

NIVELLS D'AMINOÀCIDS PLASMÀTICS EN RATES GESTANTS I EN LLURS FETUS *

Ll. Arola, A. Palou, E. Herrera i M. Alemany **

Introducció Durant l'embaràs, el desenvolupament fetal té efecte gràcies als materials subministrats per la mare, de qui el fetus extreu preferentment glucosa i aminoàcids. La mare compensa aquesta contínua sortida de materials nutritius augmentant l'ingestió d'aliments, fet demostrat en la rata des del dia 12 de la gestació (1), moment en que el fetus inicia una fase d'increment progressiu del seu pes corporal (2). Adhuc aquesta contínua extracció d'elements nutritius de la mare per part del fetus, aquesta aconsegueix mantenir-se en un balanç nitrogenat positiu (3), encara que s'ha demostrat que l'excreció urinària de nitrogen de la mare està incrementada durant l'embaràs en dejuni (4). En aquesta situació, la mare presenta una gran variació en els nivells plasmàtics d'aminoàcids (5,6), destacant-se una forta disminució dels nivells dels aminoàcids gluconeogènics. Això era previsible, ja que el consum d'aminoàcids de la mare pel fetus per a la síntesi de les proteïnes fetals és potenciat per la necessitat de producció de glucosa pels teixits de la mare, car el fetus no està encara plenament capacitat per a la gluconeogènesi (7).

Aquestes consideracions ens permeten comprendre que, tant d'una manera directa com indirecta, el grau de desenvolupament fetal influeix sobre els nivells d'aminoàcids en el plasma de la mare i en el del mateix fetus. De totes maneres, no s'han fet estudis comparatius dels nivells d'aminoàcids circulants en la mare a temps diferents del període de gestació tot relacionantlos amb els nivells assolits pel fetus en les últimes fases de l'embaràs.

Hem intentat donar un cop d'ull a aquest problema determinant els nivells d'aminoàcids en plasma de rates als dies 12 i 21 de la gestació, així com en els fetus d'aquestes últimes mares, comparant-los amb els valors obtinguts en el plasma de rates verges del mateix sexe i edat, utilitzats com a controls. L'estudi ha estat possible malgrat les petites disponibilitats de plasma de fetus, gràcies a un sensible mètode radioquímic per a la valoració dels aminoàcids individuals que hem enllestit recentment (8).

(*) Treball realitzat mitjançant una subvenció de la «Comisión Asesora para la Investigación Científica y Técnica» de la Presidència del Govern.

(**) Càtedra de Fisiologia General, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

Material i mètodes Tot el treball va ser realitzat amb rates de la soca Wistar, utilitzant-se rates prenyades de 12 i 21 dies. El moment de la gestació va determinar-se mitjançant frotis vaginals per a identificar la presència d'espermatozous. Els animals tingueren lliure accés a l'aigua i al menjar.

Les rates es sacrificaren per decapitació, recollint-se la sang en gots heparinitzats per evitar que es coagulés. Els fetus van ser trets del cos de la mare per cesària; un cop alliberats dels embolcalls foren decapitats, i llur sang va ser recollida amb capilars heparinitzats. El plasma, tant de les femelles verges o prenyades com dels fetus, va ser desproteïnit amb acetona (9), i els aminoàcids individuals de l'extracte sobrenedant varen ser determinats mitjançant la seva reacció amb dansil-clorur (Dans-Cl) o 5-5-dimetilamino naftalé 1-sulfonil clorur, marcat en els metils amb C¹⁴. Un cop derivatitzats els aminoàcids, es separen sobre plaques de poliamida, les taques es van identificar a la llum ultraviolada i la radioactivitat present en cada taca va ser determinada per escintil·lació líquida; els resultats es corregiren per la diferent afinitat dels aminoàcids pel Dans-Cl i per les condicions canviant dia a dia de la reacció, utilitzant un control intern de norvalina, afegida abans de desproteïnitzar les mostres, tot segons la tècnica ja descrita per nosaltres anteriorment (8).

