

LA SÍNTESI DEL GLUCOGEN A PARTIR DE L'ÀCID LÀCTIC EN EL FETGE «IN VITRO»

per

C. PI-SUÑER I BAYO

J. FOLCH I PI

Primera nota

El fet de la síntesi en l'organisme de la glucosa i el glucogen a partir de l'àcid làctic ja ha estat objecte de nombrosos i interessants treballs. En efecte, poc després d'exposada per Claude Bernard la seva teoria de la formació del glucogen en el fetge des de la glucosa, i haver-ho demostrat experimentalment nombrosos investigadors, Weiske i Flechsig (1) observen per primera vegada que 60 gr. d'àcid làctic administrats a l'ovella en forma de lactat càlcic produeixen el mateix efecte en el seu metabolisme que la quantitat equivalent de glucosa. Araki (2) sosté després que el *d*-lactat sòdic és reabsorbit gairebé completament per l'organisme i hi és transformat en glucogen, mentre que si s'intoxica l'animal amb CO s'elimina totalment per l'orina. Embden (3) observa el pas de l'àcid làctic a glucogen en el fetge perfós amb líquid de Ringer que contingui aquest àcid làctic, Parnas i Baer (4) en el fetge de tortuga en idèntiques condicions, Embden i Salomon (5) en el gos diabètic, Mendel i Lusk (6) en el gos intoxicat amb florhidzina, etc. Després d'aquests, una llarga sèrie d'investigadors s'han ocupat del problema, sobretot a partir dels interessantíssims

descobriments de Meyerhof (7), Hill (8) i Embden (9), esclarint el mecanisme de la contracció muscular i del cicle àcid làctic \rightleftharpoons glucosa. Efectivament, gràcies a l'ús dels micromanòmetres de Barcroft (tan completat i millorat pels nombrosíssims estudis de Warburg, especialment sobre el metabolisme de la cèl·lula neoplàsica i l'efecte catalític del ferro en les oxidacions), s'han pogut dur a terme, en els darrers temps, amb petitíssimes quantitats de teixit (talls àdhuc de 0'5 mm. de gruix), determinacions més precises, entre les quals destaquen les de Meyerhof, Lohmann i Meier (10), Meyerhof i Lohmann (11) i Takane (12), que han donat un resultat favorable a la hipòtesi de la capacitat del teixit muscular i de l'hepàtic de sintetitzar «in vivo» el glucogen a partir del *d*-àcid làctic i del racèmic i, en molta menor proporció, del levògir.

Amb tot, en aquests últims temps han aparegut diversos treballs contraris a tal asseveració; així veiem com Barrenscheen (13) dona resultats negatius perfont el fetge aïllat de gossos i conills, com Abramson i Eggleton (14) i Jansen i Jost (15) no han observat cap síntesi de glucosa en els músculs aïllats i perfosos amb solució de Ringer amb lactat, i com Carruthers sosté el mateix respecte del teixit hepàtic.

En vista de tots aquests resultats tan contradictoris i seguint una sèrie d'experiències (17 i 18) ja efectuades per un de nosaltres sobre els processos químics en el fetge i el múscul dels animals en exercici, hem cregut interessant d'ocupar-nos d'una qüestió tan important i que constitueix, per dir-ho així, el punt central de les investigacions presents sobre el metabolisme intermediari dels hidrats de carbon, sobretot des dels estudis de Neuberg i col·laboradors (entre ells un de nosaltres) (19), sobre la dismutació a àcid làctic del metilglioxal, primer segurament dels compostos de tres àtoms de carbon que apareixen en l'organisme.

TÈCNICA

En les nostres determinacions hem prescindit del mètode de Barcroft-Warburg per creure'l exposat a errors, a causa de les petitíssimes quantitats de teixit amb què es treballa, cosa obligada quan es disposa de petita quantitat de material, cas que afortunadament no era el nostre.

