

PATRON DE ACTIVIDAD DE LA ACETIL CoA CARBOXILASA
HEPATICA DURANTE EL DESARROLLO

— **Dra. Elena Ryder.**

Instituto de Investigación Clínica.
Universidad del Zulia.
Apartado 1151.
Maracaibo, Venezuela

INTRODUCCION

Desde los estudios de Needham en 1931²⁰ se sabe que el embrión de pollo, a medida que evoluciona, obtiene la energía necesaria para sus transformaciones metabólicas a partir de diferentes fuentes. En la primera semana, predomina el metabolismo de los carbohidratos; en la segunda, el de proteínas y en las últimas etapas de la vida embrionaria, el metabolismo de las grasas. Noble y Moore²¹ han demostrado una correlación entre la disminución notable de lípidos en la yema entre los 15 y 21 días, con un aumento en el contenido de éstos en el hígado del embrión y George e Iype² encuentran que la actividad de la lipasa, sufre un aumento brusco a nivel del día 14 de incubación.

Respecto a la síntesis de ácidos grasos se sabe muy poco. Estudios de Schoenheimer y Rittenberg y Kilsheimer et al.⁷ demostraron que la velocidad de este proceso en embriones es muy baja. Recientemente, Goodridge⁷ encuentra que el desarrollo de la lipogénesis ocurre rápidamente una vez que el pollo nace y es alimentado, y representa un aumento de unas 350 a 1.000 veces. También se ha encontrado que la actividad de las enzimas citrato liasa^{2,8} y málica⁹, enzimas relacionadas con este proceso, sube marcadamente (15x y 85x) con el nacimiento, estableciendo una relación estrecha entre estos hallazgos.

Goodridge⁷ considera que este patrón es de esperarse si nos basamos en los conocidos efectos de la dieta sobre la lipogénesis¹⁷ ya que la gran cantidad de grasa que contiene la yema, de la cual se alimenta el embrión, inhibe la biosíntesis de lípidos. Se ha establecido que este proceso está bajo re-troinhibición por sus propios productos, principalmente ácidos

grasos libres y derivados acil CoA y que este efecto regulatorio se ejerce sobre el paso limitante de la biosíntesis grasa, que es la acetil CoA carboxilasa²².

El propósito del presente trabajo fue estudiar las características de esta enzima reguladora, en relación al desarrollo de la lipogénesis en el hígado de pollo, durante el período embrionario y después del nacimiento.

MATERIAL Y METODO

Se obtuvieron huevos embrionados de la raza Peterson, de 8 días, de una granja local, los cuales fueron incubados en incubador eléctrico, a temperatura y humedad adecuadas. Una vez nacidos, los pollos fueron trasladados a jaulas y alimentados "ad libitum" con Pollarina 2A de Protinal y agua. No se hizo selección de sexo para los experimentos.

Los embriones fueron extraídos del huevo y liberados del tejido extraembrionario. Todos los animales fueron sacrificados siempre a la misma hora del día por decapitación.

Los hígados fueron extraídos, pesados y conservados en frío. Dependiendo del tamaño del órgano, se reunieron hasta 12 hígados cuando se trataba de embriones pequeños. Fueron homogeneizados en frío, con homogeneizador Potter-Elvehjem en buffer Tris 0,05 M, KCl 0,15 M y EDTA 0,1 mM, pH 7,1 a 25°; centrifugados a 50.000 g. por 90 minutos en centrífuga refrigerada Sorvall (rotor SS-34). Una alícuota de la fracción sobrenadante obtenida fue filtrada a través de una columna de Sephadex G-25 (según método de Chang y col.³) y el efluente utilizado para la medida de la actividad enzimática, previa dilución con buffer de homogeneización en los casos que fuese necesario.

La medida de la actividad enzimática se hizo por el método de incorporación de $H^{14}CO_3^-$ en malonil CoA. Previa incubación del efluente a 37° por 30 minutos, en un medio que contiene: buffer Tris pH 7,5, 60 mM; GSH, 3 mM; EDTA, 0,1 mM; albúmina bovina, 0,6 mg/ml, en presencia o ausencia de citrato de potasio, 5 mM, se inició la reacción enzimática transfiriendo una alícuota del medio de incubación al medio de ensayo que contiene, además de los elementos del medio de incubación, ATP, 3 mM; cloruro de magnesio, 8mM; $KH^{14}CO_3$ (actividad específica

de 100-300 cpm/mumole), 10 mM y acetil CoA, 0,2 mM. Esta reacción duró 10 minutos a 37°, transcurridos los cuales se detuvo con HCl. Se colocaron alícuotas en frascos de vidrio las cuales fueron secadas en estufa a 80° por una hora. Cada determinación se hizo usando tres concentraciones diferentes de proteína, para verificar que la velocidad de la reacción fuese lineal.

