

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS,  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA, LA PLATA

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA  
(Director: Prof. R. R. BRENNER)

CÁTEDRA DE FISIOLÓGIA CON BIOFÍSICA  
(Director: Prof. H. CINGOLANI)

## TIME-DEPENDENT EFFECT OF AN ORAL HYPOGLYCEMIC AGENT UPON SERUM GLUCOSE LEVELS

JUAN J. GAGLIARDINO \*      MARÍA T. PESSACQ \*\*      OSCAR MARCOTE  
(with the technical assistance of ELMA E. GAGLIARDINO)

*Oral hypoglycemic agents represent a useful tool in the treatment of maturity-onset diabetes<sup>2, 13, 14</sup>. Many experimental studies have been carried out in an effort to clarify the mechanism of their hypoglycemic action<sup>12</sup>. Although several hypotheses have been suggested concerning the intrinsic mechanism, it is generally agreed that their effect is mainly mediated through B-cell insulin release<sup>11</sup> and also, presumably, by their blocking effect on glucagon secretion<sup>13</sup>. We have recently reported that the B-cell does not release the same amount of insulin throughout the day at least when challenged by glucose<sup>9</sup>. On the other hand, the effect of insulin upon serum glucose<sup>10</sup>, protein synthesis<sup>8</sup> and glycogen content in muscle<sup>10</sup> also undergoes circadian variation. Thus, we assumed that it should be profitable to investigate the effect upon serum glucose levels of a constant dosage of a hypoglycemic agent administered at different times during the day. For this purpose, normal mice were injected with glibenclamide*

EFFETTO DI UN IPOGLICEMIZZANTE ORALE SUI LIVELLI GLICEMICI IN FUNZIONE DEL TEMPO. Gli antidiabetici orali rappresentano un utile mezzo per il trattamento del diabete dell'età matura<sup>2, 13, 14</sup>. Numerose sono le ricerche sperimentali condotte nel tentativo di chiarire il meccanismo della loro azione ipoglicemizzante<sup>12</sup>. Sebbene molte ipotesi siano state formulate riguardo al loro intrinseco meccanismo, si concorda generalmente nel ritenere che l'effetto di queste sostanze sia mediato principalmente attraverso la liberazione di insulina da parte delle cellule B<sup>11</sup> e, forse, attraverso un'azione di blocco della secrezione di glucagone<sup>13</sup>. Abbiamo recentemente segnalato che la cellula B non libera la stessa quantità di insulina nel corso delle 24 h, per lo meno in risposta alla stimolazione con glucosio<sup>9</sup>. D'altro canto, anche gli effetti dell'insulina sulla glicemia<sup>10</sup>, sulla sintesi proteica<sup>8</sup> e sul contenuto in glicogeno del muscolo<sup>10</sup> sono soggetti a variazioni circadiane. Abbiamo pertanto ritenuto uti-

\* Member of the Carrera del Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) de la República Argentina.

\*\* Fellow of the CONICET.

Key-words: Circadian rhythms; Glibenclamide; Oral hypoglycemic agents; Time-dependent hypoglycemia.

Data di arrivo in Redazione 5-2-1973.

Acta diabet. lat. 10, 841, 1973.

at 4-h intervals, and serum glucose changes were recorded.

## METHODS

In this experiment, 8-weeks' old mice of the C3H-S strain were used. The animals were caged in groups of 10 in a room under constant conditions of temperature and humidity. The lighting in the room (fluorescent light 40 W) was arranged so as to have 12-h light (from 6.00 a.m. to 6.00 p.m.) and 12-h darkness (from 6.00 p.m. to 6.00 a.m.). The feeding and activity habits of these animals have been previously reported<sup>5</sup>. Briefly, they engage in food intake and activity during the dark period. Therefore, in order to compare the results obtained with these animals to human data, the darkness and light periods are named respectively activity and resting periods.

Lots of 20 animals each were sacrificed by decapitation at midnight, 4.00 a.m., 8.00 a.m., noon, 4.00 p.m. and 8.00 p.m. on different days. Each time, 4 control animals were sacrificed and the remaining animals were injected i.p. with glibenclamide (50 µg/kg) and subsequently killed in groups of four 45, 90, 180 and 360 min after injection. In each animal, both of the control and treated group, a blood specimen was obtained from the retro-orbital plexus through a heparinized capillary tube<sup>15</sup>. Glucose levels were determined in these samples with the o-toluidine method<sup>4</sup>. The amount of glibenclamide injected had previously been proved to be the minimal dosage apt to produce a significant drop in serum glucose level. The intervals at which blood samples were drawn had also been previously selected taking into account the time elapsed before glucose levels reached preinjection values.

The experimental data were statistically processed by analysis of variance<sup>3</sup>. The regression curves throughout the 360 min interval following glibenclamide administration were also obtained for every 4-h period.

## RESULTS

Serum glucose values expressed in mg/100 ml are listed in tab 1. Statisti-

le esaminare l'effetto esercitato sui livelli glicemici da una dose costante di un ipoglicemizzante somministrato in differenti momenti della giornata. A questo scopo, abbiamo eseguito, in topi normali, iniezioni di glibenclamide ad intervalli di 4 h, registrando quindi le modificazioni glicemiche.

