

# Regulación del metabolismo de cuerpos cetónicos. Situaciones fisiológicas y patológicas que afectan su producción

Regulation of ketone bodies metabolism. Physiological and pathological situations that affect its production

MARTÍN-RUIZ, C. M.; GARCÍA-SALGUERO, L.; BARROSO, J. B. y LUPIÁÑEZ, J. A.  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. 18071 Granada, España.

## RESUMEN

El acetoacetato y el  $\beta$ -hidroxibutirato producidos fundamentalmente por el hígado y el riñón como consecuencia de la oxidación de ácidos grasos, representan un excelente combustible para la respiración en otros tejidos, en particular cuando el aporte de glucosa es limitado, por ejemplo durante el ayuno, o debido a una ineficaz capacidad de su utilización, en situaciones de insuficiencia de insulina como la diabetes. En este trabajo se estudia el metabolismo de cuerpos cetónicos en estas situaciones en las cuales su concentración en sangre aumenta por encima de los valores normales. Asimismo se profundiza en la regulación de la cetogénesis, centrándose en la reacción catalizada por la carnitina aciltransferasa I. Por último se tratan algunos factores que afectan a la producción de cuerpos cetónicos.

**Palabras clave:** Cetogénesis. Regulación. Ayuno. Edad. Embarazo. Ejercicio. Acidosis metabólica. Diabetes. Estrés. Trauma.

## ABSTRACT

Acetoacetate and  $\beta$ -hydroxybutyrate are mainly produced by the hepatic and renal tissues as consequence of an increase of fatty acid oxidation and constitute an excellent energetic combustible for respiration in other tissues particularly when the glucose disponibility is limited, such as during fasting or during an inability of its utilization in situations of insulin insufficiency such as diabetes. In this work we study the ketone body metabolism under these physiological and pathological situations in which its blood concentration in crease above control values. Also this revision study in depth the ketogenesis regulation and those factors that affect the ketone body production.

**Key words:** Cetogenesis. Regulation. Fasting. Aged. Pregnancy. Exercise. Metabolic acidosis. Diabetes. Stress. Trauma.

Recibido: 13-1-1994.

Aceptado: 8-2-1994.

BIBLID [0004-2927(1994) 35:3; 431-440]

## ESTADOS CETÓTICOS

### *Ayuno*

En ciertas situaciones, la concentración de cuerpos cetónicos en sangre aumenta por encima de lo normal (hipercetonemia). Si el nivel de cuerpos cetónicos en sangre aumenta demasiado se detectan cantidades considerables de cuerpos cetónicos en orina (cetonuria). Si dicho nivel se hace tan elevado que incluso puede detectarse olor a acetona en el aire que se expira se considera una situación de cetosis.

La aparición de la cetosis puede asociarse a cualquier situación que suponga una reducción en la disponibilidad de glúcidos y por tanto un incremento en la utilización de ácidos grasos. Una situación posible es el ayuno, los depósitos de glucógeno se consumen a gran velocidad y el organismo pasa a depender en gran parte de la energía que pueda obtener de los lípidos almacenados. En el hígado se produce una degradación de ácidos grasos más rápida de lo normal (debido a la baja proporción insulina: glucagón que hay en esta condición, la lipólisis está muy activada) a través de la vía de la  $\beta$ -oxidación para proveer del ATP necesario para la gluconeogénesis. Como consecuencia aumenta la producción de acetyl-CoA y de acetoacetyl-CoA. De esta forma el ayuno prolongado conduce a la cetosis.

Aunque un poco del acetyl-CoA generado por la  $\beta$ -oxidación hepática se oxida completamente en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, la mayor parte de ese acetyl-CoA se convierte en cuerpos cetónicos en las mitocondrias hepáticas (1). Posteriormente se liberan a la sangre para ser usados como fuente de energía por los diversos tejidos. Muchos tejidos en situación de ayuno pueden utilizar los cuerpos cetónicos como combustibles alternativos a la glucosa.

