

FACTORES DIABETOGENICOS DE LA DIETA RICA EN GRASA*

E. BLAZQUEZ FERNANDEZ**, M. CASTRO SANTA CRUZ***, E. HERRERA CASTILLON****.

INSTITUTO G. MARAÑÓN, DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS.
MADRID.

INTRODUCCION

Una dieta con elevado contenido en grasa produce grandes alteraciones en el metabolismo hidrocarbonado y de la insulina. Concretamente, origina un descenso en los niveles plasmáticos de insulina, así como en la sensibilidad de los tejidos a esta hormona, mientras que produce un aumento de la glucosa circulante (1). Esta situación viene acompañada por una disminución de la secreción pancreática de insulina (2) y un mayor contenido de corticosteroides en las suprarrenales (3). Todo este panorama hormonal parece ser el apropiado para una activa gluconeogénesis hepática, ya que es bien conocido el efecto inhibitor de la insulina (4) y activador de los corticosteroides (5) sobre esta vía metabólica. Esta sugerencia viene apoyada al mismo tiempo por la disminuida actividad de enzimas glicolíticas, descrita por otros autores

* Trabajo que ha obtenido el premio anual "Lérida" de Investigaciones Diabéticas. Diciembre 1970.

** Doctor en Medicina. Colaborador científico del C. S. I. C.

*** Licenciado en Ciencias Químicas. Becario del Plan de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

**** Doctor en Farmacia. Profesor agregado de Fisiología animal de la Facultad de Ciencias de Madrid.

en el hígado de los animales sometidos a una dieta rica en grasa: Niemeier y colaboradores (6) han demostrado una disminución de hexokinasa, y Vaughan y colaboradores (7), de glucokinasa. De forma inversa, enzimas gluconeogénicas, tales como la glucosa-6-fosfatasa (6), aparecen aumentadas.

A pesar de estos estudios indirectos no hay datos en la literatura de la velocidad de gluconeogénesis hepática en estas condiciones experimentales, lo cual es imprescindible para completar toda esta situación metabólica.

Por la importancia que, en general, pueda tener para comprender los mecanismos de regulación de las interrelaciones de hidratos de carbono y grasas, y, en particular, para un mejor conocimiento de las influencias entre insulina-metabolismo intermediario y así contribuir a esclarecer los problemas metabólicos de la diabetes, hemos estudiado la tolerancia a la glucosa y la capacidad gluconeogénica del hígado en ratas alimentadas con una dieta de alto contenido en grasas.

MATERIAL Y METODOS

Animales.—Ratas de la raza Wistar fueron divididas desde el destete en dos grupos (A y B). El grupo A, utilizado como control, se alimentó con una dieta normal (3,8 por 100 de grasa, 49,5 por 100 de hidratos de carbono y 21,4 por 100 de proteínas). El grupo B recibió una dieta rica en grasa (Nutritional Biochemical Corporation, Estados Unidos) (45 por 100 de aceite vegetal, 29 por 100 de sacarosa y 18 por 100 de caseína libre de vitaminas). A ambos grupos se les suministró minerales y vitaminas en concentración apropiada. Las ratas se alimentaron "ad libitum" desde el destete hasta que llegaron a un peso aproximado de 150 gramos. Los animales se sacrificaron mediante decapitación sin utilizar anestesia.

Análisis del plasma.—Se recogió sangre del cuello en vasos de precipitado heparinizados y se precipitaron las proteínas del plasma con $\text{Ba}(\text{OH})_2\text{-ZnSO}_4$ (8). Se utilizaron alícuotas del plasma desproteinizado para determinar glucosa por el método de la glucosa oxidasa (9) y cuerpos cetónicos por el método descrito por Bessman y Anderson (10). La insulina plasmática se valoró por el método del radioinmunoensayo (11) con el "radioinsulin kit" de Radiochemical Centre (Amersham, Inglaterra) y utilizando insulina de rata (Novo) como patrón.