La cantidad de radioactividad como malonil CoA fue determinada por medio de un espectrómetro de centelleo líquido, Packard Tri-Carb, usando solución centelleadora de dioxano, naftaleno, PPO y POPOP. La eficiencia del aparato fue determinada por medio del standard externo y resultó ser de 85-90%.

La actividad se expresó en milimicromoles de malonil CoA formados por minuto por miligramo de proteína (mU/mg). Las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry¹ usando albúmina bovina como standard.

RESULTADOS

Actividad de la carboxilasa. Se obtuvo la siguiente curva (Fig. 1): durante el período embrionario temprano, la actividad de la acetil CoA carboxilasa es prácticamente insignificante, de menos de 1 mU/mg; al momento del nacimiento, se consiguieron cifras de 1,6 mU/mg, pero una vez iniciada la alimentación del animal, la actividad comienza a subir notable pero progresivamente para alcanzar un máximo alrededor de los 11 días, cuando se obtienen cifras de 21 mU/mg, lo que representa un aumento de unas 13 veces la actividad del recién nacido y unas 100 veces la del embrión.

Efecto de la concentración de citrato sobre la actividad de la enzima. La reacción demostró una completa dependencia por el activador, citrato, ya que se observaron actividades sumamente bajas en su ausencia, durante todo el período estudiado. La concentración óptima del activador fue de 5 mM, obteniéndose una inhibición marcada cuando se llegan a concentraciones de 20 mM (Tabla 1).

Efecto de la preincubación sobre la actividad de la carboxilasa. A concentraciones óptimas del activador (citrato), la enzima de hígado de pollo no necesita preincubación; aún más, la ac-

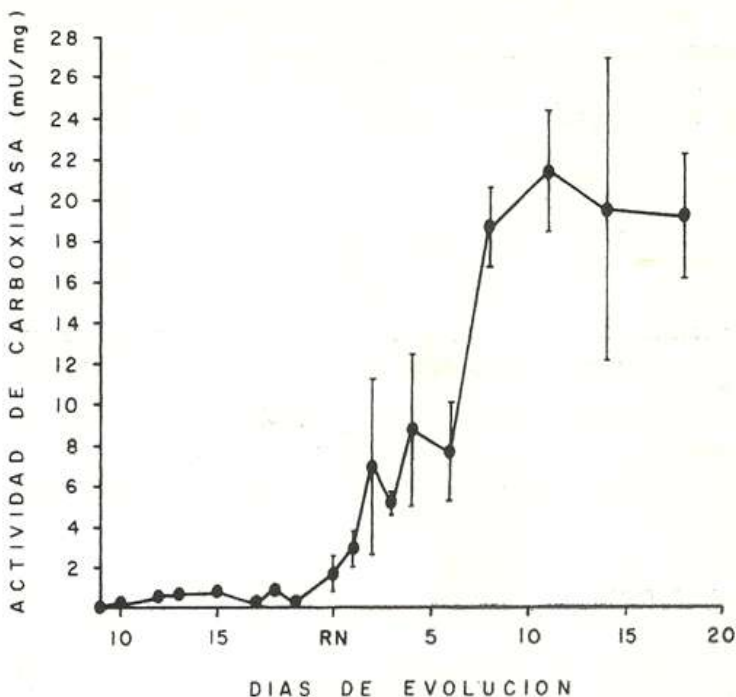


Fig. 1. Actividad de carboxilasa durante diferentes etapas de la evolución. RN representa el pollo recién nacido; los números a la izquierda indican días de incubación del embrión; los de la derecha, edad del pollo. Cada punto del período embrionario se refiere a la actividad del conjunto de cinco a doce órganos y cada punto del período después del nacimiento, al promedio de tres a cinco determinaciones. Las líneas verticales representan la desviación standard.

tividad obtenida comenzando la reacción con la adición de la enzima, sin incubación previa, no varía con el tiempo, hasta por 30 minutos de incubación (Fig. 2). Esto se observó durante todo el período estudiado.