A. Pi Suñer i un de nosaltres (20) proposàrem fa poc un model de tub destinat a la investigació del metabolisme dels teixits «in vitro». Consisteix senzillament en un tub de vidre resistent a 100°, d'uns 2 cm. de diàmetre i proveït, en la seva part inferior, d'una peça mòbile amb tanca esmerilada i que es manté adherida a la resta del tub per mitjà de quatre petites molles de metall que s'enganxen en vuit prolongacions curtes i corbades del tub. En la part superior porta un senzill tap de suro travessat per tres tubs: l'un curt, que serveix per a l'entrada del líquid de Ringer; l'altre que arriba fins a la base i per on entra l'oxigen o els gasos que hom desitgi fer bombollejar, i el darrer tallat pel seu extrem inferior arran del tap, per a la sortida del mateix gas. En l'eixamplament existent en la base del tub s'introdueix l'òrgan a estudiar; ben esmicolat, i després s'omple amb líquid de Ringer fins que el nivell aconsegueixi l'extrem del tub soldat, que serveix per a mantenir-lo constant.

Sis d'aquests tubs eren disposats paral·lelament a l'interior d'un termòstat, mantingut acuradament a 37-39°, i cada un dels seus tubs de despreniment a nivell constant es feia comunicar per mitjà d'un de goma que travessava la base del termòstat (foradada a aquest efecte) amb un respectiu Erlenmeyer de 500 cc. de capacitat, disposat

sota d'aquell i en el qual es recollia tot el líquid de perfusió. El líquid de Ringer, disposat per la perfusió, es col·locava en els dipòsits de la part superior (un per al dit líquid contenint lactat, i l'altre per al Ringer sense lactat), i per la distribució es repartia entre els sis tubs, tres i tres : amb lactac i sense.

Com a líquids de perfusió usàvem dos tipus de Ringer, isotònics i d'un PH oscil·lant entre 7'1 i 7'3, un dels quals contenia àcid làctic del comerç (lleugerament levògir) i l'altre en mancava, per a poder comparar així els seus efectes sobre la cèl·lula hepàtica. La composició dels líquids era la següent:

<i>Ringer amb àcid làctic</i>		<i>Ringer sense àcid làctic</i>	
H ₂ O.....	1,000 gr.	H ₂ O.....	1,000 gr.
ClNa.....	8 gr.	ClNa.....	9 gr.
ClK.....	0'2 gr.	ClK.....	0'2 gr.
Cl ₂ Ca.....	0'2 gr.	Cl ₂ Ca.....	0'2 gr.
CO ₃ HNa.....	0'1 gr.	CO ₃ HNa.....	0'1 gr.
CH ₃ CHOH.COONa.	3 gr.		

Si bé el bicarbonat actuava de púffer o esmorteïdor, no ho feia de manera suficient, per la qual raó haguérem de substituir una part del clorur sòdic per una mescla de mono i difosfat sòdics, que ens assegurava la constància d'un PH normal.

Un cop tots els tubs disposats i plens de Ringer, i el termòstat a 37-39°, procedíem al sacrifici de rates blanques, d'un pes mitjà de 150 gr. i mantingudes durant més de tres mesos a una alimentació normal. Les rates eren sacrificades per secció total del coll amb una mitja lluna; es treia ràpidament el fetge, es dipositava en cristallitzadors introduïts en gel i s'esmicolava completament amb unes tisorettes, tenint gran cura de separar totes les aponeurosis. La pesada es feia amb una balança de torsió de Bang, usant com a platet un trosset

de paper d'estany que calia netejar acuradament després de cada pesada. Verificàvem de tres a quatre pesades per a cada tub, assolint un total d'uns 1'50 gr. A mesura que es procedia a les pesades, els trossets de fetge eren portats als tubs en el termòstat i s'hi feia circular el Ringer corresponent i bombollejar l'oxigen, a una velocitat suficient perquè la cèl·lula treballés en un ambient d'aquest gas.

Com sigui que al principi de la circulació de l'oxigen es formava una gran quantitat d'escuma (degut a la suspensió col·loidal de teixit hepàtic), que sobressortia una mica del tub, afegírem als líquids una petita quantitat de pols de talc que feren disminuir la tensió superficial, i amb ella, la producció d'escuma.

Simultàniament a aquestes perfusions, que duraven unes cinc hores, recollint un volum total de líquid d'uns 250 cc., efectuàvem determinacions de control amb fetge obtingut i preparat de la mateixa manera, per tal de saber el seu contingut en substàncies reductores totals abans de la perfusió. Aquesta determinació de les substàncies reductores totals era efectuada pel micromètode de Pflüger modificat per Collazo, descrit en un treball anterior (21) amb tot detall, i que consisteix, en línies generals, a escalfar el fetge durant tres hores, amb potassa al 60 per 100 en bany maria, precipitar en fred amb alcohol absolut, centrifugar i hidrolitzar el glucogen separat, durant tres hores, amb àcid clorhídric diluït. Per a la determinació del sucre resultant utilitzàvem el mètode de Bertrand, basat en la formació de l'òxid de coure, la seva oxidació pel sulfat fèrric i consegüent reducció d'aquest a ferrós, i la seva nova oxidació a fèrric amb una solució titulada de permanganat potàssic.