## METODI

Nel presente esperimento abbiamo impiegato topi di 8 settimane di età, appartenenti al ceppo C3H-S. Gli animali venivano tenuti in gabbie in gruppi di 10, in un ambiente a temperatura ed umidità costanti. L'illuminazione dell'ambiente (luce fluorescente 40 W) era disposta in modo da avere 12 h di luce (dalle ore 6 alle ore 18) e 12 h di oscurità (dalle ore 18 alle ore 6). Le abitudini di questi animali per quanto riguarda l'alimentazione e l'attività sono state descritte in precedenza<sup>5</sup>. Riassumendo, essi assumono il cibo e svolgono la loro attività durante il periodo di oscurità. Pertanto, allo scopo di confrontare i risultati ottenuti in questi topi con i dati relativi all'uomo, i periodi di oscurità e di luce vengono chiamati rispettivamente periodo di attività e di riposo.

Gli animali, in gruppi di 20 ciascuno, venivano uccisi per decapitazione alle ore 0, 4, 8, 12, 16 e 20, in giorni diversi. Ogni volta venivano sacrificati 4 animali di controllo, mentre ai restanti venivano somministrati i.p. 50 µg/kg di glibenclamide; questi venivano quindi uccisi, in gruppi di 4 animali, dopo 45, 90, 180 e 360 min dall'iniezione. Ad ogni animale, sia di controllo che trattato, veniva prelevato dal plesso retro-orbitale, per mezzo di un tubo capillare eparinizzato<sup>15</sup>, un campione di sangue. Su tali campioni si procedeva alla determinazione della glicemia (siero) con il metodo della o-toluidina<sup>4</sup>. La dose di glibenclamide iniettata era stata determinata in precedenza come la quantità minima della sostanza in grado di provocare una caduta significativa del livello glicemico. Anche gli intervalli tra i prelievi erano stati scelti in precedenza, tenendo conto del tempo trattisticamente per mezzo dell'analisi della valori basali.

I dati sperimentali sono stati elaborati statisticamente per mezzo dell'analisi della varianza<sup>3</sup>. Per ciascun periodo di 4 h sono state inoltre ottenute le curve di regressione per tutti i 360 min successivi alla somministrazione della glibenclamide.

## RISULTATI

Nella tab. 1 sono riportati i valori sierici del glucosio espressi in mg/100

time	control	min after glibenclamide injection (50 µg/kg i.p.)			
		45	90	180	360
midnight	95	69	52	66	118
	114	100	66	104	125
	114	92	62	76	125
	72	55	66	92	112
	$\bar{x}$	99	79	62	85
4.00 a.m.	137	108	69	80	144
	175	138	112	127	157
	100	150	123	144	104
	112	102	118	116	116
	$\bar{x}$	131	125	106	117
8.00 a.m.	130	135	150	140	170
	122	135	112	143	140
	160	97	105	96	160
	130	102	115	110	175
	$\bar{x}$	136	117	121	122
noon	112	160	100	115	108
	115	110	88	177	104
	148	143	105	200	143
	135	125	100	155	112
	$\bar{x}$	128	135	98	162
4.00 p.m.	112	108	93	73	112
	157	100	75	45	130
	150	130	70	60	130
	143	95	88	62	100
	$\bar{x}$	141	108	82	60
8.00 p.m.	114	95	87	39	87
	92	97	59	62	84
	104	90	82	87	92
	74	97	62	69	92
	$\bar{x}$	96	95	73	64

Table 1 - Serum glucose levels expressed in mg/100 ml.

Livelli sierici del glucosio espressi in mg/100 ml.

*cal analysis showed the magnitude of the glucose drop induced by glibenclamide to be significantly different for the 6 periods studied ( $p < 0.01$ ). The sequential changes observed during the 360-min interval for each period were also significantly different ( $p < 0.01$ ).*

*Figs 1, 2, 3 and 4 show the regression curves obtained at midnight, 8.00 a.m., 4.00 p.m. and 8.00 p.m. No regression curves were obtained at 4.00 a.m. and noon. It is evident from these figures that neither the depth nor the duration of the glibenclamide-induced hypoglycemia were the same through the day. While the lowest glucose values after drug administration were recorded at 4.00 p.m., 8.00 p.m. and midnight, hypoglycemia was less marked at the other times studied, becoming almost negligible at noon. The time elapsed before blood glucose returned to preinjection levels equally varied with the time of day, being longest at 4.00 p.m. and 8.00 p.m. (360 min) and shortest at noon. No relationship was detected between the glucose changes produced by glibenclamide and the serum glucose levels of the control animals.*

## DISCUSSION

*The serum glucose levels observed in our control animals displayed a clear fluctuation during the 24-h period. The distribution of peak and trough values along all the day was similar to the one already described for this strain of mice kept under the same environmental conditions<sup>7, 10, 17</sup>. Although the same amount of glibenclamide was administered every time, the degree of the hypoglycemia obtained was far from constant. It was observed that both the depth and duration of hypoglycemia were significantly different throughout the day. These findings clearly demonstrate a time-dependence of the glibenclamide effect upon serum glucose levels. It has already been mentioned that this*

*ml. L'analisi statistica dimostra che l'entità della caduta glicemica provocata dalla glibenclamide è significativamente diversa per i 6 periodi studiati ( $p < 0,01$ ). Le modificazioni sequenziali osservate durante l'intervallo di 360 min per ciascun periodo differiscono anch'esse in maniera significativa ( $p < 0,01$ ).*

