

Estudos sobre a atividade dos extratos da suprarenal

por

Maria Isabel Mello

da Divisão de Química e Farmacologia.

Porges em 1910 (1), foi o primeiro a assinalar que o glicogenio hepático e muscular diminúe após a ablação das suprarenais de cães em jejum de 24 horas. Em 1927, Cori e Cori (2), trabalhando com ratos adrenalectomizados e em jejum de 24 horas, verificaram que não havia deposição de glicogenio no fígado destes animais, o que confirmava os resultados de Porges. Em 1931-1932, Britton e Silvette (3), (4), (5), estudando as mudanças no metabolismo dos hidratos de carbono sob diversas condições e em várias espécies de animais, observaram que, o glicogenio muscular e hepático apresentava-se marcadamente reduzido após a adrenalectomia. A seguir, procuraram verificar os efeitos dos extratos da "cortex" da suprarenal sôbre o metabolismo dos hidratos de carbono em animais normais e adrenalectomizados. O aumento da glicemia e do glicogenio hepático tanto nos animais normais e em jejum, como nos adrenalectomizados e tratados com extrato da "cortex" da suprarenal, levou estes autores a propôr, a taxa da deposição de glicogenio no fígado de animais normais e tratados por esses extratos, como teste biologico para a avaliação da sua atividade (6). Em 1935, Thaddea (7), confirmou os resultados de Britton e Silvette. Em 1940, Long e colaboradores (8), trabalhando exhaustivamente sôbre a ação dos extratos de suprarenal no metabolismo dos hidratos de carbono, e, repetindo as experiências de Britton e Silvette, com ratos normais e adrenalectomizados, confirmaram os resultados destes autores quanto á deposição do glicogenio hepático, não observando entretanto, alterações no glicogenio muscular, o que atribuíram ao método de sacrificar o animal. Em 1942, Reinecke e Kendall (9), retomaram os estudos de Britton e Silvette, sugerindo o emprego do metodo destes autores para a avaliação da potencia dos extratos de suprarenal. Porém, em vez de usar para o teste ratos normais e em jejum, preferem fazer a verificação em ratos adrenalectomizados e em jejum, apesar do emprego de ratos normais e em jejum ser mais economico em tempo, quantidade de extrato e mais simples. Olson e colaboradores,

em 1942 (10), foram convidados pelo Committee on Medical Research para opinar sobre: a) o critério mais exequível para a avaliação da atividade da "cortex" da suprarenal total em extratos; b) a padronização dos métodos de dosagem, suscetíveis de ser reproduzidos em outros laboratórios; c) — a avaliação da potência dos vários extratos, em termos de padrões convenientes. Devidos às várias manifestações da atividade cortical das suprarenaes, escolheram para estudo os quatro métodos mais empregados para testar os extratos, a saber: de Hartman e colaboradores (1941 (11), Grollman (1941), (12), Pfiffner e colaboradores (1934), (13), e, Britton e Silvette, modificado por Reinecke e Kendall (9). Das divergências observadas no comportamento biológico, nos quatro métodos de ensaio com sete extratos diferentes, concluíram, que há dois tipos importantes de atividade nos extratos da "cortex" da suprarenal. A influência dos extratos corticais sobre a função renal e metabolismo inorgânico, foi atribuída às desoxicorticosteronas (esteroides completamente reduzidos no C_{11}), e, a ativação da glicogenogênese e outras reações orgânicas, às corticosteronas (esteroides que são parcialmente oxidados no C_{11}). Como estas atividades são mais ou menos independentes, propuseram como os melhores métodos para a avaliação da atividade da "cortex" da suprarenal, para desoxicorticosteronas, a técnica de Pfiffner, e, para as corticosteronas, a taxa de deposição do glicogênio hepático em ratos adrenalectomizados, em jejum.

Baseados nas conclusões destes autores, procuramos experimentar o método de avaliação dos extratos corticais pela deposição de glicogênio hepático. Estudamos detalhadamente o método, introduzindo algumas modificações na técnica de dosagem. Estabelecemos os valores do glicogênio hepático em ratos normais e adrenalectomizados e em jejum de 24 a 50 horas, empregando os seguintes extratos para a avaliação do teste: extrato aquoso de suprarenal, preparado pela técnica de Swingle e Pfiffner; "Percortol" Ciba; "Syncortyl" Roussel; Supracortin", Labor.