Como se nota en la gráfica, en presencia de citrato las actividades se mantienen dentro de menos del 20% de diferencia y en ausencia del activador, no sufre ningún incremento con el tiempo.

Efecto de la filtración por Sephadex. Midiendo la actividad del homogeneizado, sin pasar por la columna de Sephadex, se obtuvo una actividad 30% menor, por lo que se consideró con-

CONCENTRACION DE CITRATO (mM)*

EDAD	0	2	5	10	20
Embrión 9 d.	0,004	0,049	0,062	0,042	0,021
" 15 d	0,013	0,522	0,730	0,690	-
Recién nacido	0,030	0,880	1,600	1,470	-
Pollo 4 d.	0,040	3,460	4,560	3,470	-
" 11 d.	0,200	12,200	19,300	15,700	7,070
" 18 d.	0,120	11,500	16,000	11,700	-

* Representa la concentración del activador en el medio de incubación y en el de ensayo.

Tabla 1. Efecto de la concentración de activador sobre la actividad de la carboxilasa. Las actividades están expresadas en mU/mg de proteína.

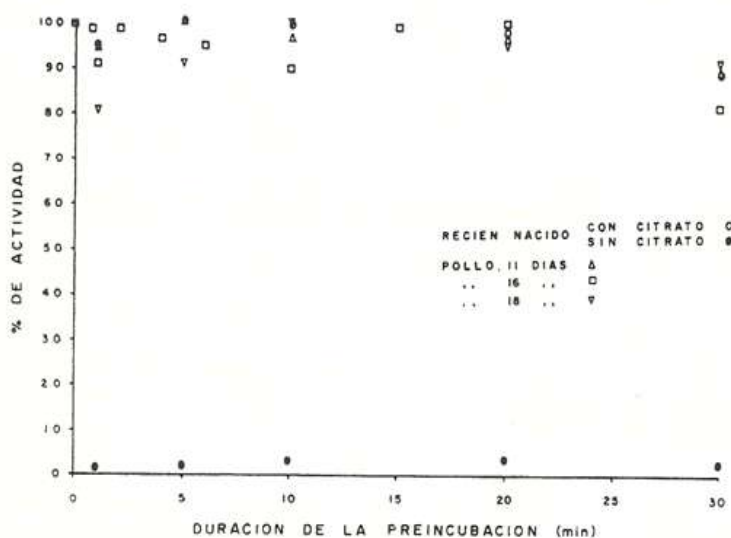


Fig. 2. Actividad relativa de carboxilasa usando diferentes tiempos para la preincubación. Las condiciones son las indicadas en Material y Método.

veniente este método de filtración, el cual tal vez remueve inhibidores de bajo peso molecular.

Linealidad de la reacción. La reacción fue completamente lineal a los 10 minutos, tiempo utilizado para el ensayo, con aproximadamente 0,7 mmoles de malonil CoA formado (Fig. 3). Se nota que en ausencia de citrato, no existe prácticamente actividad enzimática.

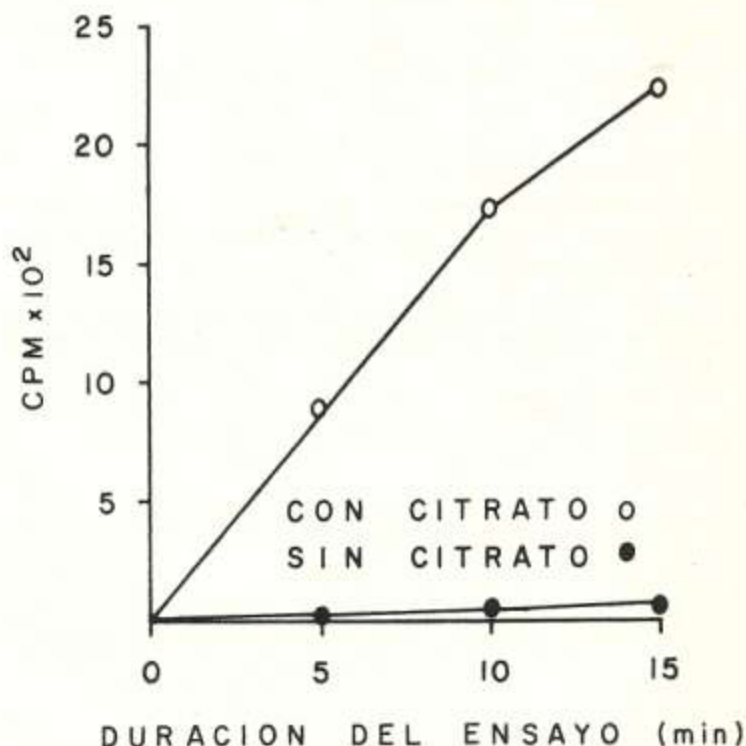


Fig. 3. Efecto del tiempo de duración del ensayo sobre la linealidad de la reacción catalizada por la carboxilasa, en presencia o ausencia del activador.

