proteínas (PBI) dos veces superiores a los de ratas intactas, de la misma edad y sexo, inyectadas con salino durante el mismo periodo de tiempo, y consideradas como controles (fig. 9). Los niveles de glucosa e insulina plasmáticos son significativamente superiores en las ratas hipertiroideas que en los controles, tanto alimentadas como tras un ayuno de 48 horas. La disminuida relación glucosa/insulina en la sangre de las ratas hipertiroideas, hace pensar en una aumentada resistencia a la insulina. A diferencia de los cambios metabólicos que se observan en los ratones obesos o en el embarazo, en el hígado de las ratas hipertiroideas se observa una intensa disminución de la concentración de glucógeno hepático, cuando alimentadas (fig. 10), acompañado de un aumento de la concentración de ácidos grasos y acetil-CoA y una disminución de la de ácido cítrico (fig. 11). Las diferencias en estos parámetros entre las ratas hipertiroideas y los controles desaparecen con el ayuno, de forma similar a lo que ocurría en los animales tratados con estreptozotocin, discutidos anteriormente.

En los animales hipertiroideos hemos estudiado también la actividad metabólica en tejido adiposo. Como puede observarse en la figura 12, tanto la velocidad de lipólisis como utilización de glicerol, se encuentran intensamente aumentadas en las ratas hipertiroideas en ayunas con relación a los animales controles. En función de los metabolitos hepáticos, esta intensa actividad del tejido adiposo en la rata hipertiroidea en ayunas es insuficiente para el mantenimiento de una elevada llegada de ácidos grasos al hígado, posiblemente como consecuencia de la falta de sustrato lipídico para movilizar. Esto no es de extrañar, ya que los animales hipertiroideos están sometidos a un continuo intercambio metabólico, con predominio del catabolismo sobre el anabolismo, de tal forma que, incluso alimentados *ad libitum*, carecen de depósitos grasos en su tejido adiposo y, en consecuencia, a pesar de una intensa actividad de los enzimas lipolíticos, no logran movilizar suficientes grasas periféricas cuando se les restringe la dieta. Esto trae como consecuencia el que la cetosis de los animales hipertiroideos en ayunas sea menos intensa que la de los controles, e incluso que la de animales hipotiroideos, como ya hemos descrito anteriormente.

### Consideraciones finales

En el presente trabajo hemos analizado cinco mecanismos típicos de la patogénesis diabética: hipoinsulinismo primario, alimentación, obesidad, insensibilidad a la insulina y alteraciones endocrinas extrapancreáticas. Con esta finalidad, hemos presentado los datos obtenidos en nuestro laboratorio con modelos experimentales que se corresponden estrechamente con

EFEECTO DEL HIPERTIROIDISMO SOBRE COMPONENTES PLASMATICOS EN LA RATA.



Nº7-11/grupo

Figura 9.

EFFECTO DEL HIPERTIROIDISMO SOBRE EL GLUCOGENO HEPATICO EN LA RATA.