*Nelle figg. 1, 2, 3 e 4 sono riportate le curve di regressione ottenute alle ore 0, 8, 16 e 20; alle ore 4 e alle ore 12 tali curve non sono state tracciate. Da queste figure risulta evidente che né l'entità né la durata dell'ipoglicemia indotta dalla glibenclamide sono le stesse nel corso dell'intera giornata. Mentre i più bassi valori glicemici dopo la somministrazione del farmaco si sono registrati alle ore 16, 20 e 0, l'ipoglicemia è apparsa meno marcata agli altri tempi studiati e quasi trascurabile alle ore 12. Il tempo trascorso prima del ritorno della glicemia al livello di base varia anch'esso a seconda dell'ora del giorno, risultando più lungo alle ore 16 e alle ore 20 (360 min) e più breve alle ore 12. Tra le modificazioni glicemiche indotte dalla glibenclamide ed i livelli sierici del glucosio degli animali di controllo non è stato evidenziato alcun rapporto.*

## DISCUSSIONE

*I livelli glicemici osservati nei nostri animali di controllo presentano nette fluttuazioni nel corso delle 24 h. La distribuzione dei minimi e massimi nell'arco della giornata è simile a quella già descritta per questo ceppo di topi mantenuti in identiche condizioni ambientali<sup>7, 10, 17</sup>. Sebbene si somministrasse ogni volta la stessa dose di glibenclamide, il grado dell'ipoglicemia ottenuta era tutt'altro che costante. Si è visto che sia l'intensità che la durata dell'ipoglicemia sono significativamente diverse nel corso della giornata. Questi reperti dimostrano chiaramente la dipendenza dal tempo dell'effetto della glibenclamide sui livelli glicemici. Si è già accennato al fatto che queste variazioni*

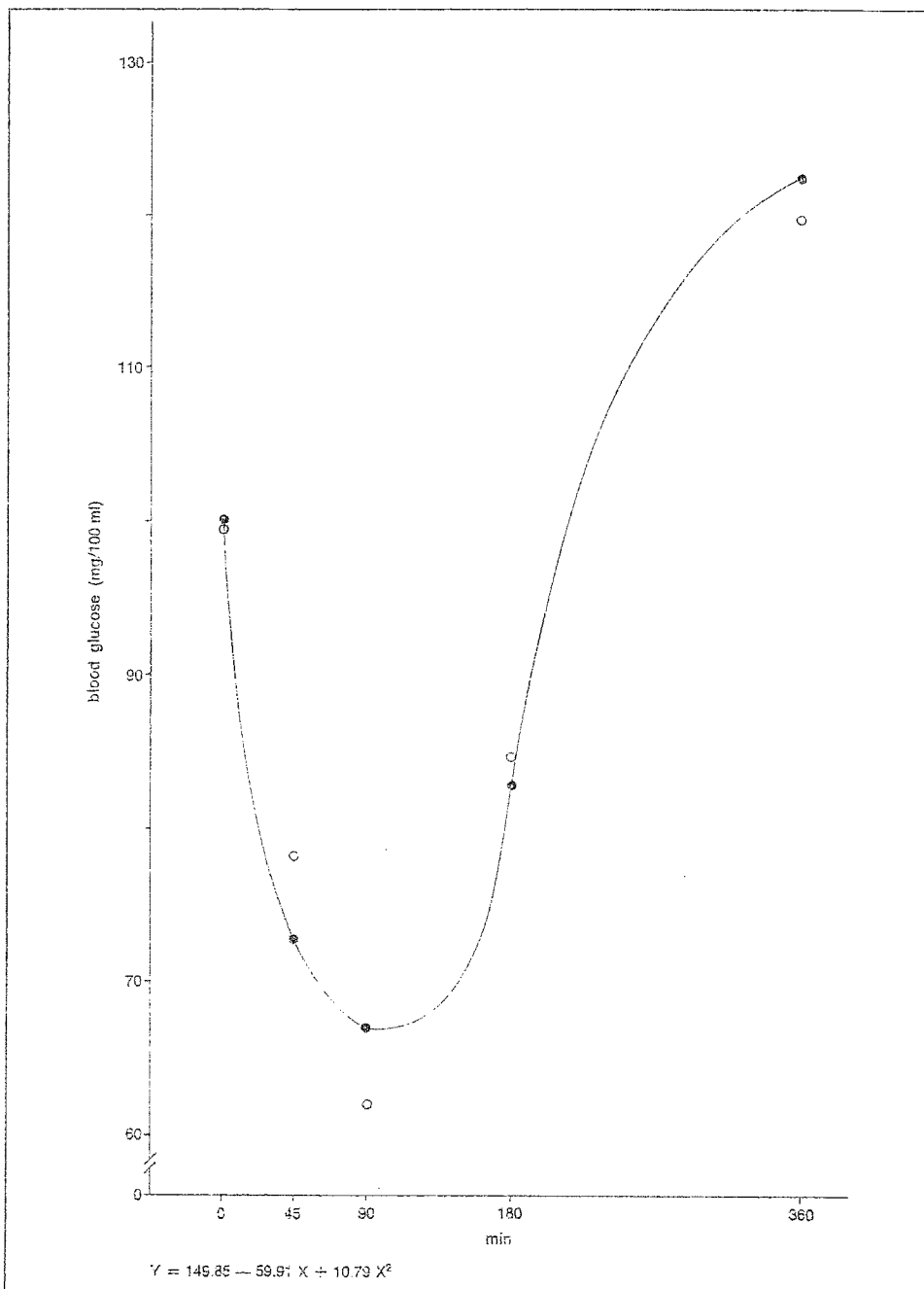


Fig. 1 - Midnight period: the regression curve is shown together with the experimental means obtained at each sampling time. After a marked drop the glucose values almost returned to the preinjection level 180 min after glibenclamide injection. At 360 min the glucose levels were above the control values.