Efecto de la biotina sobre la actividad de la carboxilasa embrionaria. Con el fin de determinar el efecto que pueda tener la adición de biotina sobre la actividad de la carboxilasa, se colocó en el medio de preincubación un exceso de dicho compuesto. No se observó (Tabla 2) ningún efecto debido a su presencia, con ninguna de las concentraciones usadas. Colocando la biotina directamente en el medio de ensayo, sin incubación previa, tampoco se observó ningún efecto.

ACTIVIDAD DE LA CARBOXILASA (mU/mg)

Biotina en preincubación, ug	Exp. 1 (0,31 mg)	Exp. 2 (0,78 mg)	Exp. 3 (0,16 mg)	Exp. 4 (0,16 mg)	Exp. 5 (0,58 mg)
0,0	0,660	0,555	0,830	1,150	0,200
0,5	0,682	0,558	-	1,170	0,213
1,0	0,650	0,524	0,834	1,170	-
5,0	0,662	0,540	0,895	1,120	0,206

Tabla 2. Efecto de la biotina sobre la actividad de la carboxilasa embrionaria. Los experimentos 1 y 2 fueron realizados con embriones de 13 días; 3 y 4 con embriones de 18 días, sin incubación previa y con incubación de 30 min. respectivamente; 5 con embriones de 19 días. Las cifras entre paréntesis representa la cantidad de proteína usada en cada experimento.

DISCUSION

El estudio comparativo de la lipogénesis en roedores y aves nos indica que existen notables diferencias durante su evolución. Se sabe que este proceso es sumamente activo en el hígado fetal de rata, especialmente durante la tercera parte de la vida embrionaria^{2, 26}; con el nacimiento decrece marcadamente, probablemente debido al gran contenido en grasa de la leche con que se alimenta el animal. Una vez sobrevenido el destete se logran nuevamente niveles altos de lipogénesis que caracterizan al adulto². Además parece ser que en los roedores el tejido adiposo es el sitio de mayor formación de ácidos grasos¹⁴.

En el caso de las aves, en el tejido adiposo no se lleva a efecto más que el 30% del total de la síntesis, correspondiendo al hígado la mayor función¹⁴. El desarrollo de la lipogénesis en el hígado de estos animales ocurre de manera muy diferente a los roedores: aparece solamente con el nacimiento⁷ llegando a alcanzar valores muy elevados en los primeros días. Esto se manifiesta por una actividad muy baja de la enzima reguladora de la biosíntesis de los ácidos grasos—acetil CoA carboxilasa—durante el período embrionario y una elevación después del nacimiento, concomitante con el aumento de la lipogénesis. La curva de aparición de la enzima, sin embargo, difiere un poco de la curva de la lipogénesis en los primeros días, ya que la actividad de la carboxilasa no sube bruscamente, a diferencia de otras

enzimas relacionadas con la lipogénesis como la citrato liasa^{5, 6} y la enzima málica⁸, que sí suben bruscamente.

Felicioli y Gabrielli⁶ encuentran que la citrato liasa alcanza en dos días una actividad de unos 20 mumoles/mg, mientras que la carboxilasa sólo alcanza a 7 mumoles/mg. A los 11 días, cuando la carboxilasa tiene su máximo de 21 mumoles/mg, la liasa ha disminuido notablemente en actividad. Esta caída de la liasa se produce ya a los 5 días.

O sea que en el período embrionario no hay lipogénesis ni tampoco actividad de la carboxilasa ni la liasa. Sin embargo, después del nacimiento, la lipogénesis (determinada por la incorporación de $^3\text{H}_2\text{O}$ en ácidos grasos) aumenta bruscamente⁷ en 24 horas y continúa en aumento hasta los 7-8 días obteniéndose actividades de hasta 350 veces mayores, manteniéndose altas hasta el adulto. La citrato liasa sube en el mismo momento en que aparece la lipogénesis, aunque no en la misma proporción, mientras que la carboxilasa tarda unos 6-8 días en alcanzar sus cifras máximas.