MATERIAL E METODOS

Usamos ratos Wistar, machos, de um a três meses, de 40 a 200g e submetidos a uma dieta padronizada. Os animais adrenalectomizados segundo a técnica de Villela (14), e em jejum de 24 horas, foram injetados de 3 a 8 horas no quinto dia após a adrenalectomia e sacrificados por pancada no occipital. Retiramos o fígado inteiro e imediatamente pesamos em cápsula tarada e com tampa. Obtivemos o glicogênio hepático pelo método de Good, Kramer e Somogyi (15) e, a dosagem foi feita como glicose pela técnica de Haslewood e Strookman por nós adaptada ao fotometro (16).

DIETA

Os ratos, logo depois de separados da mãe, foram divididos em lotes de 10 animais e submetidos à seguintes dieta :

Leite	100,0
Carbonato de Calcio	15,0
Caseina	100,0
Fubá de milho	30,0
Germe de trigo	400,0
Levedo seco	25,0
Oleo de cação	25,0

Todos estes ingredientes foram misturados e adicionados de água até a consistência de pasta, distribuídos em tabuleiros, cortados em pedaços e secos na estufa a 50.°C.

Em cada gaiola colocámos dois bebedouros: um contendo leite e o outro com água. Os ratos foram pesados diariamente durante um mês, observando-se o aumento médio de 3,4g diárias, nos animais de 21-23 dias, e de 1,8g nos de 40 dias; ao atingirem 150g., o aumento foi em média, de 1,3g diários.

ADRENALECTOMIA

Os ratos foram anestesiados com solução de uretana 10% e adrenalectomizados segundo a técnica de Villela. Os animais adrenalectomizados foram mantidos por 4 dias na mesma dieta, substituindo-se apenas a água por solução de cloreto de sódio.

MINISTRAÇÃO DOS EXTRATOS

No 5.º dia pela manhã iniciámos as injeções. Em dois lotes, injetámos o extrato de hora em hora, por 4 horas, e, em 4 lotes, o tratamento foi ministrado por 8 horas, obedecendo o mesmo intervalo entre uma injeção e outra.

Os animais dos dois primeiros lotes foram sacrificados 2 horas após a injeção. Os outros sacrificamos uma hora depois da última injeção.

TÉCNICA PARA A OBTENÇÃO E DOSAGEM DO GLICOGENIO

Para a preparação do glicogenio, seguimos em linhas gerais a técnica de Good, Kramer e Somogyi. O glicogenio obtido, foi dosado como glicose. Em

vez da técnica de Shaffer, Hartman e Somogyi (17), empregada por aqueles autores, usámos a de Haslewood e Strookman, por nós modificada (16).

MATERIAL NECESSÁRIO PARA A PREPARAÇÃO DO GLICOGENIO

1) cápsula de vidro com tampa; 2) tubos Pyrex de 18cm. providos de rolha com tubo condensador; 3) solução aquosa de KOH 30%; 4) álcool etílico 95%; 5) solução de HCl 0.5N; 6) solução de NaOH 0.1N; 7) solução vermelho fenol 0.02% em álcool.

REAGENTES PARA A DOSAGEM DA GLICOSE

1) *Reagente cobre :*

sol. A

Sulfato de Cobre	13,0
Água distilada	1.000ml.

sol. B

Bicarbonato de sódio	50,0
Carbonato de sódio	40,0
Oxalato de potássio	36,0
Tartarato de sódio e potássio	24,0
Água distilada	1.000ml.

Cada um dos componentes é primeiramente dissolvido em pouca água, misturado, completando-se então o volume para 1000 ml.

O reagente cobre é preparado no momento de usar, misturando-se volumes iguais de solução A e B.

2) *Reagente fosfomolibdico (Folin, 1920) .*

Acido molibdico	35,0
Tungstato de sódio	5,0
Hidroxido de sódio 10%	200,ml.

Ferve-se 30' para remover a amonia que sempre contém o acido molibdico. Esfria-se e dilue-se para cerca de 350ml. Adicionam-se 125ml. de ácido fosfórico concentrado 85% ($D = 1,72$) e completa-se o volume para 500ml. com água distilada. Para eliminar completamente a amonia, passa-se uma corrente de ar através da solução no período de resfriamento.