En cerebro, la capacidad de usar cuerpos cetónicos no es una adaptación enzimática al ayuno (las enzimas implicadas están normalmente presentes con actividades relativamente altas). El factor limitante de la velocidad con que se utilizan los cuerpos cetónicos en cerebro es la permeabilidad de la barrera hematoencefálica: mejor capacidad de usar cuerpos cetónicos a mayor permeabilidad. Curiosamente hay estructuras del cerebro en las que la relación utilización de glucosa/utilización de cuerpos cetónicos es mayor que en otras (2). En relación con esto Cahill (3) sugiere que los cuerpos cetónicos no serían un combustible alternativo en el metabolismo energético cerebral de animales con una baja relación peso cerebral/peso corporal. Sólo en humanos y algunos primates, con cerebros relativamente grandes, se necesitarían combustibles alternativos derivados de las grasas. Es interesante considerar que un requerimiento para el crecimiento de la corteza cerebral a lo largo de la evolución sería una capacidad mejorada de usar cuerpos cetónicos durante momentos de necesidad como el ayuno. De esta forma el desarrollo de la capacidad de usar cuerpos cetónicos en

las áreas del cerebro que se expandieron tendría un valor de supervivencia según Cahill.

Dado que durante el ayuno prolongado los cuerpos cetónicos disminuyen la utilización de glucosa, mientras se mantenga cierto ritmo de  $\beta$ -oxidación hepática, los consiguientes niveles elevados de cuerpos cetónicos provocan una menor necesidad de glucosa, menor necesidad de aminoácidos gluconeogénicos y menor necesidad de usar por proteólisis el tejido muscular, con lo que se conservan las proteínas y enzimas musculares. Además en el ayuno, a niveles más bajos de glucosa, menor liberación de insulina y mayor liberación de glucagón y por otro lado se reduce la formación de hormona tiroidea. En definitiva

cuerpos cetónicos han contribuido a reducir algo el derroche que supondría utilizar el tejido muscular.

Durante el ayuno, las concentraciones de ácidos grasos en sangre pueden variar en un orden de magnitud, mientras que las de los cuerpos cetónicos lo hacen en dos órdenes de magnitud (4).

### *Diabetes mellitus*

Otra situación que puede desembocar en cetosis es la diabetes mellitus. La glucosa ahora aparece en exceso en el plasma pero la deficiencia de insulina (por ausencia o función defectuosa de las células  $\beta$  del páncreas) impide que se utilice la glucosa a una velocidad normal y por tanto el efecto sobre el metabolismo lipídico es el mismo que el del ayuno. Los principales desarreglos metabólicos que acompañan a la diabetes serán por tanto hiperglucemia, hipercetonemia excesiva y cetonuria. La elevada concentración de ácidos grasos libres en plasma favorece la producción hepática de cuerpos cetónicos, se alcanzan fácilmente niveles de cuerpos cetónicos en sangre de 20 mM y dado el carácter ácido relativamente fuerte de ambos cuerpos cetónicos (pK de casi 3,5), esta situación provoca una peligrosa acidosis metabólica. La acumulación de los cuerpos cetónicos en la sangre durante la cetoacidosis diabética proviene de su elevada producción hepática, que supera la capacidad de otros tejidos para utilizarlos. El origen de la cetoacidosis diabética estaría en la deficiencia severa de insulina, el exceso de glucagón y frecuentemente el aumento de otras hormonas relacionadas con el estrés (adrenalina, cortisol y hormona del crecimiento).

Por tanto, el nivel de  $\beta$ -hidroxibutirato en suero es un buen marcador de la deficiencia insulínica y puede ser útil para considerar el requerimiento de terapia insulínica e incluso la dosificación de insulina en el individuo diabético (5).