Periodo delle ore 0: curva di regressione e medie sperimentali per ciascun tempo di prelievo. Dopo una marcata diminuzione dei valori glicemici, questi ritornano a livelli prossimi a quelli basali a 180 min dall'iniezione di glibenclamide. A 360 min, la glicemia è superiore ai valori dei controlli.

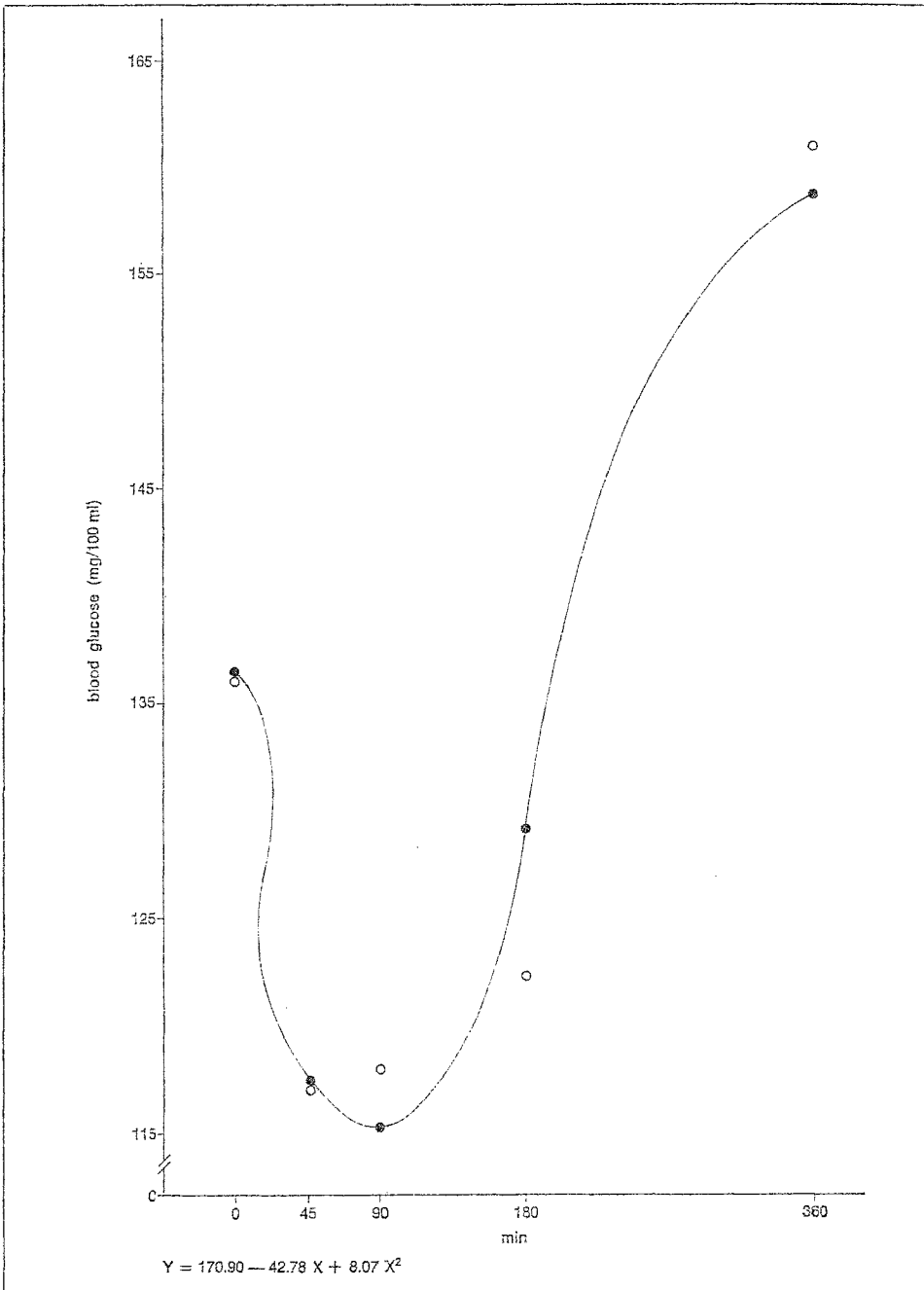


Fig. 2 - Eight a.m. period: the regression curve is shown together with the experimental means obtained at each sampling time. Moderate hypoglycemia was observed with almost complete recovery 180 min after the injection. As in the midnight period, at 360 min the serum glucose levels were above the control values.