Secreción pancreática de insulina "in vitro".—Se incubaron trozos de la cola del páncreas (33-45 miligramos) en cuatro mililitros de tampón Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB), pH 7,4 (12), conteniendo glucosa (0,6 mg/ml.), albúmina (fracción V de la albúmina bovina de sigma. St. Louis, Estados Unidos) (0,5 mg/ml.), glutamato (5 mM), fumarato (5 mM) y piruvato (5 mM), en un baño-agitador Dubnoff a 37 grados centígrados (agitación de 100 ciclos por minuto) bajo O_2 y CO_2 (95 por 100 y 5 por 100) durante noventa minutos, pero con un cambio de medio cada treinta minutos. Se determinó la insulina en una mezcla equivalente de todos los medios procedentes de cada animal. La determinación de insulina se realizó por el radioinmunoensayo, como se indicó anteriormente.

Curvas de tolerancia a la glucosa.—A ratas en ayunas de dieciocho horas se les administró "per os" dos gramos de glucosa por kilogramo de peso corporal. Se obtuvieron muestras basales en animales sometidos al mismo ayuno, pero sin la administración de glucosa. Se determinó glucosa, insulina y cuerpos cetónicos plasmáticos, como se ha indicado.

Utilización de alanina-U-C¹⁴ por cortes de hígado.—Mediante un microtomo manual se obtuvieron cortes de hígado de 0,5 milímetros de espesor y fueron introducidos en KRB. Los cortes, después de secados brevemente en papel Whatman número 1, se pesaron en balanzas de torsión y se colocaron porciones de 90-120 miligramos en viales de incubación con un mililitro de KRB, conteniendo alanina-U-C¹⁴ (10⁻³M, 1 μ Ci/ml.) (Radiochemical Centre, Amersham, Inglaterra). Los viales se cubrieron con tapones de goma de los que se suspendió una capsulita de polietileno. Después de un gaseo de cinco minutos con O₂ y CO₂ (95 por 100 y 5 por 100) a través de agujas, se incubaron en un baño-agitador Dubnoff a 37 grados centígrados, durante noventa minutos, a un ritmo de agitación de 100 ciclos por minuto. Al final de la incubación se desprendió el C¹⁴O₂ formado, introduciendo 0,1 mililitros de SO₄H₂ N en el medio y el C¹⁴O₂ se recogió en 250 μ l de hidróxido de hiamina (Packard, Suiza) colocados en la capsulita de polietileno mediante una ligera agitación durante noventa minutos a la temperatura ambiente.

Determinaciones en el medio de incubación.—Los medios se centrifugaron a 3.000 revoluciones por minuto durante diez minutos, a cinco grados centígrados, para eliminar porciones sólidas, y 50 μ l de los sobrenadantes se cromatografiaron en dos sistemas: a) piridina, ácido acético, agua, alcohol isopropílico (8:1:4:8, por volumen), y b) la fase superior de n-butanol, agua, metanol y ácido fórmico (320:320:80:1, por volumen). Se realizó cromatografía ascendente en ambos medios, en tiras de papel Whatman número 3 de dos centímetros de anchura, con transportador de glucosa, ácidos láctico, pirúvico, aspártico y glutámico y alanina (5 μ g de cada en 10 μ l), y las manchas se identificaron mediante autorradiografía.

Ensayos de radiactividad.—Las cápsulas con hiamina (C¹⁴O₂), las manchas de los cromatogramas y las alícuotas de los medios se contaron en líquido de centelleo que contenía 15 gramos de 2,5-difeniloxazol (PPO), 150 miligramos de p-bis (2-[5-feniloxazolil]-benceno) y 240 gramos de naftaleno en 3.000 mililitros de xileno: dioxano, etanol del 95 por 100 (5:5:3, por volumen). Los datos de radiactividad se expresaron en función de los patrones apropiados (es decir, como tanto por ciento de alanina-U-C¹⁴ total que se había añadido en cada vial de incubación) y se relacionaron con el peso inicial de los cortes de hígado.