Diversos estudios demostraron que la insulina está implicada de algún modo en el control de la utilización de cuerpos cetónicos: esta utilización decrece con la diabetes y se restablece al administrar insulina (6). Parece demos-

trado que la insulina incrementa la utilización global de cuerpos cetónicos y su incorporación a lípidos en tejido adiposo de rata (7).

En otros estudios se observa, tanto para  $\beta$ -hidroxibutirato deshidrogenasa como para succinil-CoA transferasa, una disminución de su actividad con la diabetes que explicaría el descenso en la oxidación de cuerpos cetónicos detectado en tejidos periféricos de organismos diabéticos (8). Sin embargo, para el cerebro en la diabetes, como en el ayuno, los cuerpos cetónicos pueden llegar a ser un combustible significativo. En esta condición, las enzimas presentan actividades relativamente altas en comparación con una situación normal, y durante la diabetes aumenta la entrada total de cuerpos cetónicos al cerebro, aumentando en un 60% el *clearance* del  $\beta$ -hidroxibutirato (2).

En otros tejidos como el intestino delgado, la diabetes prolongada supone que los cuerpos cetónicos y posiblemente los ácidos grasos puedan sustituir a la glutamina como principal combustible (9). Para el riñón, durante la diabetes se pueden acumular cuerpos cetónicos en la corteza renal, especialmente durante la cetoacidosis (10).

## REGULACIÓN DE LA CETOGÉNESIS

La velocidad de formación de cuerpos cetónicos está en función de la concentración de acetyl-CoA o, lo que es más probable, de la proporción acetyl-CoA/ CoA libre. Mediante una serie de estudios se pudo determinar que el principal control del proceso global de oxidación hepática de ácidos grasos, y por tanto del proceso cetogénico, parece residir en la distribución de los ácidos grasos de cadena larga hacia rutas de esterificación u oxidación. El sentido de esta canalización depende de la disponibilidad de glicerol-3-fosfato para la esterificación (11). En concordancia con esto, en estados deficientes de insulina, la mayor concentración de cuerpos cetónicos en sangre, sería consecuencia de la caída que se produce en los niveles de glicerol-3-fosfato y, por tanto, en la capacidad de esterificación disminuida, en lugar de deberse al nivel elevado de oxidación hepática. Una explicación para esta relación sería que la inhibición por insulina de la cetogénesis a partir de ácidos grasos, es consecuencia de la capacidad de la hormona de estimular la biosíntesis de triacilglicéridos, en definitiva, la reesterificación.

Se ha comprobado que la producción de cuerpos cetónicos a partir de oléico (ácido graso de cadena larga) es mayor que cuando se usa como sustrato octanóico (ácido graso de cadena corta). El octanóico pasa a la mitocondria por un mecanismo independiente de la carnitina. Por tanto, existe un importante punto de control de la cetogénesis a lo largo del proceso de oxidación de ácidos grasos de cadena larga y en concreto en el primer paso específico de esta oxidación, la reacción de la carnitina aciltransferasa, reacción de la cual se sabe

que está sometida a regulación metabólica. El principal responsable del control de esta reacción es el malonil-CoA, potente inhibidor de la carnitina aciltransferasa I (el control auxiliar de esta actividad se realiza por variaciones en los niveles de carnitina y ácidos grasos).

El metabolismo de los ácidos grasos y la cetogénesis hepáticos están bajo el mismo control bihormonal. El glucagón juega un papel importante en la regulación de la cetogénesis. En ausencia de insulina se induce una hiperglucemia que origina un aumento en la producción hepática neta de cuerpos cetónicos y en la conversión del palmitato circulante a cuerpos cetónicos y  $\text{CO}_2$  (12). Además, el glucagón disminuye la relación  $\beta$ -hidroxibutirato/acetoacetato y, como esta relación refleja el estado redox mitocondrial, la administración de glucagón se asocia a una intensificación de la respiración mitocondrial. En definitiva el glucagón estimula la cetogénesis potenciando de forma selectiva la producción hepática de acetoacetato (13).