3) *Solução "stock de glicose.* Dissolve-se 1,0 de glicose pura, anídrica, em 1 lt. de solução saturada de ácido benzoico (1%).

Solução Padrão de glicose. Faz-se partindo da solução anterior.

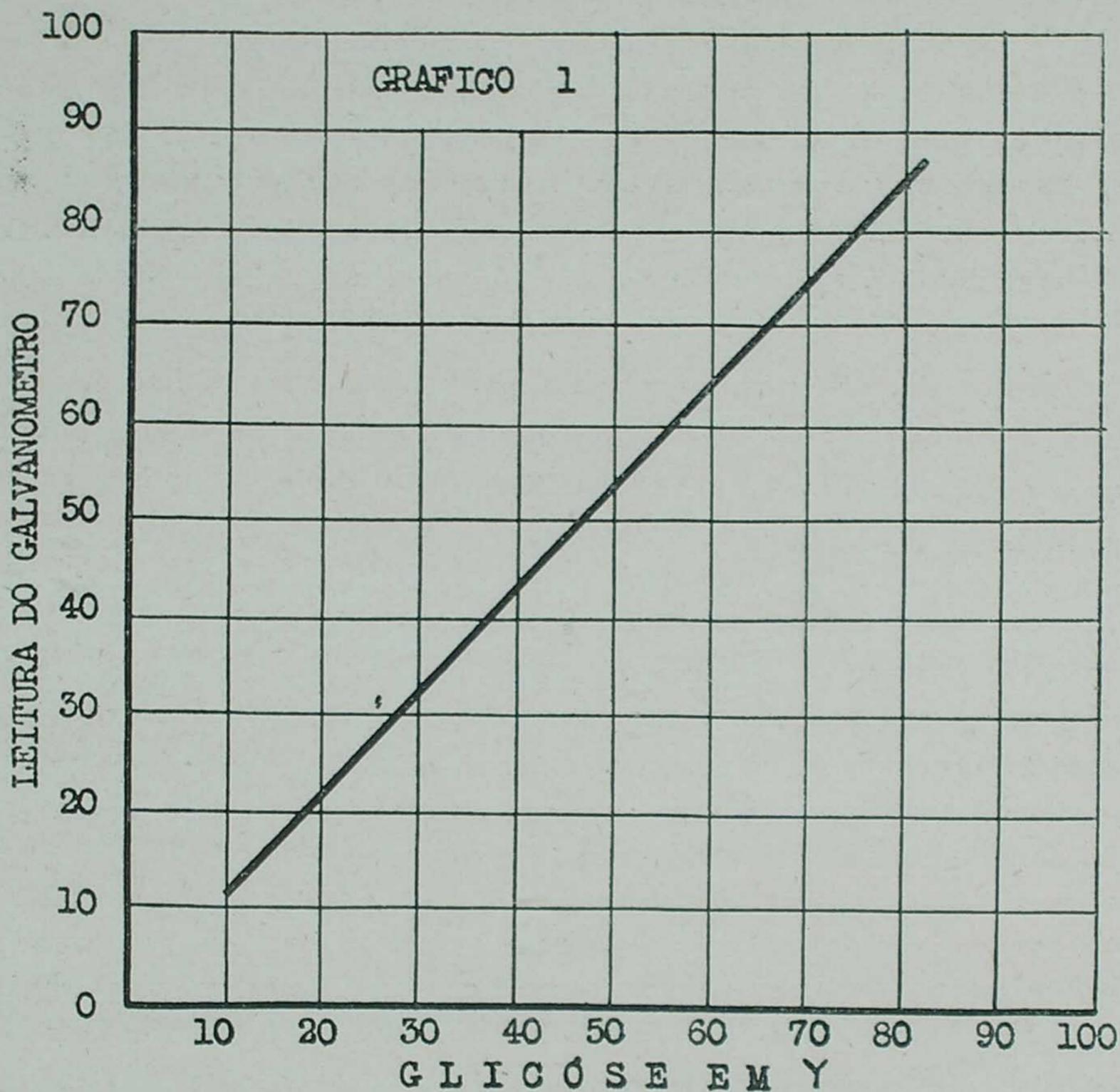
TÉCNICA DE DOSAGEM

Os animais foram mortos por pancada no occipital, o fígado retirado, limpo e rapidamente pesado em cápsula de vidro tarada e com tampa. Logo após, o fígado foi cortado em pedaços, rapidamente para um tubo "Pyrex" contendo 2 ml. de solução aquosa de KOH 30% por g de tecido. Os tubos são fechados e imersos em banho maria fervente onde se deixa ficar por duas horas, agitando-os de vez em quando na primeira hora. Retira-se do banho maria e deixa-se esfriar à temperatura ambiente. Filtra-se, o filtrado é precipitado com 1½ volume de álcool a 95%. Aquece-se até a fervura; deixa-se esfriar (quando não há tempo, pode deixar-se nesta fase até o dia seguinte e à temperatura ambiente). Centrifuga-se, decanta-se o líquido e os tubos são invertidos sobre papel de filtro para exgotar bem. O glicogenio adere ao fundo do tubo. Procede-se então à hidrólise do glicogenio. Junta-se o HCl 0.5N de uma bureta graduada para saber a quantidade de ácido gasto na dissolução do precipitado. Quando a quantidade de glicogenio presente for muito pequena, emprega-se uma solução de HCl mais forte a fim de diminuir o volume final. Arrolham-se os tubos com rolhas providas de tubo condensador. Procede-se então à hidrólise em banho maria fervente por 2½ horas. Retiram-se os tubos do banho e deixam-se esfriar à temperatura ambiente. Adiciona-se uma gota de vermelho fenol e neutraliza-se a solução com soda 0.1N. Mede-se então o volume final que contém o glicogenio que se dosa como glicose. Em tubos de Folin, toma-se 0.1 a 1 ml. do líquido (sempre que se usar quantidade menor que 1 ml. deve-se completar o volume com água destilada). Adiciona-se 1 ml. da mistura do reagente cobre, fecha-se o tubo com o obturador de vidro e leva-se ao banho maria fervente durante 10 minutos; retira-se do banho, esfria-se e juntam-se 3 ml. da solução fosfotungsticamolíbica; agita-se o tubo para desprender todo o gás e esperam-se 15 minutos, findos os quais, faz-se a leitura no colorimetro fotoeletrico de Leitz.