RESULTADOS

Secreción de insulina por el páncreas.—Se utilizaron ratas en ayunas de dieciocho horas para determinar la secreción basal de insulina en trozos de páncreas incubados "in vitro". En la figura 1 se indica la cantidad de insulina secretada por los grupos A y B. Puede observarse una disminuida capacidad de secreción de insulina en el páncreas de los animales bajo una dieta rica en grasa.

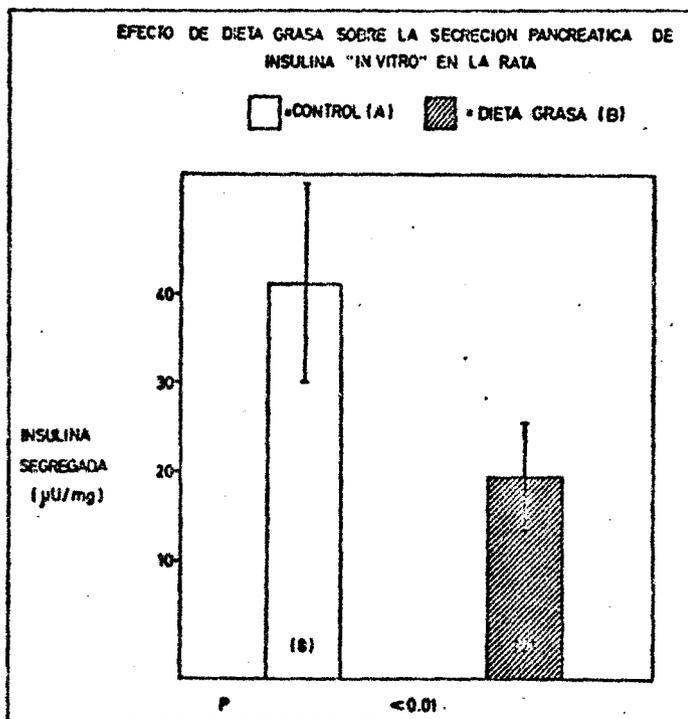


Figura 1

Respuesta a la administración oral de glucosa.—Para determinar si la disminuida secreción de insulina por los páncreas del grupo B venía acompañada por diferencias en la tolerancia a la ingesta de grandes cantidades de glucosa, se administró, "per os", dos gramos de glucosa por kilogramo de peso corporal, a ratas en ayunas de dieciocho horas. Los resultados de glucosa plasmática se resumen en el cuadro I, y los de insulina y cuerpos cetónicos, en las figuras 2 y 3, respectivamente. Los niveles de glucosa e insulina basales (cuadro I y figura 2) están disminuidos en el grupo B con relación al A, aunque las diferencias en los valores de glucemia no sean estadísticamente significativas. Cuerpos cetónicos plasmáticos a tiempo cero eran más altos en B que en A (figura 3). Los animales controles (A) responden normalmente a la ingesta de glucosa: un aumento de glucosa (cuadro I) e insulina (figura 2) plasmáticas a los treinta minutos, segundo de un descenso en ambos parámetros después de sesenta minutos de la administración de glucosa, aunque sin obtener niveles basales. Los cuerpos cetónicos siguen un camino prácticamente opuesto (figura 3); los niveles elevados de cetona en el plasma de animales ayunados disminuyen a los treinta minutos de la administración de glucosa, para aumentar posteriormente (sesenta

CUADRO I

EFFECTO DE DIETA GRASA SOBRE LA GLUCOSA PLASMÁTICA TRAS LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE GLUCOSA EN LA RATA EN AYUNAS DURANTE DIECIOCHO HORAS

Minutos de la administración de glucosa ...	0	(mg/100 ml.)	
		30	60
Control	99,2 ± 14,8	205,1 ± 10,3	165,3 ± 20,3
Dieta grasa	82,4 ± 10,8	233,9 ± 15,5	253,9 ± 34,6
P	N. S.	N. S.	N. S.

La glucosa se administró a tiempo cero (2 g/Kg. de peso corporal) y los animales se sacrificaron por decapitación. Los valores de p denotan la relación estadística entre los grupos (N.S. = $p < 0,05$), $n = 5-8$ animales/grupo. Medias ± E.S.