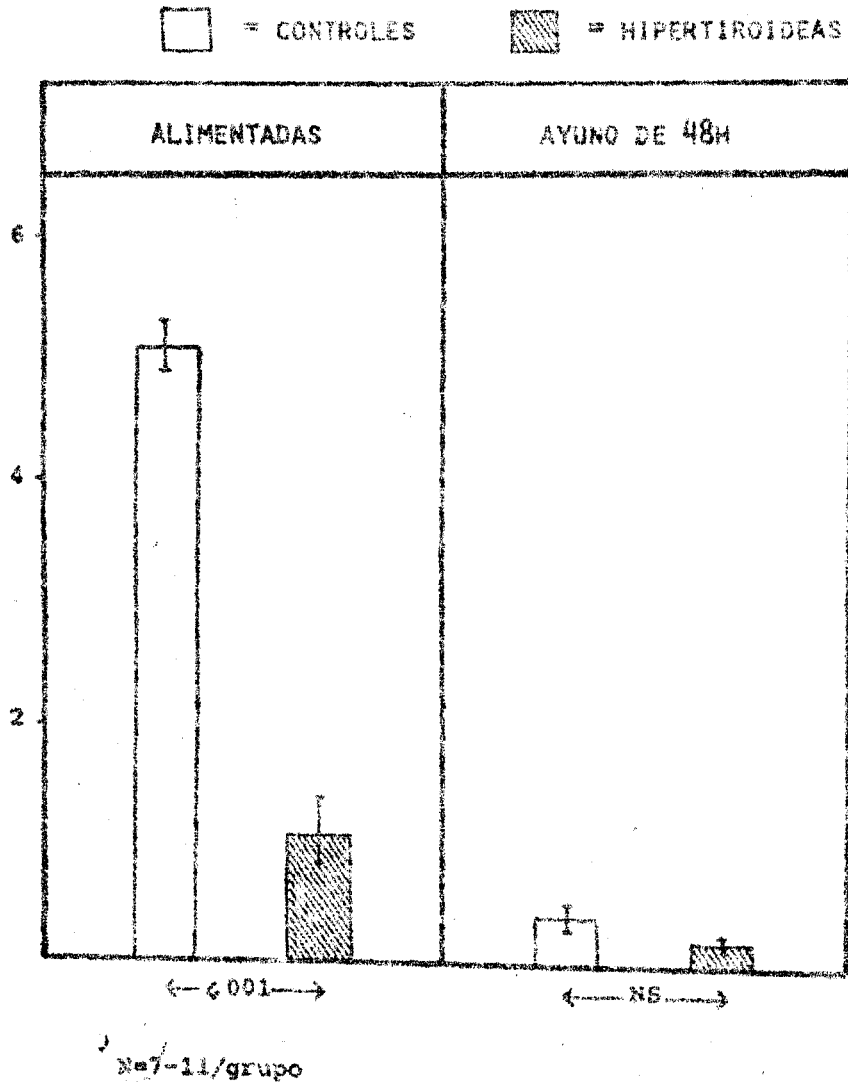


Figura 10.