A curva de calibração foi feita com diluições da solução de glicose, contendo de 20 a 100 γ de glicose por ml. (grafico I).

O teor em glicogenio na diluição empregada é encontrado na curva de calibração. Os cálculos são feitos levando em conta o volume, peso do corpo e do fígado. Empregamos a técnica fotoeletrica em vez da por titulação, por ser mais simples, sensível à quantidade mínima de 20 γ e por oferecer a mesma

vantagem do emprego do reagente cúprico que não oxida outras substância não glicídicas.



Os valores representativos do glicogenio hepático dos ratos normais e em jejum, foram expressos em mg. por 100g de peso de corpo e 100g de peso de figado, e encontram-se na tabela I.

Ação da adrenalectomia sôbre o glicogenio hepático

Em 1927, Cori e Cori (2), estudando o metabolismo dos hidratos de carbono, verificaram que o glicogenio hepatico era quase nulo e a glicemia muito baixa nos ratos e camondongos adrenalectomizados. Britton e Silvette (3), dirigindo seus experimentos sôbre a natureza da atividade da "cortex" da suprarenal, sugeriram a relação importante desta atividade com o metabolismo

dos hidratos de carbono. Demonstraram a seguir a ação prepotente desta glândula pela redução nítida da glicemia e do glicogenio hepatico nos animais adrenaoprivos, e a restauração dos mesmos pelos extratos da "cortex" (18). Long e colaboradores, Ingle, Reinecke e Kendall, Olson e colaboradores e outros, encontraram concentrações muito baixas do glicogenio hepatico nos ratos adrenalectomizados e em jejum, confirmando assim os trabalhos de Britton e Silvette. Verificámos a taxa de redução do glicogenio nos nossos ratos adrenalectomizados e mantidos no mesmo regime dietetico a fim de podermos estabelecer ainda que arbitrariamente a atividade dos extratos sôbre a deposição do glicogenio no fígado desses animais.

Os ratos adrenalectomizados foram mantidos na dieta padrão por 4 dias. Em vez de água tiveram solução de cloreto de sódio a 3%. Foram sacrificados 102 a 106 horas após a adrenalectomia, tendo ficado as últimas 24 horas em jejum.