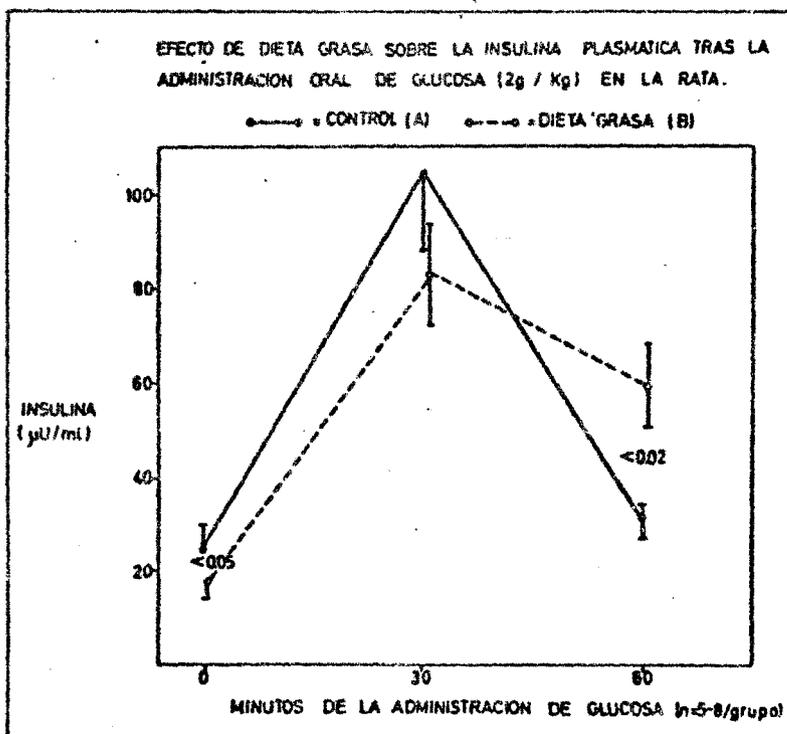


Figura 2

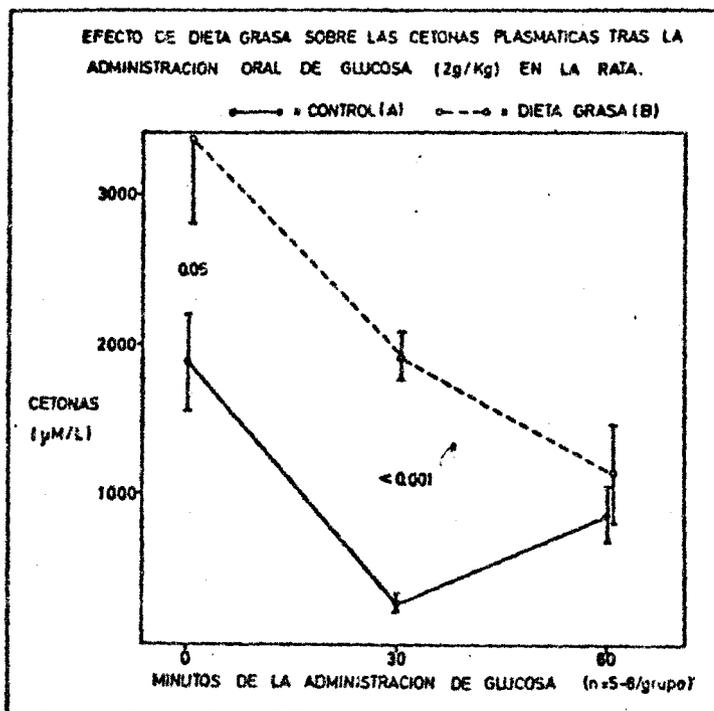


Figura 3

minutos). La respuesta del grupo B es completamente distinta, presentándose un continuo aumento en los niveles plasmáticos de glucosa hasta los sesenta minutos (cuadro I). La insulina plasmática, que comenzó en niveles basales bajos, aumenta después de treinta minutos del tratamiento (figura 2), pero permanece elevada a los sesenta minutos. La figura presentada por los cuerpos cetónicos plasmáticos es muy interesante en el grupo B (figura 3): disminuyen a los treinta minutos de la administración de glucosa, pero mucho menos que en el grupo A (86,5 por 100 en A frente a 44,8 por 100 en B). A los sesenta minutos, mientras que las cetonas plasmáticas del grupo A comienzan a recuperarse, los niveles basales en las ratas B continúan disminuyendo.