De forma general parece ser que es más importante la relación glucagón/insulina que la concentración absoluta de cada una de las hormonas para determinar los acontecimientos metabólicos en el hígado (14).

Por tanto puede establecerse que la señal para la iniciación de la cetogénesis hepática sería una elevación de la relación glucagón/insulina, señal que reactivaría la reacción de la carnitina aciltransferasa I.

El malonil-Coa inhibe la oxidación de ácidos grasos actuando a nivel de la carnitina aciltransferasa I (es el único compuesto fisiológico que la inhibe), única transferasa sensible a él por localizarse en la cara externa de la membrana mitocondrial interna. Durante situaciones de alimentación con hidratos de carbono, el malonil-CoA actúa como mecanismo asegurador del flujo unidireccional del carbono de la glucosa o cualquier otro precursor del piruvato hacia la síntesis de triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad, al mismo tiempo que suprime una posible e inútil reoxidación de los ácidos grasos sintetizados de novo.

En estados cetóticos los niveles de malonil-CoA caen, cesa la lipogénesis y se frena el paso de la carnitina aciltransferasa. Se acumula carnitina libre, lo que activaría la oxidación de ácidos grasos y la cetogénesis.

El intenso efecto del glucagón estimulando la cetogénesis radicaría en su capacidad para suprimir la formación de malonil-CoA. El principal determinante de la velocidad de la cetogénesis será, por tanto, el contenido celular de malonil-CoA (15).

Los niveles intracelulares de acil-CoA (sustratos de la carnitina aciltransferasa), que reflejan en cierta medida el nivel de ácidos grasos libres en plasma, serían el tercer factor que actúa sobre el control de la cetogénesis. Una alta concentración de ácidos grasos en plasma contribuye a suprimir la síntesis de malonil-CoA; pero estos altos niveles, que se alcanzan eventualmente durante el ayuno o la diabetes incontrolada, no son suficientes para asegurar una cetogénesis

máxima, aunque contribuyan a acelerarla. El nivel de ácidos grasos en plasma podría ser un mecanismo de control secundario.

Por tanto, el sitio regulador por excelencia para la cetogénesis es la reacción de la carnitina aciltransferasa. El malonil-CoA, como inhibidor de esta actividad, juega un papel decisivo sobre todo en la coordinación del flujo de carbono entre rutas de carbohidratos y metabolismo graso en hígado, y como consecuencia en el control de la cetogénesis. Esta cetogénesis estará inducida hormonalmente no sólo por la deficiencia de insulina sino también por el consiguiente aumento del nivel de glucagón.

Pero glucagón e insulina no son las únicas hormonas implicadas en la regulación de la cetogénesis, también participan, aunque en menor medida, hormonas como las relacionadas con el estrés (catecolaminas y hormona del crecimiento) (16). Estas hormonas estimulan la cetogénesis al aumentar el aporte de ácidos grasos libres en plasma y procedentes de la lipólisis en el tejido adiposo. La hormona del crecimiento estimula directamente la producción de acetoacetato (17). Por su parte, las catecolaminas, no sólo estimulan indirectamente la cetogénesis al inducir la lipólisis e incrementar con ello los niveles de ácidos grasos libres en plasma, con lo que proporcionan un sustrato para la cetogénesis hepática (18), sino que también potencian directamente la producción de cuerpos cetónicos o alternativamente disminuyen su utilización (19). De esta manera, altas concentraciones de adrenalina y de noradrenalina se asocian con niveles altos de cuerpos cetónicos. En concreto, la noradrenalina, en hombre, aumenta la conversión de ácidos grasos a cuerpos cetónicos en hígado, al reducir la capacidad del hígado de captar los ácidos grasos del plasma. El papel de las catecolaminas será importante en el desarrollo de la hipercetonemia que acompaña al ayuno porque de hecho la activación simpatoadrenal es característica del ayuno (20).

