

EFFECTO DE LA RESTRICCIÓN CALORICO-PROTEINICA DURANTE EL EMBARAZO DE LA RATA, EN LA ACTIVIDAD DE ALGUNAS ENZIMAS GLICOLITICAS EN LA PLACENTA

Julia Araya A.¹ y María Angélica Sánchez²

Facultad de Medicina, División Ciencias Médicas Norte,
Universidad de Chile, Santiago, Chile

RESUMEN

Se estudiaron, en ratas, los cambios en las actividades de piruvato quinasa (PK) y dehidrogenasas del "shunt" de las pentosas (G6PDH y 6PGDH) y NADP malato (NADP-MD) en placentas, con el avance de la preñez, así como la respuesta a una restricción (50%) de una dieta de caseína al 25%, impuesta desde el inicio de la gestación y durante toda la preñez. Las actividades enzimáticas fueron estudiadas al 16º y 20º días post-concepción, y se expresan en mg de ADN⁻¹.

Con el avance de la gestación las actividades de PK, G6PDH y 6PGDH aumentaron ($P < 0.01$), y la actividad de NADP-MD disminuyó ($P < 0.001$) en ambos grupos de placentas. La restricción al 50% de la dieta materna, disminuyó significativamente y en forma precoz la actividad de PK. La respuesta de las dehidrogenasas al stress nutricional materno, fue diferente, ya que mientras la NADP-MD declinó sólo en la primera mitad de la gestación, las dehidrogenasas del "shunt" de las pentosas declinaron en la placenta cerca del término. Se postula que este tipo de stress nutricional disminuye la capacidad glicolítica y la disponibilidad de NADPH₂ necesaria para la síntesis de esteroides en la placenta.

INTRODUCCION

La actividad enzimática medida *in vitro* es un indicador de la utilización de un sustrato específico. Sin embargo, podría revelar también el potencial metabólico de un órgano durante su desarrollo. La placenta es un órgano de corta vida cuya función de transferir substancias desde la madre hacia el feto, y desde éste hacia la circulación materna al igual que sus funciones endocrinas, son más que conocidas (1-4).

Manuscrito modificado recibido: 8-2-84.

1 Directora del Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, División de Ciencias Médicas Norte, Independencia 1027, 3º P., Santiago, Chile.

2 Miembro del citado Departamento.

En una hembra preñada, bien alimentada, la difusión transplacentaria de glucosa virtualmente logra suplir las necesidades energéticas fetales y de la placenta misma, a través de la regulación de las actividades enzimáticas y pasos metabólicos indispensables para utilizar ese nutriente.

La placenta deriva la mayor parte de su energía metabólica de la glucosa y los lípidos que toma de la circulación materna para suplir sus requerimientos energéticos, a fin de compensar el alto costo energético de la producción de hormonas y la activa transferencia de sustancias entre madre y feto. Por este motivo, es evidente que una restricción drástica de alimentos impuesta a la gestante desde el comienzo del embarazo, podría limitar la capacidad metabólica de dicho órgano y su eventual capacidad de transferencia entre los compartimentos materno-fetal.

Visto desde otro ángulo, el efecto de una ingesta disminuida de nutrientes potenciales, coenzimas y cofactores (vitaminas, minerales), podría reducir también la actividad de las enzimas implicadas en la utilización de un sustrato en particular.

Como órgano endocrino, la placenta está involucrada en la síntesis de cantidades importantes de hormonas esteroidales a partir de precursores derivados de la circulación materna y fetal. Para ello, requiere la producción adecuada de NADPH_2 , cofactor necesario para la síntesis de esteroides que, a su vez, son secretados hacia el lado materno-fetal.

La desnutrición materna afecta el metabolismo, la función de la placenta, y el crecimiento fetal (5-9). El objetivo del presente estudio fue establecer, en ratas, si la restricción de la dieta materna, impuesta desde el inicio de la preñez, afecta la actividad de las enzimas piruvato quinasa (PK), reguladora de la glicólisis anaeróbica, de las generadoras de NADPH en el "shunt" de las pentosas, glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa (G6PDH), 6-fosfogluconico-dehidrogenasa (6PGDH), y NADP -malato dehidrogenasa (NADP-MD) extramitocondrial, durante el crecimiento de la placenta.