En resumen, estos resultados indican que una ingesta alta en grasas produce una disminuida tolerancia a la administración oral de glucosa.

Gluconeogénesis hepática "in vitro".—Los anteriores resultados muestran un alterado metabolismo de la insulina en las ratas alimentadas con una dieta rica en grasas. Para determinar si estas alteraciones vienen acompañadas de cambios en la capacidad gluconeogénica del hígado, nosotros hemos estudiado la utilización de alanina-U-C¹⁴ por cortes de hígado incubados "in vitro", en los grupos A y B, tanto alimentadas

CUADRO II

EFECCIÓN DE DIETA GRASA SOBRE LA UTILIZACIÓN «IN VITRO» DE L-ALANINA-U-C¹⁴ (10⁻³ M) POR CORTES DE HIGADO DE RATAS ALIMENTADAS Y EN AYUNAS DURANTE CUARENTA Y OCHO HORAS

(Porcentajes de las cuentas iniciales/100 miligramos)

Situación alimenticia		Alimentadas		En ayunas durante cuarenta y ocho horas		
Grupo	Control (A)	Dieta grasa Control (B)	p	Control (A)	Dieta grasa (B)	p
Captación de alanina C ¹⁴	74,18 ± 1,91	63,85 ± 2,67	< 0,02	45,50 ± 8,58 ***	41,34 ± 6,60 **	N. S.
C ¹⁴ O ₂	17,47 ± 1,32	13,87 ± 0,86	< 0,05	10,40 ± 2,23 *	9,04 ± 1,96 *	N. S.
Acido láctico C ¹⁴ ...	19,86 ± 1,82	10,29 ± 2,09	< 0,01	10,65 ± 2,29 *	4,54 ± 0,71 *	< 0,05
Acido pirúvico C ¹⁴ ...	6,88 ± 0,33	3,72 ± 0,29	< 0,001	3,59 ± 0,72 ***	2,48 ± 0,50 *	N. S.
Acido aspártico C ¹⁴ ...	2,36 ± 0,28	2,75 ± 0,25	N. S.	2,35 ± 0,44	2,77 ± 0,34	N. S.
Acido glutámico C ¹⁴ .	5,81 ± 0,62	5,57 ± 0,51	N. S.	3,90 ± 0,49 *	4,49 ± 0,69	N. S.

Los detalles del sacrificio de los animales e incubación «in vitro» se dan en el texto. La utilización de alanina marcada durante los noventa minutos de la incubación viene expresada en función de las cuentas totales inicialmente presentes en cada vial; p representa la significatividad de la diferencia entre las medias ± E.S. de los valores de los grupos A y B. La significatividad de las diferencias entre las medias de los grupos alimentados y en ayunas se expresa por asteriscos: * = p 0,05; ** = p < 0,02; *** = p < 0,01; **** = p < 0,001; n = 6/grupo. ++ Alanina-C¹⁴ representa el tanto por ciento de alanina captada por 100 miligramos de tejido.

CUADRO III								
EFECTO DE DIETA GRASA SOBRE LOS PESOS DE HIGADO Y SUPRARRENALES EN RATAS ALIMENTADAS Y EN AYUNAS DURANTE CUARENTA Y OCHO HORAS. MEDIAS \pm E. S.								
Situación alimenticia	Alimentadas		En ayunas durante cuarenta y ocho horas					
	Grupo	Control (A)	Dieta grasa (B)	P	Control (A)	Dieta grasa (B)	P	
Higado	8,38	0,35 (6)	7,84	0,42 (6)	< 0,05	4,42	0,26 (6)	< 0,05
Suprarrenales	27,3	1,14 (6)	10,8	3,00 (6)	< 0,01	34,0	2,7 (6)	N. S.