TABELA I

DEPOSIÇÃO DO GLICOGENIO NO FÍGADO DE RATOS MACHOS NORMAIS, EM JEJUM

AUTOR	JEJUM HORAS	Nº. ANI- MAIS	I PESO DO CORPO g.	I PESO DO FÍGADO g.	I GLICOGENIO HEPÁTICO EM MG POR 100G DE PESO DO					
					corpo			FÍGADO		
					Min.	Max.	Méd.	Min.	Max.	Méd.
Cori, Cori.....	24	—	—	—			200	—	—	—
Britton e Silvette.....	24	16	100-150	—	466	1,05	—	—	—	—
Mello.....	24	12	140-200	5,5-10,0	102	516	277	150	1,0	567
Mello.....	50	15	156-170	4,7-7,8	46	77	69	72	133	115

Encontram-se na tabela II os valores encontrados por outros autores e por nós.

AÇÃO DOS EXTRATOS

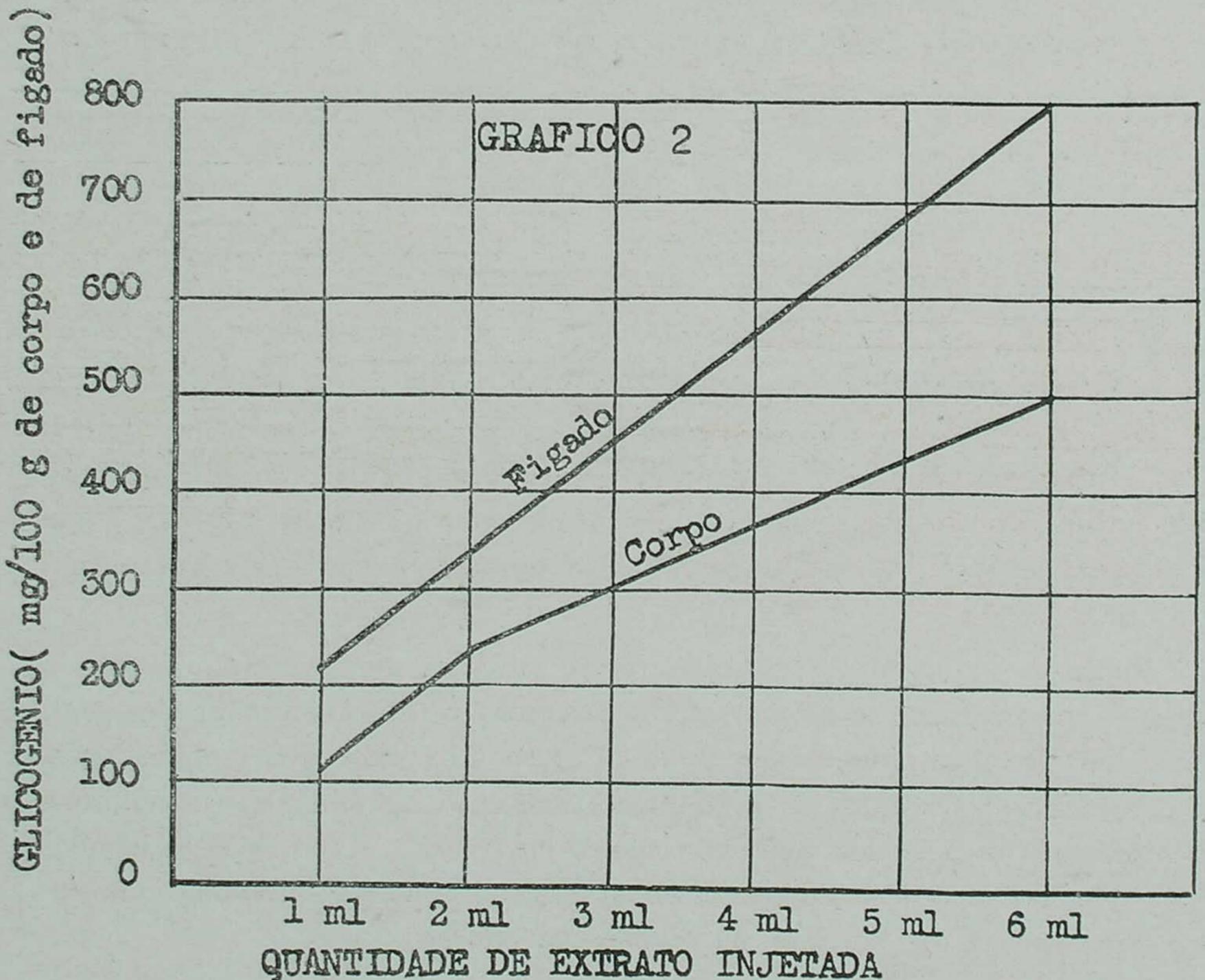
Procurámos verificar a ação e a atividade de alguns extratos de suprarenal. Empregámos dois extratos naturais e duas preparações sintéticas. Conservámos os extratos glandulares na geladeira. No quinto dia após a ablação das suprarenais, iniciámos pela manhã as injeções, que, em alguns casos, foram feitas de hora em hora por oito horas e os animais sacrificados na nona hora, e em outro de duas em duas horas, por seis horas e os animais sacrificados na setima hora. A via de ministração foi subcutanea.