Tal com hem dit, el fetge de l'experiència de control,

tot seguit de pesat era posat a atacar amb la potassa càustica. En les perfusions, esperàvem que aquestes estiguessin acabades per a sotmetre els trossos de fetge al mateix tractament, mentre que ajuntàvem els líquids encara existents en cada tub amb els de l'Erlenmeyer corresponent i hi precipitàvem les albúmines amb àcid tricloracètic. Un cop hidrolitzat el glucogen resultant de l'atac del fetge i el que pogués existir en els líquids de Ringer per la potassa, procedíem a verificar, per separat, les determinacions de sucre, sumant després els resultats obtinguts. Si això ens obligava a un doble treball, ens permetia, d'altra banda, de saber si la glucosa resultant es trobava en el líquid de Ringer de pertusió, o en el fetge que hi havia estat suspès durant cinc hores.

Havent-se'ns acudit, a més a més, que en el fetge de control es podien trobar sucres reductors en forma de tals i no de glucogen, que serien menyspreats en precipitar-los amb l'alcohol i centrifugar-los després d'atacat el fetge per la potassa, procedírem sempre al seu rentat previ (repetit tres vegades, durant cinc minuts) amb el Ringer sense àcid làctic. Només després d'aquest tractament sotmetíem el fetge a l'atac de la potassa, mentre hidrolitzàvem els líquids obtinguts. En les nostres determinacions vàrem veure que bastava aquest rentat, repetit tres vegades, perquè el contingut en glucogen i glucosa del fetge de control, després d'ell, fos gairebé nul. Sumàvem els valors obtinguts en ambdues anàlisis i la suma resultant era el control total.

Finalment, portada la nostra primera comunicació a la Societat de Biologia de Barcelona, el nostre company senyor Rofes ens instà que, per a major seguretat de les nostres experiències, ultra el contingut en sucres reductors totals del fetge i del Ringer de tractament

després d'aquest, determinéssim també el de l'àcid làctic, per tal de veure si paral·lelament a la formació de glucogen obteníem una disminució en la seva concentració inicial en el Ringer.

Creient la idea molt interessant, procedírem a dur-la a la pràctica, i per a això, després del tractament, preníem 50 cc. del Ringer, en els quals determinàvem l'àcid làctic segons el conegut mètode de Fürth i Charnas, modificat per Hirsch i Kauffmann (22), consistent, en línies generals, en precipitar les substàncies reductores amb lletada de calç i sulfat de coure, prendre amb una pipeta 10 cc. del líquid que sobreneda i oxidar-lo amb permanganat potàssic i àcid sulfúric, destil·lant al mateix temps, per a recollir-lo en un Erlenmeyer mantingut en gel i contenant una solució coneguda de bisulfit potàssic. Bastarà valorar el bisulfit restant amb solució n/100 de iode, per a saber el que s'ha despès i, per ell, la quantitat d'aldehid produït, o sigui la d'àcid làctic existent.

Aquesta determinació d'àcid làctic fou efectuada només en les dues últimes experiències amb oxigen, i ens donà resultats coincidents, en absolut, amb l'augment dels sucres reductors totals.

RESULTATS

En les taules que segueixen donem els resultats de 18 experiències efectuades en rates blanques d'un pes mitjà de 150-155 gr. i alimentades normalment amb pa sucat d'aigua i fulles verdes d'ensiam (això darrer, segons ens aconsellà el professor Bellido, per tal d'obtenir una millor procreació).