Detalles del análisis estadístico como en el cuadro II.

(cuadro II). Sin embargo, el grupo B sintetiza la misma o menor cantidad de glucosa-C¹⁴ estando en ayunas que alimentadas (figura 4), y de esta forma, la glucosa C¹⁴ formada por los grupos A y B no fue distinta estadísticamente cuando los animales estaban en ayunas. Si los datos son calculados por el hígado total, el grupo B forma, aproximadamente, el doble de glucosa-C¹⁴ que el A y esto se debe al hecho de que, en el ayuno el grupo B continúa con un hígado mayor que el A (cuadro III). El porcentaje de radiactividad convertida a C¹⁴O₂, ácidos pirúvico, aspártico y glutámico-C¹⁴ es igual y ácido láctico-C¹⁴ es menor en B que en A cuando los animales se encuentran en ayunas (cuadro II).

El peso de las cápsulas suprarrenales presenta un panorama similar al descrito anteriormente para los otros parámetros estudiados. Cuando están alimentadas, los animales del grupo B presentan unas suprarrenales mayores que las del A (cuadro III). El ayuno origina un aumento de tamaño de las mencionadas glándulas en el grupo A, mientras que las del B son incluso menores que cuando están alimentadas y, al mismo tiempo, iguales a las del grupo A.

En resumen, cuando las ratas están alimentadas bajo una dieta rica en grasas presentan unos hígados y suprarrenales de mayor tamaño y una más activa gluconeogénesis que las controles. Aunque el ayuno mantiene la hipertrofia hepática en las ratas a dieta grasa, las suprarrenales disminuyen a valores iguales a las de las controles y ya no es posible un posterior aumento de la gluconeogénesis hepática.

DISCUSION

Los resultados obtenidos demuestran que la administración a ratas de una dieta que contenga un 45 por 100 de grasa origina unos elevados niveles de cuerpos cetónicos circulantes, una baja insulina plasmática y una disminuida secreción pancreática de dicha hormona cuando los animales están en ayunas dieciocho horas. En estos animales aparece una disminuida respuesta a la administración oral de glucosa, en lo que se refiere a cambios de glucosa, insulina y cuerpos cetónicos plasmáticos

Este fenómeno es corroborado por una disminuida sensibilidad de los tejidos a la insulina (1). Los resultados están de acuerdo con los de Christophe (13), que encuentra una disminuida velocidad de utilización de glucosa en ratas sometidas a una dieta grasa (54 por 100) y con los de Malaisse y colaboradores (2), quien describe una reducción en la secreción de insulina por las células beta del páncreas tras el tratamiento con glucosa y una disminuida sensibilidad de los tejidos adiposo y muscular a la insulina en ratas alimentadas con una dieta grasa (40 por ciento).

Nosotros hemos encontrado aquí que esta disminuida sensibilidad a la insulina viene acompañada de elevados niveles de cuerpos cetónicos circulantes y una elevada capacidad para sintetizar glucosa a partir de concentraciones fisiológicas de alanina cuando los animales están alimentados. Esta aumentada gluconeogénesis puede deberse a una de las tres posibilidades siguientes: 1) La aumentada lipemia en estos animales vendrá acompañada de elevados niveles de ácidos grasos libres (FFA) en el hígado. Lemonnier (14) ha descrito que animales sometidos a similares condiciones experimentales presentan un hígado graso, y es bien sabido que siempre que se presenta un aumento en la llegada de lípidos al hígado aparece una activación de gluconeogénesis hepática. Este es el caso de la diabetes y el ayuno (15), aclimatación al frío (16), embarazo y ayuno (17) y obesidad (18). 2) La disminuida secreción pancreática de insulina, los bajos niveles de insulina circulante y la hiposensibilidad de los tejidos a dicha hormona también aumentarán la actividad de gluconeogénesis hepática, ya que es bien conocido el efecto antigluconeogénico de la insulina (19). 3) Una elevada secreción de esteroides por la corteza suprarrenal actuará sinérgicamente con los anteriores factores. Aquí hemos mostrado que las suprarrenales son mayores en las ratas a dieta grasa que en sus controles. Esto confirma los resultados de otros (19). Estas observaciones globales vienen acompañadas por hallazgos más específicos: se ha descrito que las dietas ricas en grasa producen hipertrofia de las zonas fascicularis y reticularis de la corteza suprarrenal (14) y un mayor contenido de esteroides en las suprarrenales (3).