Se consideró que una alteración de las actividades de las enzimas en estudio podría afectar la disponibilidad de energía metabólica y la producción de hormonas placentarias, limitando así el crecimiento de este órgano y el desarrollo fetal.

MATERIAL Y METODOS

Dieta – Caseína al 25^o/o (10).

Animales – Se utilizaron 50 ratas hembras vírgenes, cepa Wistar, de 60 días de edad, cuyo peso era de 154 g, las que fueron apareadas sólo por el término de 12 horas, previa detección de la fase proestro en frotis de secreción vaginal. El momento de aislar al macho se cuenta como día 0. Un grupo de 25 ratas preñadas se alimentó *ad libitum* desde el primer día y durante todo el experimento, con una dieta a base de caseína al 25^o/o, la que constituyó el grupo control (C). A las otras 25 ratas, también preñadas, se les restringió la misma dieta en un 50^o/o de lo consumido por el grupo testigo, y a este grupo se le consideró como grupo restringido (R). En el grupo C, la ingesta energética promedio observada fue de 28 Kcal/kg/100 g de rata/día.

En el transcurso del ensayo, las ratas fueron alojadas en jaulas indivi-

duales, con libre acceso al agua de bebida. La temperatura del vivero se mantuvo a 22°C, con una humedad de 75% y 12 horas de luz y 12 de obscuridad.

A los 16 y 20 días post-concepción las ratas de ambos grupos fueron sacrificadas por decapitación, y se les extrajeron las placentas por operación cesárea.

Placentas — Todas las placentas recién extraídas de cada rata, se recibieron en suero fisiológico helado, y luego se lavaron y secaron. Después de pesadas se dividieron al azar en dos partes, una parte de ellas fue homogenizada de inmediato en agua destilada helada en una proporción de 1:10 peso volumen, para extraer ácidos nucleicos según Schneider (11), cuantificar ADN según Burton (12) y determinar proteínas según Lowry (13). La otra mitad de placentas frescas fue homogenizada en sacarosa 0.25 M, adicionada de K_2HPO_4 1.85%, en una proporción 1:10 peso volumen, agregándole, además KCl 0.90% en una proporción de 1 ml por cada 4 ml de homogenizado. Luego se centrifugó a 600 xg para descartar núcleos y glóbulos rojos, y el sobrenadante se recentrifugó a 48,200 xg durante 30 minutos.

Enzimas — En el sobrenadante de 48,200 xg de placentas frescas, se determinaron las actividades de PK según la técnica de Weber, Stamm y Fisher (14), de G6PDH y 6PGDH de acuerdo al método de Kornberg y Horecker (15) modificado por Glock y Mc Lean (16), y la actividad de NADP-MD, según Ochoa (17). Las actividades se expresaron como μ mol o nanomol de sustrato transformado por minuto y por mg de ADN a 25°C y fueron determinadas en un espectrofotómetro doble haz Perkins-Elmer Modelo UV-402. Las condiciones del ensayo enzimático y concentración de metabolitos para cada enzima se describen en la Tabla 1.

Todas las operaciones de extracción y homogenización en placentas frescas fueron realizadas a una temperatura de 0°C.

Análisis estadístico — El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante cálculos de la media aritmética y desviación estándar. Para el estudio de las significancias se empleó la prueba "t" de Student.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de este estudio, en ratas, demuestran que la restricción al 50% de una dieta balanceada de caseína al 25%, impuesta a la madre desde el inicio de la preñez, disminuye significativamente y en forma precoz el peso de las placentas y sus contenidos de ADN y proteína (Tabla 2). El contenido disminuido de ADN y la menor relación de proteína/ADN, indican que el menor peso de la placenta de las ratas preñadas con dieta restringida, puede atribuirse a un menor número de células más pequeñas, en relación a la placenta control.

Winick (18), al restringir la proteína de la dieta materna, Velasco *et al.* (19), al ligar la arteria uterina, y Zamenoff *et al.* (20) al privar la dieta materna de algunos aminoácidos esenciales, informan resultados similares en lo concerniente a estos parámetros.