TABELA II

TAXA DA DEPOSIÇÃO DO GLICOGENIO NO FÍGADO DE RATOS MACHOS ADRENALECTOMIZADO E EM JEJUM

AUTOR	JEJUM HORAS	Nº. ANI- MAIS	PESO DO CORPO g.	PESO DO FÍGADO g.	GLICOGENIO HEPÁTICO EM MG. POR 100G DE PESO DO					
					corpo			fígado		
					Min.	Max.	Méd.	Max.	Min.	Méd.
Cori, Cori.....	24	6	122-153	2.81-3.79	119	150	141	—	—	—
Britton e Silvette.....	24	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Reinecke e Kendall.....	24	6	140-160	—	0,10	0,44	—	—	—	—
Mello.....	24	18	48-60	—	0,06	0,21	—	0,82	0,063	—

Na tabela III, registramos os nomes dos extratos empregados, doses de injeções, tempo de ação, peso dos animais, peso dos fígados e as taxas média, máxima e mínima de glicogenio encontrado por 100g de peso de corpo de de fígado, expressas em mg. Com as médias dos valores obtidos com as várias doses do extrato aquoso, construímos o gráfico II.



Deposição do glicogenio hepatico nos ratos adrenalectomizados e injetados

As discrepancias observadas no teor de glicogenio encontrado com os vários extratos, vêm confirmar os trabalhos de Grattan, Jensen, 1940 (19), Reinecke e Kendall em 1943 (20), Olson e colaboradores em 1944 (21) e outros, que só os hormônios da suprarenal que tem um átomo de oxigênio no C₁₁ influenciam o metabolismo dos hidratos de carbono.

TABELA III

DEPOSIÇÃO DO GLICOGENIO HEPÁTICO NOS RATOS MACHOS ADRENALECTOMIZADOS E INJETADOS

MATERIAL INJETADO	N.º DE ANIMAIS	PESO ANIMAL g	QUANTIDADE INJETADA	N.º INJEÇÕES	TEMPO HORA	GLICOGENIO HEPATICO EM MG POR 100g DE PESO DO CORPO E FÍGADO	
						Corpo mg.	Fígado mg.
E. aquoso.....	18	40-60	27-60g	4	5	18-125	23-223
E. aquoso.....	12	140-200	48-240g	8	8	105-421	200-800
Percortol (Ciba).....	10	45-50	1,7-3mg	4	6	0,056-0,089	0,082-0,210
Percortol (Ciba).....	10	100-170	1-3mg	8	8	—	0,082-0,120
Syncortyl (Roussel).....	10	100-130	1-2mg	8	8	—	0,072-0,243
Supracortin (Labor).....	10	80-120	1.5-2,0-	8	6	—	123-398

O Supracortin contém \pm 30,0g de glandula fresca por ml.

AVALIAÇÃO DA POTENCIA DE UM EXTRATO. DEFINIÇÕES

Varias tem sido as proposições sobre o modo de expressar a potência de um extrato de suprarenal.

Britton e Silvette (6) consideram um extrato ativo, quando 1ml do extrato correspondendo a 40g de glandula fresca, por 25g de peso de rato, injetado intraperitonealmente, em ratos jovens de mais ou menos 50g, em jejum de 3 horas, levanta o glicogenio hepatico de aproximadamente 1% em um período de 2 horas.