## PRINCIPALES FACTORES QUE AFECTAN A LA CETOGÉNESIS

### *Obesidad*

En rata obesa, los niveles hepáticos de malonil-CoA son varias veces mayores a los que aparecen en animales exentos de grasa (21). También se ha comprobado que en el hígado de rata obesa se producen significativamente menos cuerpos cetónicos (22), al mismo tiempo que es más intensa la utilización de cuerpos cetónicos para la síntesis de ácidos grasos (aunque de forma global se intensifican todos los procesos que aportan carbono a la lipogénesis) por lo que se compensa un efecto con el otro (23).

### *Edad*

Comparado con células de animales jóvenes, los adipocitos de ratas adultas tienen menor capacidad de captar glucagón y al mismo tiempo es menor la actividad lipolítica que ese glucagón estimula (24). En cuanto a los hepatocitos, no se conoce mucho a cerca del efecto de la edad sobre la respuesta al glucagón. Conocido el papel regulador del glucagón sobre los niveles de malonil-CoA (en los que provoca una disminución), y sobre la actividad de la carnitina aciltransferasa (que se estimula ante el glucagón), y puesto que el efecto del glucagón sobre los adipocitos cambia con la edad, son probables los resultados que indican que los niveles de acetoacetato en plasma de ratas adultas son menores que los de ratas jóvenes (25) a pesar de que en ratas adultas son mayores los niveles de glucagón en plasma. Esto se debería a que el hígado de ratas adultas es casi insensible al glucagón por desensibilización del sistema receptor de glucagón-adenilatociclasa (26), de ahí que los aumentos en el nivel de cuerpos cetónicos tras el ayuno sean escasos.

### *Embarazo*

Los cuerpos cetónicos pueden ser un combustible importante para el feto durante el ayuno materno. El  $\beta$ -hidroxibutirato puede consumirse en cantidades suficientes como para sustituir plenamente a la glucosa (27).

Para la madre, el consumo de glucosa y aminoácidos por parte del feto disminuye el tiempo que tarda en alcanzar la inanición: caen los niveles de glucosa (28), aumentan los niveles de glucagón en sangre y se estimulan lipogénesis y cetogénesis, pueden producirse hipertrigliceridemia e hipercetonemia severas. Para ratas preñadas en ayuno, la hipercetonemia no refleja un gran aumento en la producción hepática de cuerpos cetónicos: a pesar de que se produce una acumulación dramática de cuerpos cetónicos en sangre, sin embargo no se observa una cetogénesis incrementada respecto a la que aparece en ratas no preñadas. Esto se debería a que, por la gran disponibilidad de ácidos grasos libres y la carestía de glucosa e insulina, los tejidos maternos reducirían su utilización de ácidos grasos (29).

### *pH y Bicarbonato*

En hígado, un pH bajo reduce la cetogénesis, de forma más intensa cuanto menor es el pH, lo que indica que este proceso se detiene durante la cetoacidosis severa. Para un mismo pH ácido (por ejemplo, 6,5) la producción de  $\beta$ -hidroxibutirato

se inhibe más que la de acetoacetato, pero conforme se aproxima el pH al fisiológico, las diferencias se reducen (17).

Un pH alcalino y una alta concentración de bicarbonato acentúan el gradiente de concentración intra-extracelular: en medio con oleato 1 mM la relación entre las concentraciones intracelular y extracelular es menor que 1 pero se atenúan las diferencias cuando se acumulan los cuerpos cetónicos en el medio (30). Un pH alcalino hace que la relación sea mucho menor aún, mientras que un pH ácido o la eliminación del bicarbonato casi anulan el gradiente e incluso cuando el pH externo se reduce mucho, las células hepáticas pueden acumular cuerpos cetónicos en concentraciones 3 veces mayores a las del exterior.

Los cuerpos cetónicos se liberan desde las células hepáticas contra un gradiente de concentración en un proceso que se afecta por el pH y la concentración de bicarbonato externos. Sobre todo la infusión de bicarbonato eleva la liberación de  $\beta$ -hidroxibutirato desde los hepatocitos.