Periodo delle ore 8: curva di regressione e medie sperimentali per ciascun tempo di prelievo. Si osserva modesta ipoglicemia, con ripristino quasi completo entro 180 min dall'iniezione. Come per il periodo delle ore 0, a 360 min i livelli sierici del glucosio sono superiori a quelli dei controlli.

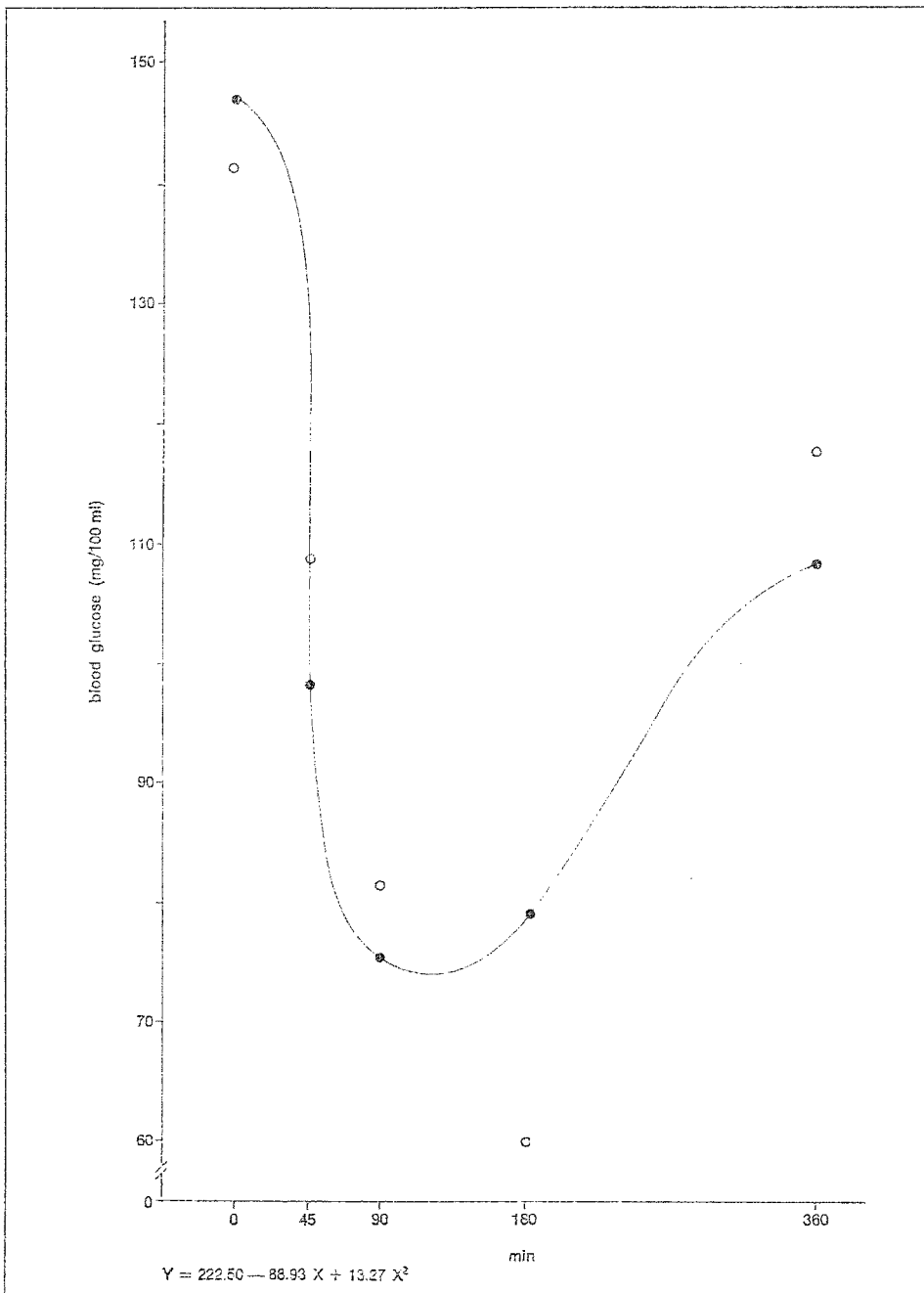


Fig. 3 - Four p.m. period: the regression curve is shown together with the experimental means obtained at each sampling time. A sharp drop in blood glucose level was observed, reaching its lowest value 180 min after glibenclamide injection. At 360 min the serum glucose levels still remained below control values.

Periodo delle ore 16: curva di regressione e medie sperimentali per ciascun tempo di prelievo. Si osserva marcata caduta dei livelli glicemici, che raggiungono il valore minimo dopo 180 min dall'iniezione di glibenclamide. A 360 min, la glicemia è ancora inferiore a quella dei controlli.