TAULA I

Controls

Sucres reductors totals després de la hidrolisi

<u>Dia</u>	<u>Pes fetge en mgr.</u>	<u>Glucosa en mgr.</u>	<u>Glucosa per 100</u>
30-XI-30	—	—	—
4-XII-30	—	—	—
»	—	—	—
10-XII-30	0'845	14'6	1'74
»	1'549	30'0	1'92
»	1'559	23'7	1'52
17-XII-30	1'483	17'9	1'20
»	1'550	40'2	2'50
»	1'713	28'5	1'60
22-XII-30	1'662	16'5	1'00
»	1'559	18'2	1'20
30-XII-30	1'693	37'0	2'19
»	1'580	35'0	2'33
»	1'637	29'0	1'77
22-I-31	1'728	37'7	2'12
»	1'611	25'9	1'60
6-V-31	1'560	40'0	2'56
»	1'374	37'0	2'69

TAULA II

Ringer sense lactat

Sucres reductors totals després de la hidrolisi

<u>Dia</u>	<u>Pes fetge en mgr.</u>	<u>Glucosa en mgr.</u>	<u>Glucosa per 100</u>
30-XI-30	1'360	13'6	1'0
4-XII-30	1'591	49'0	3'07
»	1'726	18'0	1'04
10-XII-30	1'458	38'5	2'67
»	1'497	41'6	2'77
»	1'553	39'9	2'57
17-XII-30	1'345	30'15	2'23
»	1'483	57'84	3'80
»	1'557	47'1	2'93
22-XII-30	1'475	23'2	1'60
»	1'748	32'5	1'80
30-XII-30	1'773	63'7	3'59
»	1'576	48'0	3'04
»	1'743	48'0	2'75
22-I-31	1'834	58'1	3'15
»	1'502	51'7	3'43
6-V-31	1'592	46'8	2'94
»	1'538	55'3	3'59

TAULA III

Ringer amb lactat

Sucre reductors totals després de la hidrolisi

Dia	Pes fetge en mgr.	Glucosa en mgr.	Glucosa per 100
30-XI-30	1'439	19'0	1'32
4-XII-30	1'704	54'1	3'17
»	1'691	26'5	1'56
10-XII-30	1'527	41'5	2'71
»	1'445	42'9	2'92
»	1'628	46'0	2'83
17-XII-30	1'535	40'8	2'66
»	1'563	61'2	3'90
»	1'652	53'5	3'15
22-XII-30	1'685	33'5	2'00
»	1'662	43'5	2'60
30-XII-30	1'636	68'5	4'15
»	1'542	49'0	3'16
»	1'659	52'0	3'12
22-I-31	1'597	58'3	3'63
»	1'689	70'3	3'70
6-V-31	1'671	66'9	4'00
»	1'622	60'6	3'73

Comparant les valors per 100 d'aquestes taules, que són les més interessants, tindrem:

TAULA IV

Glucogen hepàtic en tant per 100 de fetge fresc

Control	Ringer sense lactat	Ringer amb lactat
—	1'0	1'32
—	3'07	3'17
—	1'04	1'56
1'74	2'67	2'72
1'92	2'77	2'92
1'52	2'57	2'83
1'20	2'23	2'66
2'50	3'80	3'90
1'60	2'93	3'15
1'00	1'60	2'00
1'21	1'80	2'60
2'19	3'59	4'15

<u>Control</u>	<u>Ringer sense lactat</u>	<u>Ringer amb lactat</u>
2'33	3'04	3'16
1'77	2'75	3'12
2'12	3'15	3'63
1'60	3'43	3'70
2'56	2'94	4'00
2'69	3'59	3'73
Valors mit. 1'86	2'66	3'01

TAULA V

Àcid làctic del Ringer en tant per 100

<u>Abans del tractament</u>	<u>Després del tractament</u>
0'261 gr. por 100	0'229 gr. por 100
0'261 gr. por 100	0'253 gr. por 100

Com es dedueix de llurs dates, totes les determinacions han estat portades a terme a començaments d'hivern, tret de les dues últimes (les acompanyades amb la determinació de l'àcid làctic) que s'efectuaren el maig. Aquesta interrupció és deguda a haver efectuat, en aquest interval, altres experiències en atmosferes de nitrogen i anhídrid carbònic, que seran objecte de publicació a part.

Es veu a les taules que en totes les anàlisis, sense cap excepció, existeix un augment, major o menor, en la quantitat de substàncies reductores totals, augment que en les dues últimes rates és corroborat per la disminució en el contingut en àcid làctic.

De quina manera, doncs, poden compaginar-se aquests resultats amb els obtinguts recentment per Carruthers i altres autors? Intentem de fer-ho ocupant-nos de les condicions experimentals en què es verificaren les nostres determinacions i les seves. Efectivament, després de llegir amb atenció la seva nota, hem cregut poder anotar certes circumstàncies, a les quals, segons la nostra manera de veure, podria atribuir-se llur resultat negatiu.