Per raons de clarificació els aminoàcids han estat dividits en grups fisiològics artificials segons les seves funcions conegudes en l'organisme: i així en el grup dels aminoàcids aromàtics s'inclouen el triptòfan, la tirosina i la fenilalanina; en el dels sulfurats la "cisteïna" (valor conjunt compost per la cisteïna, el cisteat i la cistina), la taurina i la metionina més l'ornitina (aquest valor es dona conjuntament, ja que és difícil separar-los adequadament l'un de l'altre, tot i que l'ornitina no és un aminoàcid sulfurat); en el grup dels bàsics l'histidina, l'arginina, la lisina i la citrulina; en el dels aminoàcids de cadena ramificada la valina i la leucina més l'isoleucina (també difícils de separar); en el dels iminoàcids la prolina i l'hidroxiprolina; i en el dels aminoàcids «gluconeogenètics» (no inclouen tots els aminoàcids gluconeogenètics, però són un grup d'aminoàcids fisiològicament bastant uniforme que són utilitzats per a la gluconeogènesi) l'alanina, el glutamat més la glutamina (poden separar-se adequadament, però en el procés de derivatització i en la conservació, part dels aminoàcids, com la glutamina i l'asparraguina es desamiden donant els aminoàcids dicarboxílics corresponents, el glutamat i l'aspartat; per això donem el valor conjunt, que és més precís), l'aspartat més l'asparraguina, la serina, l'alfa-amino butirat i la treonina.

Es convenient indicar que per a la rata, els aminoàcids essencials són la treonina, l'histidina, la lisina, la metionina, la leucina, l'isoleucina, la valina, la fenilalanina i el triptòfan.

Resultats

Aminoàcids en plasma de rates controls

A la taula I, es poden veure els valors de concentració d'aminoàcids trobats a les rates verges utilitzades com a controls. Es pot veure que el grup més important des del punt de vista quantitatiu és el dels aminoàcids «gluconeogenètics», dels quals destaquen l'alanina i el glutamat més la glutamina com a principals vectors de carboni dels aminoàcids per a la gluconeogènesi. És important destacar també els elevats nivells de serina, prolina i especialment de lisina, aminoàcid essencial i difícil d'assolir i de taurina, producte del catabolisme dels aminoàcids sulfurats. D'una manera general, els aminoàcids essencials constitueixen aproximadament un terç del total, i els no essencials la resta.

TABLA I: Concentracions d'aminoàcids i de grups d'aminoàcids en el plasma de rates verges adultes.

Aminoàcids «gluconeogenètics»

glutamat més glutamina	977 ± 50
alanina	778 ± 69
serina	387 ± 25
glicina	272 ± 24
treonina	230 ± 12
aspartat més asparraguina	187 ± 13
alfa-amino butirat	53 ± 5
TOTAL d'aminoàcids gluconeogenètics	2733 ± 90

Iminoàcids

prolina	362 ± 30
hidroxiprolina	54 ± 4
TOTAL d'iminoàcids	415 ± 28

Aminoàcids bàsics

lisina	515 ± 48
arginina	221 ± 36
histidina	113 ± 14
citrul.lina	85 ± 7
TOTAL d'aminoàcids bàsics	934 ± 31

Aminoàcids de cadena ramificada

leucina més isoleucina	312 ± 18
valina	502 ± 14
TOTAL d'aminoàcids de cadena ramificada	514 ± 24

Aminoàcids sulfurats

taurina	479 ± 55
metionina més ornitina	127 ± 11
cisteïna més cisteat més cistina	107 ± 6
TOTAL d'aminoàcids sulfurats	714 ± 41

Aminoàcids aromàtics

triptòfan	256 ± 18
tirosina	146 ± 16
fenilalanina	62 ± 4
TOTAL d'aminoàcids aromàtics	464 ± 18

aminoàcids essencials	1801 ± 63
Aminoàcids no essencials	4019 ± 101
Aminoàcids totals	5819 ± 125

Les dades estan expressades en micromols per litre i són les mitjanes i errors tipus corresponents a 7-8 rates diferents.

Variacions d'aminoàcids plasmàtics durant la gestació

A les Figures 1 i 2 hom pot observar els resultats comparatius dels nivells dels diferents aminoàcids trobats a les rates prenyades de 12 i 21 dies i als fetus respecte els controls, indicats aquí com a valor unificador del 100 per cent.

Aminoàcids gluconeogenètics

Els nivells d'alanina baixen significativament en els 12 dies d'embaràs, recuperant-se cap al final de la gestació i donant una alta relació de concentracions entre fetus i mare, més alta que la relació entre fetus i controls. El glutamat i la glutamina, la serina i l'alfa-amino butirat mostren aquest mateix comportament però una mica més atenuat. La glicina per, segueix baixant durant l'embaràs, amb valors mínims als 21 dies. En els fetus els nivells són considerablement elevats, especialment quan es comparen amb els de llurs mares. El nivells d'aspartat més asparraguina i de treonina mantenen oscil·lacions molt baixes, destacant el fet de que en els fetus la concentració no sigui tan elevada com en els altres aminoàcids d'aquest grup. Els aminoàcids glucogenètics es comporten d'una manera conjunta de forma molt similar a la de l'alanina, com es pot veure en la Figura 3, ja que l'alanina constitueix una part molt important dels aminoàcids d'aquest grup.