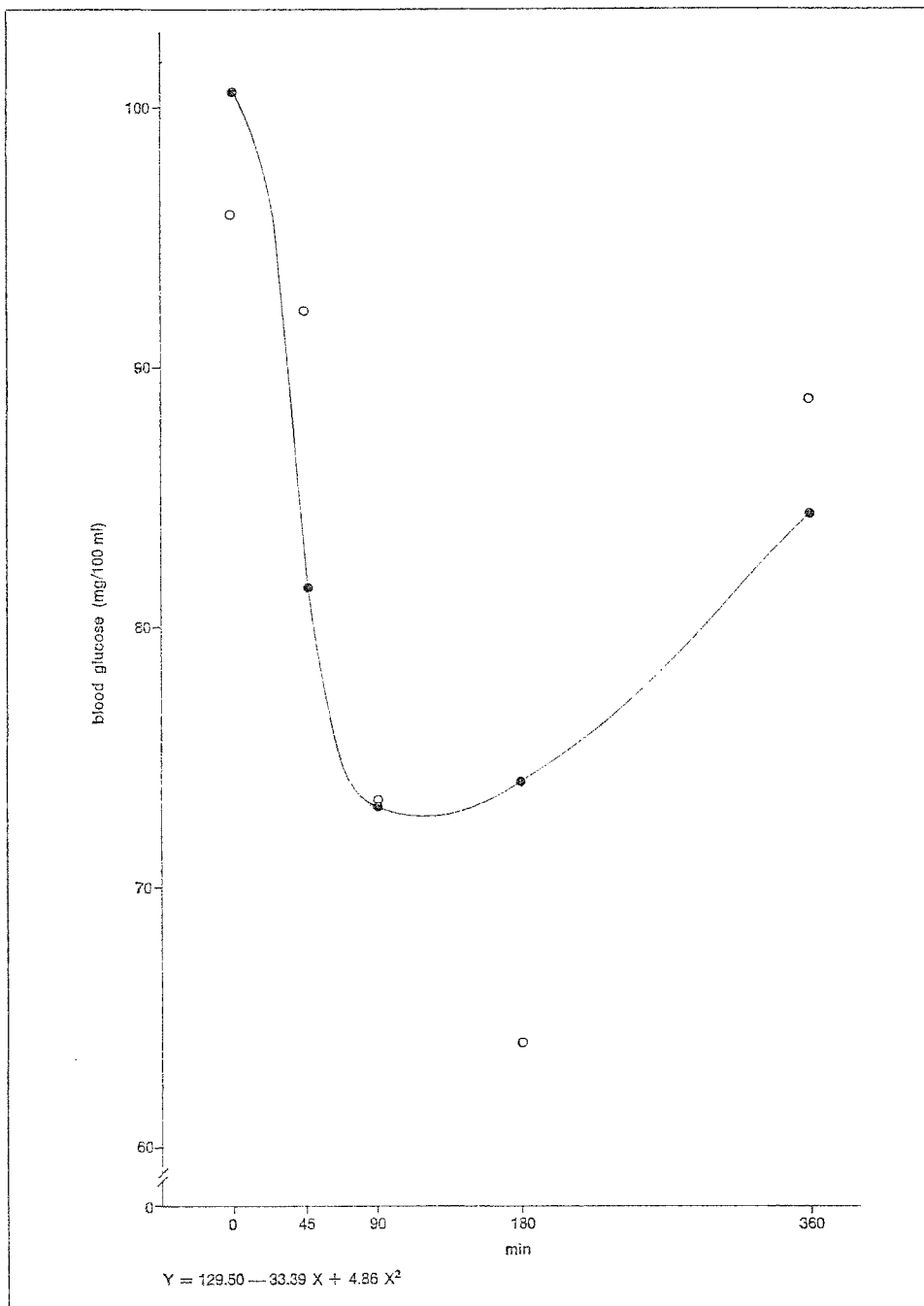


Fig. 4 - Eight p.m. period: the regression curve is shown together with the experimental means obtained at each sampling time. As in the 4.00 p.m. period, progressive hypoglycemia was observed 180 min after glibenclamide injection. At 360 min serum glucose was still below the control level.

Periodo delle ore 20: curva di regressione e medie sperimentali per ciascun tempo di prelievo. Come per il periodo delle ore 16, si osserva progressiva ipoglicemia, con valore minimo dopo 180 min dall'iniezione di glibenclamide. A 360 min, la glicemia è ancora al disotto dei valori dei controlli.



*circadian variation of glibenclamide response is not related to the levels of serum glucose found in the control animals. Thus, the circadian variation of the drug effect should not be ascribed to the aforementioned serum glucose rhythm.*

*It is a widespread concept that the hypoglycemic effect of glibenclamide is mediated through pancreatic insulin release<sup>6, 10</sup>. On the other hand, we have previously shown that B-cell insulin secretion exhibits a circadian rhythm when glucose is used as stimulus. Hence, it might be possible that the 24-h variation observed in the glibenclamide response is the consequence of a circadian variation of insulin release elicited by the drug.*

*We have recently reported that the injection of a constant dosage of insulin at different points of time during the day produced a time-dependent effect upon carbohydrate<sup>10</sup> and protein<sup>8</sup> metabolism in mice. Therefore, this circadian variation of insulin effectiveness may also be involved in the above described rhythm of glibenclamide-induced hypoglycemia.*

*Although the intrinsic mechanism responsible for the diurnal variations in glibenclamide action on the serum glucose level still remains in the field of conjecture, some practical applications can be drawn from our results. From the pharmacological point of view, it becomes clear that a dose-response study performed at any arbitrary time of a day is apt to yield deceptive results. Similarly, our results should explain the improved control obtained in patients when glibenclamide was administered in divided doses throughout the day, instead of a single one<sup>1</sup>. Therefore, it may be advisable to adapt the dosage schedule of this compound to the diurnal variations of its efficacy in the 24-h period.*

*Clinical experiments are necessary to prove this hypothesis.*

circadiane della risposta alla glibenclamide non sono correlate alla concentrazione sierica del glucosio negli animali di controllo. Pertanto, le variazioni circadiane dell'effetto del farmaco non dovrebbero essere attribuite a tale ritmo del glucosio sierico.