En primer lloc, efectuen les experiències amb rates que han estat tingudes dos dies en dejú. Nosaltres també treballarem en aquestes condicions, per a intentar comprovar els seus resultats, i tampoc no observarem cap formació de glucogen a partir de l'àcid làctic existent en el líquid de perfusió. I no tan solament això, sinó que els fetges, en aquestes condicions, ens mostraven un contingut en sucres reductors insignificant i de vegades absolutament nul. Per altra part, Meyerhof i Lohmann, en el seu treball ja esmentat, diuen que els resultats són molt més satisfactoris quan el dejuni només ha durat de 17 a 24 hores, i Cori i Cori (23) treballen sempre amb fetges d'animals a dieta durant vint-i-quatre hores. ¿Seria possible d'explicar tots aquests fets per una acumulació de greix en el fetge sotmès a un dejuni massa prolongat, que després li impideixi la seva funció glucogènica normal? En aquest sentit semblen pronunciar-se les experiències de tinció del fetge portades a cap en tals condicions, molt amablement, pel professor Ferrer Cajigal, el qual ha observat una intensa degeneració greixosa, especialment perivascular.

Altrament, no esmenten amb quina classe d'àcid làctic han operat. I aquest és un fet molt important, ja que des de fa temps s'ha observat la capacitat dels organismes superiors per a sintetitzar a glucogen l'àcid làctic dextrògir (per això anomenat sarcolàctic) i el compensat, i fer-ho molt poc o gens del tot amb el levògir, el qual, però, va veure von Fürth (24) que era sintetitzat pel llevat.

Per tal de poder determinar bé i per separat l'efecte de les dues varietats òptiques, Cori i Cori les aïllen, obtenint el *d*-àcid làctic pur pel mètode de Peterson, Peterson i Fred (25) i el *l*-àcid làctic pel d'Irvine (26), i veient que la capacitat d'aquest d'ésser sintetitzat és unes quatre vegades menor que la d'aquell. Meyerhof i Lohmann, a llui vegada aïllen el primer pel mateix

mètode i el segon pel de Warburg, a base de teixit carcinomatós (27) i observen també una immensa diferència en la velocitat i intensitat d'aprofitament d'ambdues varietats. Nosaltres, com ja hem dit abans, treballem amb un àcid làctic del comerç (puríssim de la casa Merck) quasi completament compensat.

Finalment, és possible que alguns detalls entre le nostres maneres d'operar respectives puguin explicar també els diferents resultats. Mentre Carruthers fa passar només el corrent d'oxigen al començament de l'experiència fins a obtenir en els Erlenmeyer una atmosfera d'aquest gas, en les nostres investigacions el corrent d'oxigen circula durant tota llur duració, assegurant-nos, per tant, una major capacitat d'oxidació. Gràcies a aquest mateix corrent, els petitíssims trossets de fetge continguts en el nostre tub, són agitats contínuament i posats en contacte amb l'oxigen ambient; Carruthers agita l'Erlenmeyer solament de tant en tant, durant tota l'operació unes tres hores. Finalment, nosaltres fem passar uns 250 cc. d'un líquid de Ringer contenint un 0'24 per 100 d'àcid làctic, i ell s'acontenta amb 5 cc. d'un Ringer al 0'2 per 100, o sigui un contingut en àcid làctic de 0'01 gr., que tenint en compte que en la resíntesi és cremat 1/5 del seu contingut per a proporcionar la necessària energia, podria convertir-se, màximament, en 8 mgr. de glucosa, quantitat a totes llums petitíssima perquè pugui ésser ben observada.

No voldríem acabar sense dedicar un xic d'atenció a un altre fenomen ben interessant, observat ja per diversos autors (J. Burn i H. Marks (28), J. Seegen (29), A. Carruthers (30), etc.), referent a l'aparent augment d'hidrats de carbon en el fetge mantingut durant un cert temps en suspensió en líquid de Ringer simple, sense lactat, i que en les nostres determinacions s'ha mostrat

també amb una constància absoluta. La nostra intenció, però, és de confirmar una vegada més el fenomen; sense intentar d'intervenir en la discussió existent entre Macleod i Simpson (31), per una part, sostenint la possible existència en els teixits d'una fracció de sucre no determinable com a glucogen o sucres solubles, i Folin, Trimble i Newmann (32), per altra part, que la combaten.