El efecto del pH y bicarbonato sobre la cetogénesis constituye un mecanismo de autocontrol del proceso por la misma cetoadicidosis.

### *Estrés y Trauma*

Con el estrés aumentan los niveles de glucagón y de glucosa y ácidos grasos libres, pero la cetogénesis no se acelera, por lo que el organismo no es capaz de controlar la utilización que hace de las reservas proteicas musculares.

Al evaluar el estrés operativo en función de la reserva funcional del hígado, la relación acetoacetato/ $\beta$ -hidroxibutirato sería un buen indicador como reflejo del potencial redox mitocondrial del hígado. Esta relación disminuye drásticamente ante el estrés que ocasiona, por ejemplo, una laparatomía (31) y en general un proceso quirúrgico que afecte al hígado o a los vasos hepáticos, disminución que sería debida a una alteración, entre otras cosas, del flujo sanguíneo hepático.

La anestesia y el procedimiento quirúrgico deterioran la capacidad metabólica del hígado, éste se sobrecarga, se acumulan sustratos en sangre y degenera el metabolismo energético mitocondrial (de hecho la relación acetoacetato/ $\beta$ -hidroxibutirato tarda en recuperarse después de la reperfusión del hígado). En general, al administrar los cuerpos cetónicos, éstos pueden reducir el catabolismo proteico que aparece en situaciones de estrés como la hipotensión hemorrágica (32).

### *Ejercicio*

El ejercicio produce una "hiperacetoacetatonemia" que se reduce con el entrenamiento prolongado en ratas diabéticas y en humanos diabéticos. En ratas



normales, con el ejercicio se induce una hipercetonemia que puede reducirse mediante un entrenamiento con un ejercicio prolongado de intensidad media, porque este tipo de ejercicio aumenta la captación de cuerpos cetónicos en músculo esquelético (33).