È opinione diffusa che l'azione ipoglicemizzante della glibenclamide sia mediata attraverso la liberazione di insulina dal pancreas<sup>6, 16</sup>. D'altro canto, abbiamo precedentemente dimostrato che, se si usa il glucosio quale stimolo, la secrezione dell'ormone da parte delle cellule B presenta un ritmo circadiano. Le variazioni nella risposta alla glibenclamide osservate nell'arco delle 24 h potrebbero essere quindi la conseguenza di variazioni circadiane della liberazione insulinica indotta dal farmaco.

Recentemente, abbiamo segnalato che l'iniezione di una dose costante di insulina in ore diverse della giornata produce nel topo un effetto dipendente dal tempo sul metabolismo glicidico<sup>10</sup> e protidico<sup>8</sup>. Pertanto, tali variazioni circadiane nell'efficacia dell'insulina potrebbero contribuire anch'esse a determinare il ritmo sopradescritto dell'ipoglicemia indotta dalla glibenclamide.

Sebbene l'intrinseco meccanismo responsabile delle variazioni diurne dell'azione della glibenclamide sul livello glicemico rimanga tuttora nel campo delle congetture, alcune conclusioni di ordine applicativo-pratico possono essere tratte dai nostri risultati. Dal punto di vista farmacologico, diviene chiaro che uno studio sul rapporto dose-risposta condotto in un momento qualsiasi della giornata rischia di fornire risultati capaci di indurre in errore. Analogamente, i nostri risultati potrebbero spiegare il migliore compenso che si ottiene allorché la glibenclamide viene somministrata ai pazienti in dosi refratte nel corso dell'intera giornata, anziché in una unica dose<sup>1</sup>. Potrebbe pertanto essere consigliabile adattare lo schema posologico del medicamento alle variazioni della sua efficacia nel corso delle 24 h.

Esperimenti clinici dovranno confermare questa ipotesi.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to Dr. J. M. Echave Llanos for kind provision of mice. We also thank Drs M. Bertholds and N. J. Apaticio through whom *Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt a. M.* (Federal Republic of Germany), provided HB 419 (glibenclamide, Daonil®) for this study.

## RIASSUNTO

Una dose costante di glibenclamide (50 µg/kg i.p.) è stata somministrata a topi normali, ad intervalli di 4 h nel corso della giornata. Prelievi di sangue per il dosaggio della glicemia sono stati praticati fino a 360 min dopo l'iniezione della sostanza. Né l'entità né la durata dell'ipoglicemia indotta dalla glibenclamide sono risultate costanti durante l'intera giornata. Questi risultati dimostrano l'esistenza di un ritmo circadiano nell'effetto della sulfanilurea sulle concentrazioni sieriche del glucosio. Essi inducono a ritenere che l'elaborazione di uno schema cronologico per la somministrazione del farmaco lungo l'arco delle 24 h dovrebbe consentire una migliore regolazione della glicemia.

## RÉSUMÉ

Une dose constante de glibenclamide (50 µg/kg i.p.) a été administrée à des rats normaux par intervalles de 4 h au cours de la journée. On a effectué des prélèvements de sang, pour le dosage du glucose, jusqu'à 360 min après l'injection. Ni le niveau, ni la durée de l'hypoglycémie provoquée par le glibenclamide sont résultats constants pendant toute la journée. Ces résultats démontrent l'existence d'un rythme circadien relatif à l'effet du glibenclamide sur le niveau du glucose dans le sérum et font, en outre, penser que, en élaborant une ordonnance pour l'administration du médicament pendant la journée, on pourrait obtenir une meilleure régulation de la glycémie.

## RESUMEN

Ha sido suministrada a ratones normales y a intervalos de 4 h en el curso del día, una dosis constante de glibenclamida (50 µg/kg i.p.). Se han efectuado extracciones de sangre para la dosificación de la glucemia hasta los 360 min después de la inyección de la substancia. Tanto la entidad como la duración de la hipoglucemia inducida por la glibenclamida no resultaron constantes durante todo el día. Estos resultados demuestran la existencia de un ritmo circadiano en el efecto de la sulfanilurea sobre las concentraciones séricas de la glucosa y, además, nos inducen a suponer que la elaboración de un esquema cronológico para el suministro del producto en el arco de las 24 h debería permitir una regulación mejor de la glucemia.

## ZUSAMMENFASSUNG

Eine gleiche Dosis Glibenclamid (50 µg/kg i.p.) wurde normalen Mäusen in 4-stündigen Abständen im Lauf des Tages verabreicht. Blutproben wurden bis zu 360 min nach der Injektion zur Blutzuckerbestimmung entnommen. Es erwies sich, dass weder Tiefe noch Dauer der von Glibenclamid verursachten Blutzuckersenkung im Lauf des Tages konstant waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wirkung des Glibenclamids auf den Serumglukosespiegel einem Tagesrhythmus unterworfen ist. Sie lassen auch vermuten, dass die Behandlung mit diesem Medikament nach einem Tagesplan zu einer besseren Regelung des Blutzuckerspiegels führen sollte.