Nuestros estudios en animales en ayunas durante cuarenta y ocho horas completan el cuadro metabólico anterior. Hemos observado en este trabajo que los animales controles responden normalmente al ayuno: presentan una activación de gluconeogénesis hepática. Sin embargo, cuando los animales se han sometido a una dieta rica en grasa, después de un ayuno de cuarenta y ocho horas, no están capacitados para superar el nivel de gluconeogénesis hepática de cuando están alimentados. Esta falta de respuesta al ayuno puede deberse a una máxima capacidad enzimática en sus hígados cuando están alimentados, regida por los inductores anteriormente citados (lipemia, baja insulina y elevados esteroides), lo cual haría imposible un posterior aumento. Realmente, algunos de estos inductores pueden estar modificados en el ayuno: 1) La ingesta de grasas es retenida, y por tanto, la lipemia es mantenida por los substratos endógenos, lo cual hará difícil el mantenimiento de altos niveles de lípidos circulantes. 2) En los animales controles en ayunas aumenta el tamaño de las suprarrenales, como era de esperar, mientras que, en las ratas a dieta grasa, las suprarrenales disminuyen con el ayuno y se hacen iguales a las de los controles respectivos. No hay datos en

la literatura sobre el contenido de esteroides en las suprarrenales de animales en condiciones experimentales similares, pero los resultados aquí presentados apoyarían una disminuida actividad suprarrenal en los animales a dieta grasa y sometidos al ayuno.

Esta situación es consistente con estudios actualmente en realización en ratones obesos e hiperglucémicos (Herrera, Sandler y Freinkel, en preparación), en los cuales, junto con una alta lipemia cuando están alimentados, aparece una disminuida respuesta al ayuno en lo que se refiere a gluconeogénesis hepática y aumento de lípidos circulantes.

El estudio aquí presentado pone de manifiesto experimentalmente el efecto diabetogénico de una dieta rica en grasa, la cual origina no solamente una disminución de la secreción insulínica, sino también una bajada en la sensibilidad de los tejidos a dicha hormona, concomitantemente con una más activa gluconeogénesis.

Así, pues, una más efectiva síntesis de glucosa, junto a su menor utilización periférica, debe participar activamente en la tendencia a hiperglucemia en las dietas abundantes en grasas.

Este trabajo ha sido realizado con el apoyo económico de J. S. Schewpe, M. D., Chicago, y The Wellcome Trust, Londres.

RESUMEN

Se han comparado ratas sometidas a dieta rica en grasas (B) con animales controles a dieta normal (A). Tras un ayuno de dieciocho horas, los niveles plasmáticos de glucosa e insulina son más bajos en B que en A y aparece una disminuida tolerancia a la glucosa oral en el grupo B. La secreción pancreática de insulina es menor en B que en A. La formación de glucosa C^{14} a partir de alanina- $U-C^{14}$ por cortes de hígado es superior, y la de ácidos láctico, pirúvico y CO_2 radiactivos menor en A que en B cuando los animales estaban alimentados. Después de un ayuno de cuarenta y ocho horas, el grupo A presenta más activa gluconeogénesis que cuando está alimentado, mientras que el B permanece al mismo nivel, de modo que la formación de glucosa- C^{14} en A y B es igual cuando los animales han estado en ayunas. Estas manifestaciones metabólicas participan activamente en el efecto diabetogénico de las dietas ricas en grasas.