EFFECTO DEL AYUNO SOBRE COMPONENTES LIPIDICOS EN RATAS HIPERTIROIDAS

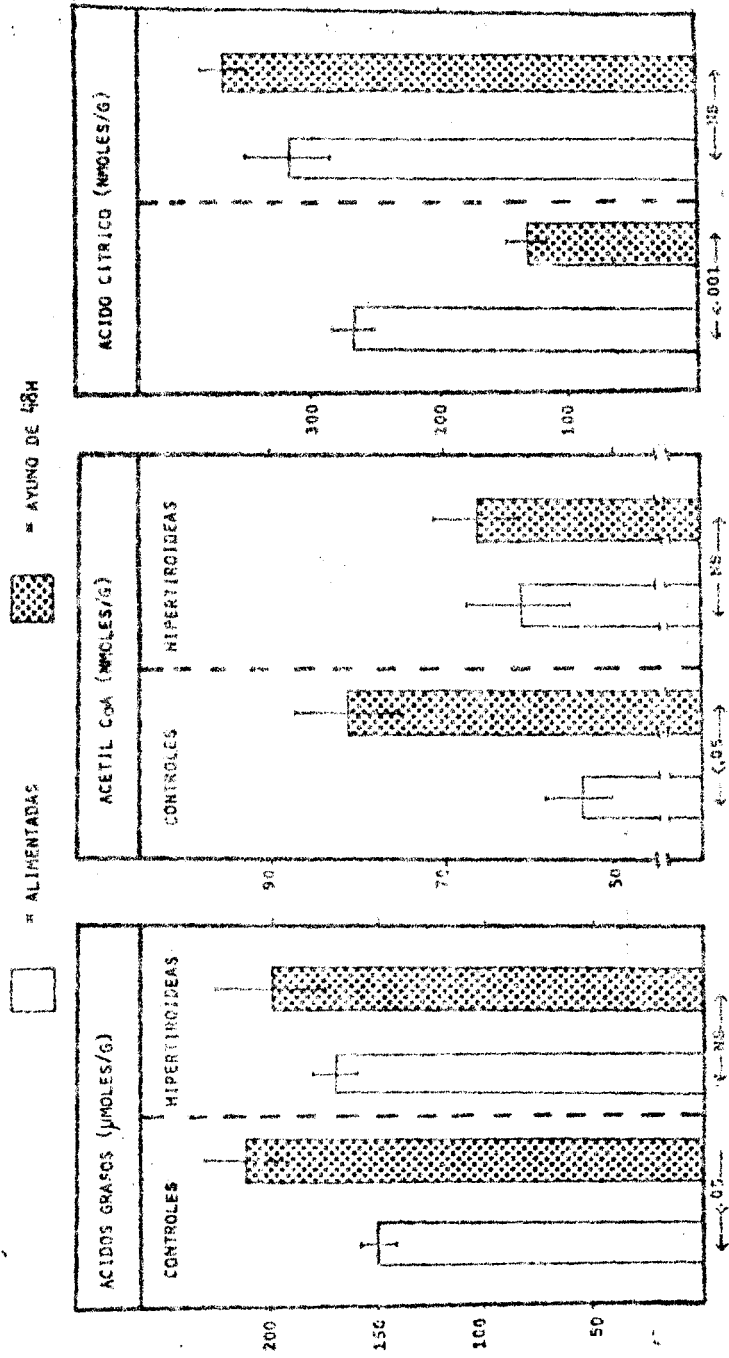


Figura 11.



EFFECTO DEL HIPERTIROIDISMO SOBRE LA ACTIVIDAD METABOLICA DEL TEJIDO ADIPOSEO  
 "IN VITRO" EN LA RATA EN AYUNAS DE 48 HORAS.

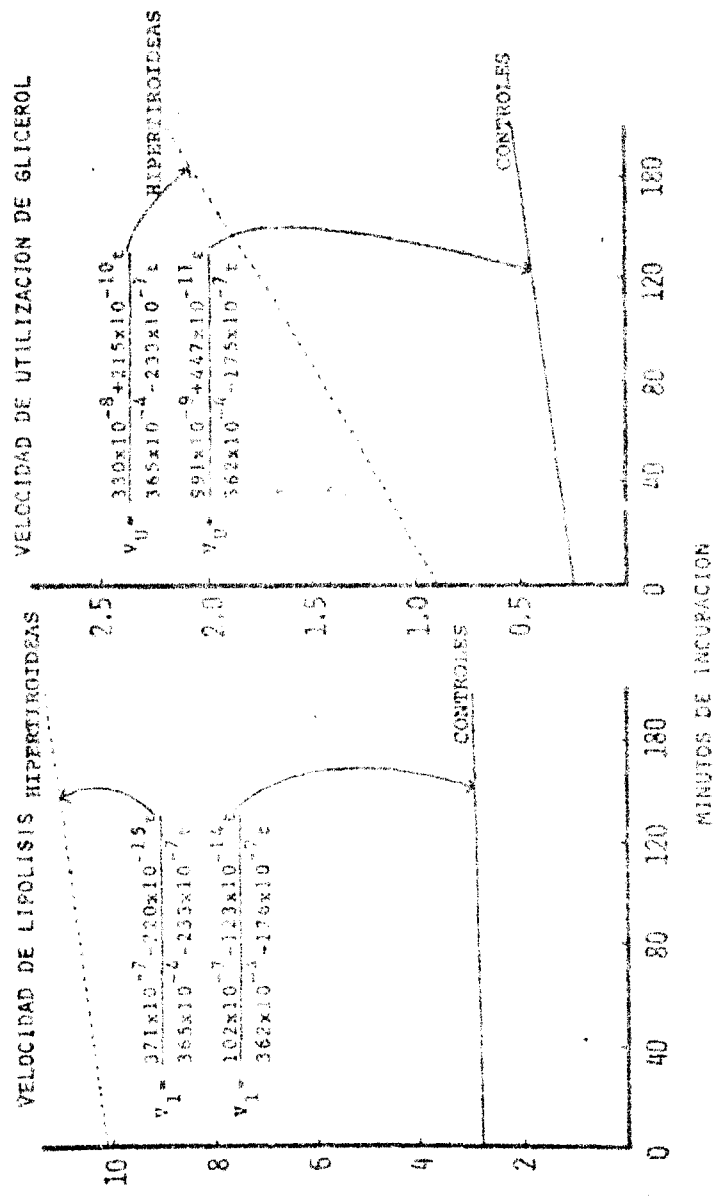


Fig. 1

dichos mecanismos: tratamiento con drogas  $\beta$ citotóxicas (estreptozotocin), dieta grasa, ratones obesos e hiperglucémicos (ob/ob), embarazo e hipertiroidismo.