## SUMMARY

A constant dosage of glibenclamide (50 µg/kg i.p.) was administered to normal mice at 4-h intervals during the day. Blood samples were collected up to 360 min after the injection, for glucose determination. It was found that neither the depth nor the duration of the glibenclamide-induced hypoglycemia was constant throughout the day. These results demonstrate the existence of a circadian rhythm of the glibenclamide effect on serum glucose levels. They also suggest that a day-time schedule of therapy with this drug should result in improved control of serum glucose.

REFERENCES

- 1) AIELLO C. R., TURNER D., SCHWARZSTEIN L., ADRIÁN R. E., DE TURNER E. A., APARICIO N. J.: Evaluación del tratamiento prolongado de diabéticos tipo adulto con glibenclamida (HB 419) - *Acta diabet. lat.* 8, 899, 1971.
- 2) BERTRAM F., BENDFELDT E., OTTO H.: Über ein wirksames perorales Antidiabetikum - *Dtsch. med. Wschr.* 80, 1455, 1955.
- 3) DAVIES O. L.: *Statistical Methods in Research and Production* - I.C.I., London, 1957; p. 182.
- 4) DUBOWSKY K. M.: An O-Toluidine Method for Body Fluid Glucose Determination - *Clin. Chem.* 8, 215, 1962.
- 5) ECHAVE LLANOS J. M., NASH R.: Circadian Rhythm in the Gastric Content of Normal and Hepatectomized Mice - *J. interdiscipl. Cycle Res.* 2, 445, 1971.
- 6) FUSSGÄNGER R. D., GOBERNA R., HINZ M., JAROS P., KARSTEN C., PFEIFFER E. F., RAPTIS S.: Comparative Studies on the Dynamics of Insulin Secretion Following HB 419 and Tolbutamide of the Perfused Isolated Rat Pancreas and the Perfused Isolated Pieces and Islets of Rat Pancreas - *Hormone metab. Res.* 1, 34, 1969.
- 7) GAGLIARDINO J. J., HERNÁNDEZ R. E.: Circadian Variation of the Serum Glucose and Immunoreactive Insulin Levels - *Endocrinology* 88, 1529, 1971.
- 8) GAGLIARDINO J. J., HERNÁNDEZ R. E.: Relationship between Differential Responsiveness of Pancreatic Beta Cell and the Circadian Variation of Serum IRI Levels - *Endocrinology* 91, 822, 1972.
- 9) GAGLIARDINO J. J., PESSACQ M. T.: 24-h Variation of Insulin Effectiveness on Muscle Glycogen Content - (In press).
- 10) GAGLIARDINO J. J., REBOLLEDO O. R.: Hormonal Control of Protein Synthesis in Muscle: an Approach through the Study of its Circadian Rhythm - *Hormone metab. Res.* 4, 278, 1972.
- 11) LOUBATIÈRES A.: The Mechanism of Action of Hypoglycemic Sulfonamides: a Concept Based on Investigations in Animals and in Human Beings - *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 71, 192, 1957.
- 12) LOUBATIÈRES A., RENOLD A. E. (Eds): *Pharmacokinetics and Mode of Action of Oral Hypoglycemic Agents* - Casa Ed. « Il Ponte », Milano, 1969; *Acta diabet. lat.* 6 (Suppl. 1), 1969.
- 13) MARBLE A.: Sulfonylurea Compounds in the Treatment of Diabetes - In: ÖSTMAN J., MILNER R. D. G. (Eds): *Diabetes. Excerpta Medica Foundation*, Amsterdam, 1967; p. 722.
- 14) MEHNERT H.: Clinical and Experimental Findings after Five Years Treatment of Diabetes with Sulfonylureas - *Diabetes* 11, 80, 1962.
- 15) PANSKY B., JACOBS M., HOUSE L. L., TASSONI J. P.: The Orbital Region as a Source of Blood Samples in the Golden Hamster - *Anat. Rec.* 139, 409, 1961.
- 16) RAPTIS S., RAU R. M., SCHRÖDER K. E., FAULHABER J. D., PFEIFFER E. F.: Comparative Study of Insulin Secretion Following Repeated Administration of Glucose, Tolbutamide and Glibenclamide (HB 419) in Diabetic and Non-Diabetic Human Subjects - *Hormone metab. Res.* 1, 65, 1969.
- 17) REBOLLEDO O. R., GAGLIARDINO J. J.: Circadian Rhythm in the Protein and RNA Mouse Diaphragm - *Acta physiol. lat-amer.* 20, 168, 1970.
- 18) SAMOLS E., TYLER J. M., KAJINUMAN H.: Influence of the Sulfonamides on Pancreatic Humoral Secretion and Evidence for an Insulin-Glucagon Feedback System - In: RODRÍGUEZ R. R., VALLANCE-OWEN J. (Eds): *Diabetes. Excerpta Medica Foundation*, Amsterdam, 1971; p. 636.

*Requests for reprints should be addressed to:*

JUAN J. GAGLIARDINO  
*Cátedra de Fisiología con Biofísica*  
*Instituto de Fisiología*  
*Facultad de Ciencias Médicas*  
*Universidad Nacional de La Plata*  
*calle 60 y 120, La Plata - Argentina*

Traduzione a cura di G.U.