Por lo tanto, existe una aparente disociación entre la aparición de la lipogénesis y la actividad de la carboxilasa en los primeros días que siguen al nacimiento, y también una disociación entre la actividad lipogénica, la cual se mantiene alta después del 8º día, y la caída de la actividad correspondiente a la liasa. Goodridge considera⁷ que la magnitud de la respuesta lipogénica observada por él fue sorpresivamente alta ya que el hígado de pollo durante la primera semana del nacimiento contiene aún gran cantidad de grasa.

La existencia de metabolitos inhibidores durante el período embrionario fue reducida en parte al hacer el experimento en homogeneizados que luego fueron filtrados a través de una columna de Sephadex. Cuando no se filtró, se obtuvo una disminución de la actividad en un 30%.

La probable contaminación con avidina, proteína contenida en la clara del huevo y potente inhibidora de la carboxilasa al unirse firmemente con la biotina, fue eliminada incubando la enzima con un exceso de biotina, lo que no alteró la actividad existente.

Se piensa que la carboxilasa no existe durante el período embrionario y no que está inhibida, como se ha dicho, debido a factores dietéticos. Debido a estos mismos factores dietéticos, el embrión no necesita producir grasa, pues ésta le viene de la yema y será en el momento del nacimiento, con la desaparición de la yema como elemento nutritivo, que se hace necesario estimule su propia producción, probablemente bajo la inducción de alguna sustancia que contiene la nueva dieta. Goodridge observó⁹ que si se mantenía el animal sin alimentación, no ocurría la lipogénesis.

La elevación de la actividad de las enzimas catalizadoras de la síntesis de ácidos grasos que se observa al alimentar ratas sometidas previamente a un período de ayuno, es debida a una síntesis adaptativa de nueva proteína enzimática, lo que se comprobó¹³ al obtener una inhibición de la elevación de actividad con la administración de inhibidores de la síntesis proteica. Por lo tanto, en nuestro caso probablemente también estemos en presencia de una síntesis adaptativa que ocurre con el nacimiento.

Kornacker y Lowenstein¹⁵ encontraron que en ratas, la actividad de la citrato liasa hepática se redujo después de 48 horas de ayuno y aumentó con la realimentación, lo que los llevó a concluir que los cambios en la síntesis de ácidos grasos y la actividad de la citrato liasa ocurren en paralelo y que por lo tanto, están estrechamente relacionados. Sin embargo, Srere y Foster²³ reportan comportamiento no paralelo de la actividad de la citrato liasa y la síntesis de ácidos grasos en hígados de ratas en ayunas, estudiando estos eventos en las horas inmediatas al ayuno. Observaron que 6 horas después de la última ingestión de alimento, la síntesis de ácidos grasos permaneció igual, mientras que la actividad de la citrato liasa subía muy poco. A las 12 horas ocurría una marcada disociación, la síntesis descendía un 67%, mientras que la liasa aumentaba en un 13%, y era sólo a las 24 horas cuando empezaba a decaer la actividad de la liasa, la cual se hace evidente a las 48 horas. Por lo tanto ellos sugieren que las disminuciones de actividad enzimática son eventos secundarios más que primarios, conclusiones similares a las que han llegado¹⁷ otros autores con la carboxilasa. Así pues, las alteraciones en el metabolismo parecen ser iniciadas por cambios en la concentración de modificadores enzimáticos, más que por cambios en la concentración de enzimas.

Se ha establecido que la acetil CoA carboxilasa puede existir "in vitro" como monómero inactivo o como polímero enzimáticamente activo^{11, 19, 22, 25}. La conversión de uno a otro tiene lugar en presencia de un modificador alostérico, el citrato. Durante todo el período estudiado, la concentración óptima de citrato necesaria para activar la carboxilasa fue de 5 mM, observándose una marcada inhibición cuando se alcanzan concentraciones de 20 mM, al igual que con la carboxilasa pura aislada del hígado del animal adulto¹⁰, y a diferencia de la rata, cuya concentración óptima es de 20 mM⁴. Tampoco se observó variación con el desarrollo en cuanto a la propiedad de la carboxilasa de ser activada instantáneamente por el citrato¹⁰ a diferencia de la de hígado de rata⁴ en la cual se observa un retardo en la activación, la cual es progresiva. A pesar de que se usó frecuentemente una preincubación de 30 minutos, ésta no es necesaria, y la actividad observada en experimentos sin preincubación se conservó casi inalterable hasta los 30 minutos, cuando apenas se obtuvo una pérdida del 10%.