Reinecke e Kendall (9), propuseram como base mais satisfatoria para a avaliação da potência de um extrato, a determinação da quantidade de glicogenio depositada no figado por 100g de peso do corpo após a ministração de quantidades crescentes da preparação padrão, e, determinação simultanea da resposta á injeção dos mesmos volumes da solução de potência desconhecida. A comparação dos dois resultados, indica a atividade fisiologica da solução desconhecida em termos da preparação padrão.

Olson e colaboradores (10), sugeriram o uso da corticosterona como referencia padrão para a dosagem do glicogenio, e apresentaram a seguinte definição de unidade: Uma unidade de atividade glicogenica, é igual á potencia de 1 micrograma de corticosterona, ministrada em 4 doses, de duas em duas horas, a ratos adrenalectomizados e em jejum de 24 horas.

Como não possuimos a corticosterona padrão, resolvemos adotar como índice da potência de um extrato, a quantidade mínima capaz de elevar o glicogenio hepatico de 2/3 da média encontrada para os ratos normais, mantidos nas mesmas condições dos adrenalectomizados.

CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos, podemos concluir :

1) A deposição do glicogenio hepatico nos animais normais e em jejum apresentam valores aproximados, levando-se em consideração, a dieta, a idade e o peso dos animais. Nos animais em crescimento os valores são menos concordantes.

2) Quando se ministram doses correspondentes a 15g de glandula fresca de hora em hora, sacrificando-se o animal na quinta hora após a primeira injeção, encontra-se um aumento de $\pm 20\%$ do glicogenio hepático.

3) Injetando-se de 2 em 2 horas por 8 horas, doses correspondentes a 30g de glândula fresca, e sacrificando-se o animal na manhã seguinte, isto é, 16 horas após a última injeção, encontram-se valores 4 a 5 vezes menores que nos animais do mesmo lote e sacrificados na 9.º hora após a primeira injeção.

4) Os extratos sintéticos não provocaram deposição de glicogenio porque os valores encontrados são praticamente os mesmos que para os animais adrenalectomizados e nas mesmas condições do teste.

5) As vantagens que encontramos neste método sobre o ponderal e de sobrevida por nós empregados habitualmente, foram além da sua alta especificidade, a diminuição do tempo de resposta, o número menor de injeções e menor quantidade de extrato gasta. Envolve porém operações mais delicadas, o que talvez possa dificultar a generalização do seu emprego.

6) Com o extrato contendo vitamina C obtivemos valores mais altos para o glicogenio. Isto foi um dos fatos que nos levou a investigar a ação de soluções puras de ácido ascorbico sobre a deposição do glicogenio hepático, o que será motivo de comunicação ulterior.

Desejamos consignar os nossos sinceros agradecimentos á Firma Labor-terápica S. A., de São Paulo, pelos extratos suprarenais, e á Ciba S. A., pelas amostras de "Percortol", empregadas neste trabalho.

SUMMARY

Studies have been carried out on the method of Britton and Silvette modified by Reinecke and Kendall, for the evaluation of cortico-adrenal extracts, based on the deposition of glycogen in the liver of adrenaletomized rats. The test was performed in a total of 180 normal and adrenalectomized rats. The extracts tested were: a) an aqueous extract of cortico-adrenal cortex prepared by the Swingle and Pfiffner technique; b) the same extract added with ascorbic acid (Supracortin Labor); c) desoxycorticosterone acetate (Percortol Ciba and Syncortyl Roussell).

Male rats were used, ranging from 40-200g, fed since the 18 th days old with a special diet, in which they were maintained until the day before the injection. Adrenalectomy was performed under urethane anesthesia. The fourth day after operation, food was removed and they were fasted for 24 hours. In the morning of the fifth day, injections of the material to be assayed were given at hourly and two hours intervals, during four to eight hours. One or two hours after the last injection, the animals were sacrificed, the livers removed and dropped into a hot 30% solution of potassium hydroxide, and worked by Good, Kramer and Somogyi method. The glycogen was calculated as milligrams per 100g of body and liver weight. The results obtained are shown in the tables I, II, and III. When several dosages of the same sample of extract were made (5 animals each dose), the amount of glycogen deposited in the liver per 100g of body and liver weight, was found to be a positive function of the dose injected. The graph 2, shows these results. The synthetic compounds were ineffective. Our results are in agreement with those of Reinecke and Kendall and of Olson et al.