TABLA 1

CONCENTRACION DE METABOLITOS DE LOS ENSAYOS ENZIMATICOS EN SOBRENADANTE DE PLACENTAS DE RATAS CON DIETA RESTRINGIDA Y SUS CONTROLES

Enzima	Buffer	Concentración de metabolitos en la cubeta
PK	Imidazol 51 mM; pH 7.0	KCl, 102 mM; Mg Cl ₂ , 5.1 mM; PEP, 0.26 mM; ADP mg, 5.1 mM; NADH, 0.15 mM; LDH 0.41 U/ml; sobrenadante 48,200 xg, 0.027 mg prot/ml. El blanco contiene todos los reactivos menos ADP-Mg.
G6PD	Glicilglicina 8 mM; pH 7.5	Mg Cl ₂ , 16 mM; NADP, 0.12 mM; G6P, 1.6 mM; 6 PG, 1.6 mM; sobrenadante 48,200 xg, 0.43 mg prot/ml. El blanco contiene todos los reactivos, excepto el sobrenadante.
6PGD	Glicilglicina 8 mM; pH 7.5	Mg Cl ₂ , 16 mM; NADP, 0.12 mM; 6 PG, 1.6 mM; sobrenadante 48,200 xg, 0.43 mg prot/ml. El blanco contiene todos los reactivos excepto el sobrenadante.
NADP-MD	Glicilglicina 48 mM, pH 7.4	Mn Cl ₂ , 1.9 mM; NADP, 0.09 mM; L malato pH 7.4, 3.9 mM; sobrenadante 48,200 xg, 0.68 mg prot/ml. El blanco contiene todos los reactivos excepto NADP.

En la Tabla 3 se observa que durante el desarrollo de la placenta de ratas testigo y con dieta restringida, las actividades de PK, G6PDH y 6PGDH —expresadas por mg de ADN— aumentan con el progreso de la preñez; sin embargo, la actividad de NADP-MD tiende a disminuir en la placenta madura. En la misma Tabla se aprecia también que la restricción de la dieta materna, disminuyó significativamente las actividades de PK y NADP-MD precozmente; no obstante, las actividades de G6PDH y 6PGDH declinan en la placenta sólo cuando el término de la gestación está cercano.

En la literatura existe escasa información de estos cambios enzimáticos durante el desarrollo de dicho órgano y, menos aún, del efecto que la nutrición materna puede tener en tales actividades específicas.

La PK es una enzima importante en el proceso de la glicólisis, y se cuenta con evidencias que la actividad de esta enzima es cinco veces más alta en la placenta que en el hígado (21), lo que indica un alto potencial glicolítico de ese órgano. Una disminución en la actividad de PK reduciría la utilización de glucosa, lo que ocasionaría una menor generación de energía metabólica y, consecuentemente, una menor velocidad de división celular y crecimiento de este órgano.

Los cambios en la actividad de esta enzima pueden atribuirse a la interacción de muchos factores, tales como la disminución del número de moléculas de la enzima, efectores intracelulares o cambios en su forma

TABLA 2

PESO DE PLACENTAS, CONTENIDOS DE ADN Y PROTEINAS Y RELACION PROT/ADN AL 16° Y 20° DIAS POST CONCEPCION, EN RATAS DEL GRUPO CONTROL Y CON DIETA RESTRINGIDA

	Edad gestacional (días)	Grupos		P**
		Control*	Con dieta restringida	
Peso placenta (g)	16	0.20 ± 0.02	0.18 ± 0.02	< 0.02
	20	0.44 ± 0.05	0.34 ± 0.04	≤ 0.001
Peso fetal (g)	16	0.27 ± 0.03	0.26 ± 0.02	
	20	2.39 ± 0.47	1.75 ± 0.16	< 0.001
ADN/placenta (mg)	16	0.31 ± 0.05	0.26 ± 0.04	< 0.01
	20	0.42 ± 0.09	0.34 ± 0.06	< 0.01
Prot/placenta (mg)	16	20.2 ± 1.91	16.9 ± 2.28	< 0.001
	20	50.0 ± 6.20	36.5 ± 5.59	≤ 0.001
Relación prot/ADN	16	68.8 ± 16.6	63.5 ± 7.25	NS
	20	150.5 ± 36.1	108.5 ± 16	< 0.001

* Promedio ± desviación estándar 25 ratas por grupo.

** P = Nivel de significación según la prueba "t" de Student.

molecular. Se ha comunicado (22) que una isoenzima de PK en leucocitos, es inhibida por aminoácidos como alanina, lo que tiene un gran significado biológico en el ahorro de glucosa para la producción de energía. En nuestro estudio, el aporte disminuido de glucosa en la dieta materna, podría haber estimulado la gluconeogénesis, aumentando los niveles de alanina plasmática, la que podría inhibir la actividad de PK en la placenta, por una modulación alostérica.