Se piensa que el nivel de citrato en la región extramitocondrial de la célula puede ser el regulador de la activación de la carboxilasa a través de la polimerización. De esta forma el nivel de citrato regularía la velocidad de síntesis de los ácidos grasos. Herrera y Freinkel¹² y Start y Newsholme²⁴, han encontrado que la concentración celular de citrato en ratas en ayunas de 12-48 horas, cae marcadamente. Sin embargo, para considerar al citrato como regulador fisiológico importante, sería necesario demostrar que el nivel de citrato en la vecindad de la acetil CoA carboxilasa cambia apropiadamente a medida que la biosíntesis de ácidos grasos varía de una velocidad insignificante en ayunas a una velocidad alta durante la realimentación. Ya que estos datos aún no existen, esta hipótesis permanece tan solo como una atractiva posibilidad¹⁸.

RESUMEN

Usando el método de incorporación de $H^{14}CO_3^-$ en malonil CoA se encuentra que la actividad de la acetil CoA carboxilasa hepática durante el período embrionario del pollo es sumamente baja, y que es después del nacimiento del animal cuando empieza a subir marcadamente. Este incremento en actividad, sin em-

bargo, no es de aparición tan brusca ni tan elevada como la aparición de la lipogénesis y de otras enzimas relacionadas, encontradas por otros autores, existiendo por lo tanto una aparente disociación entre aparición de la lipogénesis y patrón de actividad de la carboxilasa.

Durante todo el período embrionario así como después del nacimiento, la acetil CoA carboxilasa muestra una completa dependencia por su activador, el citrato, cuya concentración óptima es de 5 mM. Esta activación es inmediata y no requiere de incubación previa.

La adición de biotina en exceso no altera la actividad de la enzima embrionaria, por lo que se descarta la presencia de avidina como contaminante responsable de la baja actividad.

SUMMARY

Using the $H^{14}CO_3^-$ incorporation method into malonyl CoA it was found that the liver acetyl CoA carboxylase activity during the embryonic period is quite low and it is only after the chick hatches, that the activity starts to increase markedly. This increase in activity, however, is not parallel to the promptness and magnitude of the appearance of lipogenesis and related enzymes found by others authors. An apparent dissociation appears to exist between lipogenesis and activity of acetyl CoA carboxylase.

During the whole period under study the carboxylase shows a complete dependence for the activator, citrate, whose optimal concentration was 5 mM. The activation is achieved immediately and it does not require any preincubation time.

Addition of an excess of biotin does not alter the activity of the embryonal enzyme, discarding the presence of avidin as a contaminant responsible for the low activity.

AGRADECIMIENTO

A la Incubadora Vilva por el generoso suministro de animales. Al Sr. Enrique Colina por su valiosa colaboración técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 — BAILEY, L. J. "Techniques in Protein Chemistry". Pág. 340. 2a. edición. Elsevier Publishing Co. Amsterdam. 1967.
- 2 — BALLARD, F. J.; HANSON, R. W. "Changes in lipid synthesis in rat liver during development". *Biochem. J.* 102: 952-958. 1967.
- 3 — CHANG, H. C.; SEIDMAN, I.; TEEBOR, G.; LANE, M. D. "Liver acetyl CoA carboxylase and fatty acid synthetase: relative activities in the normal state and in hereditary obesity". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 28: 682-686. 1967.
- 4 — FANG, M.; LOWENSTEIN, J. M. "Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. The regulation of fatty acid synthesis by rat liver extracts". *Biochem. J.* 105: 803-811. 1967.
- 5 — FELICOLI, R. A.; GABRIELLI, F. "The citrate cleavage enzyme activity in chick embryo and chicken liver during development". *Experientia* 23: 1000-1001. 1967.
- 6 — GEORGE, J. C.; THOMAS IYPE, P. "Lipase activity in the chick liver during development". *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 109: 826-828. 1962.
- 7 — GOODRIDGE, A. G. "Conversión of ($U-^{14}C$) glucose into carbon dioxide, glycogen, cholesterol and fatty acids in liver slices from embryonic and growing chicks". *Biochem. J.* 108: 655-661. 1968.
- 8 — GOODRIDGE, A. G. "Citrate-cleavage enzyme, 'malic' enzyme and certain dehydrogenases in embryonic and growing chicks". *Biochem. J.* 108: 663-666. 1968.
- 9 — GOODRIDGE, A. G. "The effect of starvation and starvation followed by feeding on enzyme activity and the metabolism of ($U-^{14}C$) glucose in liver from growing chicks". *Biochem. J.* 108: 667-673. 1968.
- 10 — GREGOLIN, C.; RYDER, E.; KLEINSCHMIDT, A. K.; WARNER, R. C.; LANE, M. D. "Molecular characteristics of liver acetyl CoA carboxylase". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 56: 148-155. 1966.
- 11 — GREGOLIN, C.; RYDER, E.; WARNER, R. C.; KLEINSCHMIDT, A. K.; LANE, M. D. "Liver acetyl CoA carboxylase: the dissociation-reassociation process and its relation to catalytic activity". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 56: 1751-1758. 1966.
- 12 — HERRERA, E.; FREINKEL, N. "Interrelationships between liver composition, plasma glucose and ketones, and hepatic acetyl-CoA and citric acid during prolonged starvation in the male rat". *Biochim. Biophys. Acta* 170: 244-253. 1968.