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) WILLIAMSON, D. H. & WHITELAW, E. (1978): *Biochem. Soc. Symp.*, **43**:137.
- (2) HAWKINS, R. A., MANS, A. M. & DAVIS, D. W. (1982): *Am. J. Physiol.*, **250** (Endocrinol. Metab. **13**): E169-E178.
- (3) CAHILL, G. F., Jr. (1982): *Am. Clin. Climatol. Assoc.*, **94**:121.
- (4) RUDERMAN, N. B., AOKI, T. T. & CAHILL, G. F., Jr. (1976): En: R. W. Hanson and M. A. Mehلمان (eds.), *Gluconeogenesis, its regulation in mammalian species*, New York: Wiley, p. 515.
- (5) KOSUGI, K., HIDAKA, H., AOKI, T., KOJIMA, H., NAKAJIMA, Y., NAKAMURA, T., HARANO, Y. & SHIGETA, Y. (1990): *Tokiobio*, **33** (7):545-550.
- (6) BALASSE, E. O. & HAVEL, R. J. (1971): *J. Clin. Invest.*, **50**:801-813.
- (7) SOLING, H. D., ZAHLTEN, R., REIMOLD, W. V. & WILLMS, B. (1970): *Horm. Metab. Res.*, **2**:56-61.
- (8) GRINBALT, L., PACHECO-BOLAÑOS, L. F. & STOPPANI, A. O. M. (1986): *Biochem. J.*, **240**:49-56.
- (9) WATFORD, M., ERBELDING, E. J. & SMITH, E. M. (1987): *Biochem. J.*, **242** (1):61-68.
- (10) LEMIEUX, G., ROCHELEAU, F., LEMIEUX, C. & MOULIN, B. (1985): *Dev. Nephrol.*, **10** (*Kidney Metab. Func.*), pp. 118-125.
- (11) MIDDLETON, B. (1978): En: *Biochemical and Clinical Aspects of Ketone Body Metabolism*, editado por H. D. Söling & C. D. Seufert. Stuttgart: Thieme, pp. 1-10.
- (12) KELLER, U. & SCHULMAN, G. (1979): *Am. J. Physiol.*, **237** (2):E121-E129.
- (13) UNGER, R. H. (1971): *New Engl. J. Med.*, **285**:443-449.
- (14) WOODSIDE, W. F. (1979): *Adv. Exp. Med. Biol.*, **111** (*Horm. Energy. Metab.*), pp. 97-101.
- (15) COOK, G. A., KING, M. T. & VEECH, R. L. (1978): *J. Biol. Chem.*, **253** (8):2522-2531.
- (16) SCHADE, D. S. & EATON, R. P. (1979): *Diabetes*, **28** (1):5-10.
- (17) OKUDA, Y., KAWAI, K., KOIDE, Y. & YAMASHITA, K. (1986): *Endocrinol. Japon.*, **33** (6):827-834.
- (18) McGARRY, J. D. & FOSTER, D. W. (1980): *Ann. Rev. Biochem.*, **49**:395-420.
- (19) GALSTER, A. D., CLUTTER, W. E., CRYER, P. E., COLLINS, J.A. & BIER, D. M. (1981): *J. Clin. Invest.*, **67**:1729-1738.
- (20) KELLER, U., OBERHÄNSLI, R. D. & STAUFFACHER, W. (1985): *Substrate Energy Metab. Man (Clin. Res. Cent. Symp.)* 3rd, pp. 37-45.
- (21) AZAIN, M. J., FUKUDA, N., CHAO, F. F., YAMAMOTO, M. & ONKTO, J. A. (1985): *J. Biol. Chem.*, **260**:174-181.
- (22) FUKUDA, N., AZAIN, M. J. & ONKTO, J. A. (1982): *J. Biol. Chem.*, **257**:14066-14072.
- (23) AZAIN, M. J. & ONKTO, J. A. (1990): *Horm. Metab. Res.*, **22**:561-565.
- (24) LIVINGSTON, J. N., CUATRECASAS, P. & LOCKWOOD, D. H. (1974): *J. Lipid Res.*, **15**:26.
- (25) MASORO, E. J., COMPTON, C., YU, B. P. & BERTRAND, H. (1983): *J. Nutr.*, **113**:880.

- (26) OKUDA, Y., KAWAI, K. & YAMASHITA, K. (1987): *Endocrinology*, **120**:2152-2157.
- (27) HARDING, J. E., CHARLTON, V. E. & EVANS, P. C. (1992): *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **166** (2):671-676.
- (28) OGATA, E. S., SANDERS, L., METZGER, B. & FREINKEL, N. (1979): *Pediatric Res.*, **13**:480-484.
- (29) SUGDEN, M. C., CHANGANI, K. K., BENTLEY, J. & HOLNESS, M. J. (1992): *Biochem. Soc. Trans.*, **20** (2):195.
- (30) FAFOURNOUX, P. DEMIGNÉ, C. & RÉMÉSY, C.: *Am. J. Physiol.*, **252** (*Gastrointes. Liver Physiol.* **15**):G200-G208.
- (31) KIUCHI, T., SHIMAHARA, Y., WAKASHIRO, S., TOKUNAGA, Y., OZAKI, N., TAKAYUSU, T., MORI, K., KOBAYASHI, N., YAMAOKA, Y. & OZAWA, K. (1990): *J. Lab. Clin. Med.*, **115** (4):443-439.
- (32) HIRAIDE, A., KATAYAMA, M., MIZOBATA, Y., SUGIMOTO, H., YOSHIOKA, T. & SUGIMOTO, T. (1991): *Eur. Surg. Res.*, **23** (3-4):250-255.
- (33) OHMORI, H., KAWAI, K. & YASMASHITA, K. (1990): *Endocrinol. Jpn.*, **37** (3):421-429.