En embarazos normales, la transaminación de alanina con formación de piruvato está reducida (22). No obstante, se ha comunicado una menor captación de glucosa transplacentaria y un aumento del catabolismo de aminoácidos, presumiblemente para gluconeogénesis en el feto, como respuesta al ayuno materno (23).

Por otra parte, se ha informado que existiría un efecto opuesto entre las actividades de PK y fosfoenolpirúvico carboquinasa (PEPCK), indicativa de un equilibrio entre glicólisis y gluconeogénesis, ya que un aporte proteínico disminuido aumentó la actividad de PEPCK en el hígado de las ratas (24).

El metabolismo de los hidratos de carbono y lípidos en la placenta suplen los requerimientos de energía para la síntesis de un rango de esteroides y hormonas esteroidales. Se ha manifestado (25) que la cantidad de lípidos en la placenta es pequeña, pero, en cambio, como órgano endo-

TABLA 3

**CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS EN SOBRENADANTE
DE HOMOGENIZADO DE PLACENTA DE RATAS DEL GRUPO
CONTROL Y CON DIETA RESTRINGIDA**

Enzima	Edad gestacional (días)	Grupos	
		Control	Con dieta restringida
PK	16	57.4 ± 8.81	*47.3 ± 5.1
	20	*80.9 ± 6.81	**67.9 ± 3.2
G6PDH	16	264.9 ± 60.1	246.4 ± 50.1
	20	°426.1 ± 30.2	°*373.4 ± 13.4
6PGDH	16	872 ± 55.6	832.4 ± 50.8
	20	°960 ± 10.0	°*931.6 ± 27.0
NADP-MD	16	246.7 ± 28.7	*185 ± 20.1
	20	°165.2 ± 17.4	°157 ± 15.6

Promedios ± 1 DE; 16-20 ratas por grupo.

Las actividades en sobrenadantes de homogenizados de placentas frescas se expresan en μ moles (PK) y en n moles (G6PDH, 6PGDH y NADP-MD) de sustrato transformado por minuto⁻¹ por mg ADN⁻¹ a 25°C.

Diferencias significativas del 20º día con respecto a los valores del 16º día post-concepción (°*) y del grupo restringido con respecto al control (*) a un nivel de por lo menos $P < 0.02$.

crino, la placenta está involucrada en la síntesis de cantidades farmacológicas de hormonas esteroidales y proteínicas (2).

Se ha encontrado que la actividad de las enzimas asociadas con la síntesis de lípidos es baja en la placenta, en comparación con la del hígado, pero se ha encontrado también que la actividad de las enzimas que originan NADPH₂ es significativamente más alta en la placenta que en el hígado. Aparentemente, ello es resultado de la preñez, lo que sugiere que, en la placenta, la síntesis de ácidos grasos estaría deprimida, pero no la de otros lípidos (21).

En el estudio que nos ocupa, la restricción de la dieta materna disminuyó la actividad de G6PD en la placenta cercana al término, y la actividad de NADP-MD en la primera mitad de la preñez en este órgano, fenómeno que podría indicar un descenso en la síntesis de estrógenos. Existen evidencias sugerentes de que, por un lado, durante la desnutrición materna la síntesis de estrógenos podría estar afectada (2) y, por el otro, que la desnutrición materna se asociaría con bajos niveles de estrógenos urinarios, particularmente hacia el final del embarazo (25).

En humanos, la actividad de NADP-MD extramitocondrial es baja en la placenta comparada con la del hígado (21). En el estudio que nos ocupa, en ratas, la actividad de dicha enzima en ambos grupos de placentas, expresada por mg de ADN, declinó a la mitad del valor inicial con el progreso de la gestación, inversamente a lo que sucedió con las dehidrogenasas del "shunt" de las pentosas.

Ya que la restricción de la dieta materna redujo significativamente la actividad de NADP-MD en la placenta inmadura (Tabla 3), se postula que el aporte de esta enzima a la generación de NADPH₂ en la placenta de ratas sujetas a dieta restringida, estaría deprimida durante la fase hiperplástica de este órgano, reflejando quizás un menor requerimiento de NADPH₂ generado a partir de malato, y que tal vez la generación de NADPH₂ para la síntesis de esteroides en la primera parte de la preñez, podría ser suplida a expensas del "shunt" de las pentosas.