CONCLUSIONS

1.^a Es descriu un nou mètode per a l'estudi del metabolisme «in vitro» dels teixits.

2.^a Es ressenyen 18 experiències de síntesi de glucogen en el fetge de rata, mantingut durant cinc hores en líquids de Ringer, contenint àcid làctic i sense ell, havent-se observat un augment constant en la quantitat de sucres reductors totals d'aquells respecte a aquests.

3.^a En les dues últimes experiències es determina paral·lelament el contingut en àcid làctic del Ringer, després del tractament, i es compara amb la inicial, observant una disminució en la seva concentració, proporcional a l'augment dels sucres reductors.

4.^a En els fetges tractats amb líquid de Ringer normal (sense lactat) s'observa — com ja havien exposat altres investigadors — un augment en aquesta quantitat de sucres reductors total respecte als de control menor, però, que en els tractats amb líquid de Ringer amb lactat.

5.^a Es demostra una vegada més la capacitat del fetge de sintetitzar a glucogen l'àcid làctic i lactats, especialment als *d*-lactats.

*Institut de Fisiologia.
Facultat de Medicina de Barcelona.*

BIBLIOGRAFIA

1. *Weiske i Flechsig*, J. Landw., 199, 1889.
2. *Araki*, Zeitschr. Physiol. Chem., 442, 1894.
3. *Embden*, VI Congrés Internacional de Fisiologia, 1904.
4. *Parnas i Baer*, Bioch. Zeits., 41, 386, 1912.
5. *Embden i Salomon*, Beitr. Chem. Physiol. und Pathol., VI, 63, 1905.
6. *Mendel i Lusk*, Amer. Journ. of Physiol., 16, 129, 1906.
7. *Meyerhof*, Die Chemischen Vorgänge im Muskel, Berlin, 1930.
8. *Hill*, Muscular Activity, Baltimore, 1926.
9. *Embden*, Handb. d. Norm. u. Pathol. Physiol., 9, 369, 1925.
10. *Meyerhof, Lohmann i Meier*, Bioch. Zeits., 157, 549, 1925.
11. *Meyerhof i Lohmann*, Bioch. Zeits., 171, 381, 1926.
12. *Takane*, Bioch. Zeits., 171, 403, 1926.
13. *Barrenscheen*, Bioch. Zeits., 58, 277, 1914.
14. *Abramson i Eggleton*, Journ. Biol. Chem., 75, 763, 1927.
15. *Jansen i Jost*, Zeits. Physiol. Chem., 148, 41, 1925.
16. *Carruthers*, Chinese Journ. of Physiol., 4, 65, 1930.
17. *Pi-Suñer i Bayo, Liss i Osuka*, Anal. Soc. Esp. Fis. Quim., 29, 193, 1931.
18. *Pi-Suñer i Bayo i Liss*, Anal. Soc. Esp. Fis. Quim., 29, 200, 1931.
19. *Pi-Suñer Bayo*, Anal. Soc. Esp. Fis. Quim., 28, 371, 1930.
20. *Pi Suñer i Pi-Suñer Bayo*, Comt. Rend. Soc. Biol., 106, 1008, 1931.
21. *Collazo, Pi-Suñer i Bayo i Liss*, Rev. Med. Barcel., 84, 468, 1930.
22. *Hirsch i Kaufmann*, Zeits. Physiol. Chem., 140, 25, 1924.
23. *Cori i Cori*, Journ. Biol. Chem., 81, 389, 1929.
24. *Fürth*, Bioch. Zeits., 132, 165, 1922.
25. *Peterson i Fred*, Journ Biol Chem., 68, 151, 1926.
26. *Irvine*, Journ. Chem. Soc., 89, 935, 1906.
27. *Warburg*, Bioch. Zeits., 160, 307, 1925.
28. *Burn i Marks*, Journ. of Physiol., 61, 497, 1926.
29. *Seegen*, Pflugers Arch., 25, 165, 1888.
30. *Carruthers*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 25, 850, 1928.
31. *Macleod i Simpson*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 23, 659, 1926.
32. *Folin, Trimble i Newmann*, Journ. Biol. Chem., 75, 263, 1927.