Hemos podido observar que en cada una de estas situaciones aparecen cambios metabólicos que se separan del cuadro propuesto en la figura 3 para el hipo-insulinismo típico. Por otro lado, estas variaciones corresponden a algunas de las formas típicas de diabetes en humanos. Aquí hemos visto cómo de forma natural o mediante la utilización de drogas, podemos estudiar en el laboratorio modelos experimentales que presentan alteraciones metabólicas similares a las que se observan en clínica. Creemos que estos modelos experimentales pueden ser utilizados para determinar y estudiar otras distancias que acompañan a la diabetes en humanos, tales como problemas circulatorios, envejecimiento, obesidad, etc., así como para lograr un mejor conocimiento de los mecanismos de regulación de las interrelaciones hidratos de carbono y grasas.

#### REFERENCIAS

1. Pitkin, R. M. and Reynolds, W. A.: Diabetes, 19, 85, 1970.
2. Stauffacher, W., Burr, I., Gutzois, A., Beaman, D., Veleminsky, J. and Renold, A. E.: Proc. Soc. exp. Biol. Med., 133, 194, 1970.
3. Junod, A., Lambert, A. E., Orci, L., Platec, R., Goet, A. E. and Renold, A. E.: Proc. Soc. exp. Biol. Med., 126, 201, 1967.
4. Peterson, B., Hellerstrom, C. and Gunnarsson, R.: Hormone Metab. Res. 2, 313, 1970.
5. Montoya, E. and Herrera, E.: Hormones Res., 5, 29, 1974.
6. Blázquez, E., Castro, M. y Herrera, E.: Revista Esp. Fisiol., 27, 297, 1971.
7. Blázquez, E., Castro, M. y Herrera, E.: Diab. Clín. Endoc. y Nutr., 6, 41, 1971.
8. Williams, R. H.: En «Textbook of Endocrinology», Ed. por R. H. Williams, W. S. Saunders Co., 1968, pag. 613.
9. Cameron, D., Stauffacher, W. and Renold, A. E.: En «Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology, vol. 1», Ed. por R. O. Greep and E. B. Astwood, American Physiological Society, 1972, pág. 611.
10. Herrera, E., Sandler, R. and Freinkel, N.: Horm. Metab. Res., aceptado para publicación, 1974.
11. Herrera, E., Knopp, R. H. and Freinkel, N.: J. Clin. Invest., 48, 2260, 1960.
12. Scow, R. O., Chermek, S. S. and Brinley, M. S.: Am. J. Physiol., 206, 796, 1964.
13. Knopp, R. H., Ruder, H., Herrera, E. and Freinkel, N.: Acta Endocrinológica, 65, 35, 1970.
14. Foo, L. J., Lew, W. and Addis, T.: J. Biol. Chem., 128, 69, 1939.
15. Campbell, R. M., Innes, I. R. and Kosterlitz, J.: Endoc., 9, 68, 1953.
16. Herrera, E., Knopp, R. H. and Freinkel, N.: Endocrinology, 84, 447, 1969.
17. Knopp, R. H., Herrera, E. and Freinkel, N.: J. Clin. Invest., 49, 1438, 1970.

18. *Rishi, S., Golob, E. K., Becker, K. L. and Shah, M.*: *Diabetes*, 18, 268, 1969.
19. *Spellacy, W. N. and Goetz, F. C.*: *New Engl. J. Med.*, 268, 988, 1963.
20. *Kalkhoff, R., Schalch, D. S., Walker, J. L., Freck, P., Kipnis, D. M. and Durrant, W. H.*: *Trans. Ass. Amer. Physcat.*, 27, 270, 1964.
21. *Bleicher, S. J., O'Sullivan, J. B. and Freinkel, N.*: *New Engl. J. Med.* 271, 856, 1964.
22. *Freinkel, N. and Metzger, B.*: En «The Thyroids», Ed. por S. C. Werner y S. H. Ingbar, Harper and Row, Publ., 1971, pág. 574.
23. *Aranda, A., Montoya, E. and Herrera, E.*: *Biochem. J.*, 128, 597, 1972.