Según es de conocimiento general, la placenta experimenta cambios funcionales y morfológicos con el avance de la gestación. Nuestro estudio presenta resultados de la influencia de la edad gestacional y de la nutrición materna en la actividad de algunas enzimas del metabolismo de la glucosa y de los lípidos, en la placenta de la rata.

La alta actividad de PK que fue mayor aun en la placenta ya cerca de término, indica una alta actividad de la vía glicolítica. La restricción de la dieta en las ratas preñadas disminuyó precozmente esta actividad.

La significativa baja actividad de G6PD en la placenta madura y de NADP-MD en la placenta durante la primera parte del embarazo —ambas enzimas generadoras de NADPH₂— sugeriría una baja disponibilidad de este cofactor para la síntesis de hormonas esteroidales.

El efecto del stress nutricional en las actividades de las dehidrogenasas del "shunt" de las pentosas y de NADP-MD en la placenta fue diferente, a pesar de tener una coenzima común, el NADP. Tepperman y Tepperman (26) han evidenciado que la composición de la dieta y las hormonas tiroxina y estrógenos influyen selectivamente las dehidrogenasas del "shunt" de las pentosas y NADP-MD. Los estrógenos producen gran efecto sobre las primeras, y la tiroxina sobre la segunda dehidrogenasa. Los mismos autores informan que una alta disponibilidad de hidratos de carbono en la dieta estimula ambas actividades, mientras que una restricción de hidratos de carbono, las deprime (27, 28).

A las ratas preñadas sometidas a restricción dietética se les limitó precozmente el aporte de hidratos de carbono y proteínas, vitaminas y minerales a la mitad de lo consumido por el grupo control, y se evidenció una declinación en la actividad de NADP-MD en la placenta al inicio de la preñez, y de las dehidrogenasas del "shunt" de las pentosas hacia el final de la preñez en la placenta, en relación al grupo control. Esta disociación en las respuestas de enzimas generadoras de NADPH₂, bajo las condiciones experimentales descritas en ratas preñadas con dieta restringida, permite postular que, bajo ciertas circunstancias, un cambio en la actividad de una enzima podría ser secundario a otro cambio.

SUMMARY

EFFECT OF CALORIE-PROTEIN RESTRICTION DURING PREGNANCY
IN RATS ON THE ACTIVITY OF SOME PLACENTAL GLYCOLITIC
ENZYMES

The specific activities and changes of four placental enzymes: pyruvate kinase (PK), glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PD), 6-phosphogluconic-dehydrogenase (6PGD), and NADP malate dehydrogenase (NADP-MD) occurring during the course of gestation and during maternal restricted food intake, were studied in rats. Enzymes activities are expressed in relation to DNA. With the progress of pregnancy, a significant increase in the activity of all enzymes, except NADP-MD, was observed in both groups. A 50% food restriction during pregnancy markedly decreased cell placental enzymes in different stages of development. PK was lower during early and late pregnancy, but NADP-MD was reduced only in the early developmental stage. The activities of G6PD and 6PGD were significantly lower only in the near-term stage in the malnourished group in comparison with the control group.

Our findings suggest that this kind of nutritional insult markedly reduces glycolytic capacity and NADPH₂ generation enzymes, a key factor in the placental steroids metabolism.