BIBLIOGRAFIA

1. PORGES (O)
1910. Zur Pathologie des Morbus Addison Ueber Glykogenschund nach doppelseitiger Nebennierenexstirpation bei Hunden. Zeitschr. f. Klin. Med. 70, 243-50.
2. CORI (C. F.) e CORI (G. T.)
1927. The fate of sugar in the animal body. VII. The carbohydrate metabolism of adrenalectomized rats and mice. Jour. Biol. Chem. 74, 473-494.
3. BRITTON (S. W.) e SILVETTE (H)
1932. The apparent prepotent function of the adrenal glands. Am. J. Physiol. 100, 701.
4. BRITTON (S. W.)
1932. Evidence on the chief function of the adrenal cortex. Endocrinol. 16, 6, 633-634.
5. SILVETTE (H) e BRITTON (S. W.)
1932. Carbohydrate changes in emotion, exercise and exposure to cold. Am. Journ. Physiol. 101, 1, 94.

6. BRITTON (S. W.) e SILVETTE (H)
1932. Effects of cortico-adrenal extract on carbohydrate metabolism in normal animals. *Am. Jour. Physiol.* 100, 693-700.
7. THADDEA (S)
1935. Nebennierenrinde und Kohlehydratstoffwechsel. Experimentelle Untersuchungen über die funktionelle Bedeutung der Nebennierenrinde zum Gesamtkohlehydratstoffwechsel. *Zeitschr. f. d. ges. exper. Med.* 95, 600.
8. LONG (C.N.H.), KATZIN (B) e FRY (E.G.)
1940. The adrenal cortex and carbohydrate metabolism. *Endocrinol.* 26, 2, 309-44.
9. REINECKE (R. M.) e KENDALL (E. C.)
1942. Method for bioassay of hormones of adrenal cortex which influence deposition of glycogen in the liver. *Endocrinol.* 31, 6, 573-577.
10. OLSON (R.O.), JACOBS (F. A.), RICHERT (D), THAYER (S. A.), KOPP (L. J.) e WADE (N. J.)
1944. The comparative bioassay of several extracts of the adrenal cortex in tests employing four separate physiological responses. *Endocrinol.* 35, 6, 430-455.
11. HARTMAN (F. A.), LEWIS (L. A.) e THATSCHER (J. S.)
1941. Assay of sodium retaining substances. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 48, 1, 60-64.
12. GROLLMAN (A)
1941. Biological assay of adrenal cortical activity. *Endocrinol.* 29, 855-861.
13. PFIFFNER (J. J.), SWINGLE (W W.) e VARS (H. M.)
1934. The cortical hormone requirement of the adrenalectomized dog, with special reference to a method of assay. *Jour. Biol. Chem.* 104, 701-716.
14. VILLELA (G. G.) e QUENTAL (J. B.)
1938. *Hormônios*, 72-74. Livraria Odeon. Rio de Janeiro.
15. GOOD (C. A.), KRAMER (H) e SOMOGYI (M)
1933. The determination of glycogen. *Jour. Biol. Chem.* 100, 458-491.
16. MELLO (M. I.)
1939. Micro-metodo para a dosagem da glicose verdadeira do sangue. *Acta Med.* 4, (5), 3.
17. SOMOGYI (M.)
1937. A reagent for the copper-iodometric determination of very small amounts of sugar. *J. Biol. Chem.* 117, 771-776.
18. BRITTON (S. W.) e SILVETTE (H)
1932. Effects produced by cortico-adrenal extract on normal animals. *Am. Journ. Physiol.* 101, 1. 13.
19. GRATTAN (J. F.) e JENSEN (H.)
1940. The effect of the pituitary adrenocorticotropic hormone and of various adrenal cortical principles on insulin hypoglycemia and liver glycogen. *Jour. Biol. Chem.* 135, 511-517.
20. REINECKE (R. M.) e KENDALL (E. C.)
1943. A comparison of the influence of some crystalline hormones of the adrenal cortex on the deposition of glycogen in the liver. *Endocrinol.* 32, 6, 505-508.
21. OLSON (R. E.), THAYER (S. A.) e KOPP (L. J.)
1944. The glycogenic activity of certain crystalline steroids of the adrenal cortex when administered singly and with cortical extract to fasted, normal and adrenalectomized rats 1. *Endocrinol.* 35, 6, 464-472.