SUMMARY

A group of rats with fatty diet (B) and another control group with normal diet (A) have been compared. After 18 hours fasting plasma levels of glucose and insulin were lower in group B, and appeared a diminished tolerance to oral glucose in this group. Pancreatic insulin secretion is lower in group B. Glucose- C^{14} formation from alanine- $U-C^{14}$ is superior, and that of lactic acid, pyruvic and radioactive CO_2 lower in A.

when the animals were feeded. After 48 hours fasting, group A have more active glucogenesis that when feeded, while in B is the same, so glucose-C¹⁴ formation is the same in both groups when the animals were fasting. This metabolic manifestation participate in the diabetogenic effect of fatty diets.

RESUME

On a comparé des rats soumis à une diète riche en graisses (B) avec des animaux contrôle soumis à une diète normale (A). Après un jeûne de 18 heures, les niveaux plasmatiques de la glucose et de l'insuline sont plus bas dans le groupe B que dans le groupe A. Dans le groupe B est diminuée la tolérance à la glucose orale. La sécrétion pancréatique d'insuline est plus basse dans le groupe B que dans A. La formation de glucose C¹⁴ à partir de l'alanine U-C¹⁴ est supérieure et la formation des acides lactique, piruvique et de CO₂ radiactifs est plus basse dans A que dans B, quand les animaux étaient nourris. Après un jeûne de 48 heures, le groupe A présente une gluconeogenèse plus active que quand il était alimenté, tandis que le groupe B reste au même niveau. Ainsi, la formation de glucose C¹⁴ reste la même du point de vue quantitatif quand les animaux son restés à jeun. Ces manifestations métaboliques participent activement dans l'effet diabétogène des diètes riches en graisses.

BIBLIOGRAFIA

1. Blázquez, E., y López Quijada, C. J.: Endocr. 42, 489 (1968).
2. Malaisse, W. J.; Lemonnier, D.; Malaisse-Lagae, F., y Man Delbann, I. M.: Horm. Metb. Res. 1, 9 (1969).
3. Lemonnier, D., y Di Costanzo, P.: C. R. Acad. Sc. Paris, 267, 1665 (1968).
4. Weber, G.; Singhal, R. L., y Srivastava, S. K.: Proc. Nat. Acad. Sc. 53, 96 (1965).
5. Qi, N., y Shreeve, W. W.: Endocrinology 78, 765 (1966).
6. Niemeyer, H.; Clark-Turri, L.; Garcés, E., y Vergara, F. E.: Arch. Bioch. Biophys. 98, 77 (1962).
7. Varghan, D. A.; Hannon, J. P., y Vaughan, L. N.: Amer. J. Physiol. 199, 1041 (1960).
8. Somogyi, M.: J. Biol. Chem. 160, 69 (1945).
9. Hugget, A. St. G., y Nixon, D. A.: Lancet 2, 368 (1957).
10. Bessman, S. P., y Anderson, M.: Fed. Proc. 16, 154 (1957).
11. Hales, C. N., y Randle, P. J.: Biochem. J. 88, 137 (1963).
12. Umbrell, W. W.; Burris, R. H., y Stanffer, S. F.: "Manometric Techniques", 4.^a ed., p. 132, Minneapolis: Burgess Publishing Co., 1964.
13. Christophe, J.: "Contribution à la biochimie des obesités experimentales", pag. 55, Ed. Arscia, Bruxelles, 1961.
14. Lemonnier, D.: "3rd Intern. Meeting of Endocrinologists. Physiopathology of adipose tissue". Excerpta Medica Foundation, p. 197, Vague, J. Ed. Amsterdam, 1969.
15. Friedman, B.; Goodman, E. H. Jr., y Weinshouse, S.: J. Biol. Chem. 240, 3729 (1965).
16. Penner, P. E., y Hims-Hagen, J.: Canadian J. Biochem. 46, 1205 (1968).
17. Herrera, E.; Knopp, R. M., y Freinkel, N.: J. Clin. Investigation 48, 2260 (1969).
18. Sandler, R.; Herrera, E., y Freinkel, N.: Clinical Research 16, 351 (1968).
19. Fetter, D., y Neidla, E.: Metabolism. 8, 762 (1959).