BIBLIOGRAFIA

1. Hill, E. P. & L. D. Longo. Dynamics of maternal-fetal nutrient transfer. *Fed. Proc.*, **39**:239-244, 1980.
2. Mulay, S., C. A. Browns, D. R. Varma & S. Solomon. Placental hormones, nutrition and fetal development. *Fed. Proc.*, **39**:261-265, 1980.
3. Munro, H. N. Placental protein and peptide hormones synthesis: Impact of maternal nutrition. *Fed. Proc.*, **39**:255-259, 1980.
4. Rosso, P. Maternal-fetal exchange during protein malnutrition in the rat. *J. Nutr.*, **107**:2002-2005, 1977.
5. Araya, J. & M. Ruz. Influencia de la situación nutricional preconcepcional materna sobre el crecimiento y desarrollo fetal en ratas. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, **31**:133-145, 1981.
6. Rosso, P. Placental growth, development and function in relation to maternal nutrition. *Fed. Proc.*, **39**:250-254, 1980.
7. Lechtig, A., C. Yarbrough, H. Delgado, R. Martorell, R. E. Klein & M. Béhar. Effect of moderate maternal malnutrition on the placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **123**:191-201, 1975.
8. Winick, M. Cellular growth in intrauterine malnutrition. *Pediat. Clin. North America*, **17**:69-78, 1970.
9. Rosso, P., M. Wesserman, J. Rozovski & E. Velasco. Effects of maternal undernutrition on placental metabolism and function. In: *The Neonate*. D. S. Young and J. M. Hicks (Eds.). New York, N. Y., John Wiley and Sons, Ltd., 1976, p. 59-66.
10. Araya, J., M. C. Reyes, C. M. Baginsky & M. Ruz. Crecimiento celular de útero, placenta y fetos durante la restricción calórica materna crónica en ratas. *Arch. Latinoamer Nutr.*, **33**:826-842, 1983.
11. Schneider, W. C. Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. In: *Methods in Enzymology*. Vol. III. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (Eds.). New York, N. Y., Academic Press, Inc., 1957, p. 680-684.

12. Burton, K. Determination of DNA concentration with diphenylamine. In: **Methods in Enzymology**. Vol. XII (Part B). L. Grossman and K. Moldave (Eds.). New York, N. Y., Academic Press, Inc., 1968, p. 163-169.
13. Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr & R. J. Randall. Protein measurement with Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, **193**:265-275, 1951.
14. Weber, G., N. B. Stamm & E. A. Fisher. Insulin: Inducer of pyruvate kinase. **Science**, **149**:65-67, 1965.
15. Kornberg, A. & B. L. Horecker. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: **Methods in Enzymology**, Vol. I. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (Eds.). New York, N. Y., Academic Press Inc., 1955, p. 323-327.
16. Glock, G. E. & P. Mc Lean. Further studies on the properties and assay of glucose 6 phosphate dehydrogenase and 6 phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochem. J.**, **55**:400-408, 1953.
17. Ochoa, S. Malic enzyme. In: **Methods in Enzymology**. Vol. I. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (Eds.). New York, N. Y., Academic Press, Inc., 1955, p. 739-753.
18. Winick, M. Cellular growth in intrauterine malnutrition. **Pediat. Clin. North America**, **17**:69-77, 1970.
19. Velasco, E. G., J. A. Brasel, D. Sigulem, P. Rosso & M. Winick. Effects of vascular insufficiency on placental ribonuclease activity in the rat. **J. Nutr.**, **103**:213-217, 1973.
20. Zamenhoff, S., S. M. Hall, L. Grauel, E. Van Marthens & M. J. Donahue. Deprivation of amino acids and prenatal brain development in rats. **J. Nutr.**, **104**:1002-1007, 1974.
21. Diamant, T. Z. & E. Shafir. Enzymes of carbohydrate and lipid metabolism in the placenta and liver of pregnant rats. **Biochem. Biophys. Acta**, **279**:424-430, 1972.
22. Mameesh, M. S., J. Metcoff, P. Costiloe & W. Crosby. Kinetic properties of pyruvate kinase in human maternal leukocytes in fatal malnutrition. **Pediat. Res.**, **10**:561-565, 1976.
23. Peret, J., M. Chanez, J. Cota & I. Macaire. Effects of quantity and quality of dietary protein and variation in certain enzyme activities on glucose metabolism in the rat. **J. Nutr.**, **105**:1525-1533, 1975.
24. Hosoya, N., H. Hagerman & C. A. Villee. Stimulation of fatty acid synthesis by estradiol *in vitro*. **Biochem. J.**, **76**: 297-301, 1960.
25. Iyengar, L. Urinary estrogen excretion in undernourished pregnant Indian women. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **102**:834-838, 1968.
26. Tepperman, H. M. & J. Tepperman. Pattern of dietary and hormonal indication of certain NADP-linked liver enzymes. **Am. J. Physiol.**, **206**:357-361, 1964.
27. Fitch, W. M., I. L. Chaikoff & R. Hill. Effects of dietary hexoses on changes induced in hepatic enzymes activities of the rat by a lethal dose of rays. **Arch. Biochem. Biophys.**, **94**:387-391, 1961.
28. Shrago, E., H. A. Lardy & R. C. Nordle. Hormonal and metabolic control of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and the malic enzyme. **Fed. Proc.**, **22**:410, 1963. (Abstract).