- 13 — HICKS, S. E.; ALLMANN, D. W.; GIBSON, D. M. "Inhibition of hyperlipogenesis with puromycin or actinomycin D". *Biochim. Biophys. Acta* 106: 441-444. 1965.
 - 14 — JANSEN, G. R.; HUTCHISON, C. F.; ZANETTI, M. E. "Studies on lipogenesis in vivo. Effect of dietary fat or starvation on conversion of (¹⁴C) glucose into fat and turnover of newly synthesized fat". *Biochem. J.* 99: 323-332. 1966.
 - 15 — KORNACKER, M. S.; LOWENSTEIN, J. M. "Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. The activities of citrate cleavage enzyme and acetate thiokinase in livers of starved and refed rats". *Biochem. J.* 94: 209-215. 1965.
 - 16 — LEVEILLE, G. A.; O'HEA, E. K.; CHAKRABARTY, K. "In vivo lipogenesis in the domestic chicken". *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 128: 398-401. 1968.
 - 17 — MASORO, E. J. "Biochemical mechanisms related to the homeostatic regulation of lipogenesis in animals". *J. Lipid Res.* 3: 149-164. 1962.
 - 18 — MASORO, E. J. "Physiological Chemistry of Lipids in mammals". Pág. 69-72. W. B. Saunders, Co. 1968.
 - 19 — MATSUHASHI, M.; MATSUHASHI, S.; LYNEN, F. "Zur Biosynthese der Fettssäuren. IV. Die Acetyl-CoA-carboxylase aus rattenleber und ihre Aktivierung durch Citronensäure". *Biochem. Z.* 340: 263-289. 1964.
 - 20 — NEEDHAM, J. "Chemical Embryology". Cambridge University Press, London. 1931.
 - 21 — NOBLE, R. C.; MOORE, J. M. "Studies on the lipid metabolism of the chick embryo". *Canad. J. of Biochem.* 42: 1729-1741. 1964.
 - 22 — NUMA, S.; BORTZ, W.; LYNEN, F. "Regulation of fatty acid synthesis at the acetyl CoA carboxylation step". *Advances Enzym. Regulat.* 3: 407-423. 1965.
 - 23 — SRERE, P. A.; FOSTER, D. W. "On the proposed relation of citrate enzymes to fatty acid synthesis and ketosis in starvation". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 26: 556-561. 1967.
 - 24 — START, C.; NEWSHOLME, E. A. "The effect of starvation and alloxan-diabetes on the contents of citrate and other metabolic intermediates in rat liver". *Biochem. J.* 107: 411-415. 1968.
 - 25 — VAGELOS, P. R.; ALBERTS, A. W.; MARTIN, D. B. "Studies on the mechanism of activation of acetyl Coenzyme A carboxylase by citrate". *J. Biol Chem.* 238: 533-540. 1963.
 - 26 — VILLEE, C. A.; HAGERMAN, D. D. "Effect of oxygen deprivation on the metabolism of fetal and adult tissues". *Amer. J. Physiol.* 194: 457-464. 1958.
-