Iminoàcids

La prolina segueix un esquema de variació dels nivells molt similar al de la glicina (Figura 1), l'hidroxiprolina (Figura 2) dona una relació de concentracions entre mare i fetus extremadament elevada, de l'ordre de tres vegades superior. El conjunt dels iminoàcids (Figura 3) reflexa aquesta situació amb una forta baixada en la mare durant l'embaràs i unes concentracions en el fetus considerables, especialment que són considerades respecte a les mares.

Aminoàcids de cadena ramificada

En els aminoàcids de cadena ramificada, la valina (Figura 1), segueix preferentment l'esquema de distribució de nivells de la glicina, amb valors pel fetus no gaire més elevats que els dels controls, i una baixada progressiva dels nivells durant l'embaràs. Les leucines (Figura 2) presenten un comportament oposat, incrementant-se els nivells durant l'embaràs i donant valors molt alts en els fetus. El conjunt d'ambdós resultats es pot veure (Figura 3) en els valors compostos per a aquest grup d'aminoàcids, en els quals es compensen les variacions individuals durant l'embaràs, i s'obté pels fetus quasi bé una duplicació dels nivells basals dels controls.

Aminoàcids bàsics

En aquest grup trobem que la citrulina (Figura 1) no presenta pràcticament cap mena de variacions ni en l'embaràs ni en els fetus, i l'arginina (Figura 1), l'histidina i la lisina (Figura 2) mostren un comportament simi-

lar, amb nivells que baixen durant l'embaràs i concentracions força elevades en els fetus. Les relacions entre mare i fetus són molt altes, especialment per la lisina, amb una relació de concentracions fetus/mare pròxima a 4. En conjunt aquest grup és potser el que representa diferències més importants entre mare i fetus (Figura 3), amb un comportament conjunt que segueix molt estretament el paper de la lisina, el seu principal component.

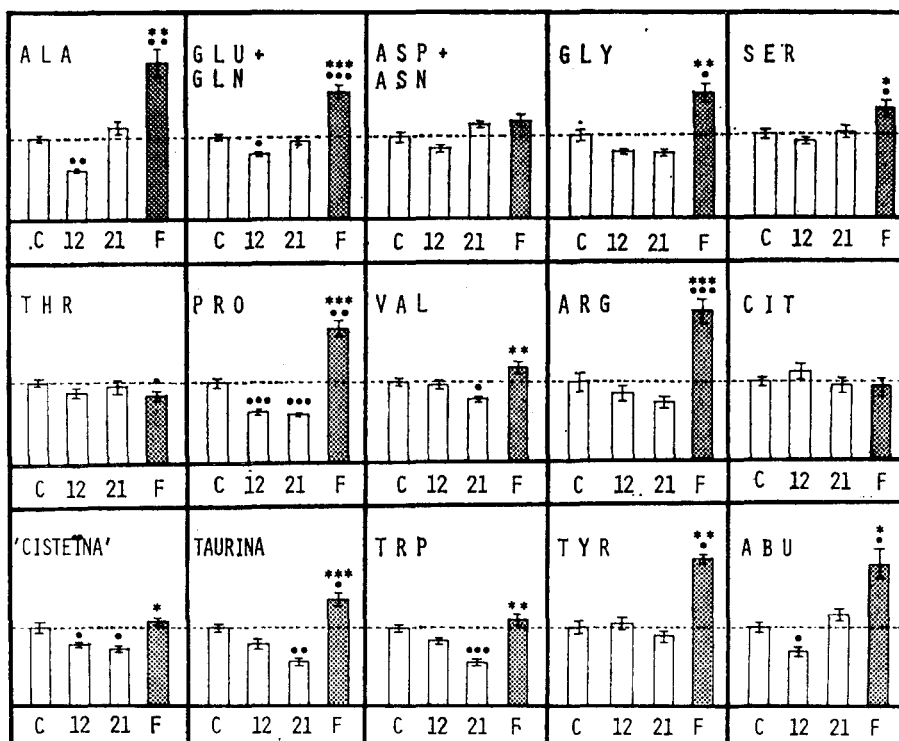


FIGURA 1: Variacions dels nivells d'aminoàcids plasmàtics en la rata gestant als 12 i 21 dies i en els fetus (F) de 21 dies, expressats com a percentatges dels valors dels controls (C).

Els valors de la «cisteïna» inclouen també els de cisteat i cistina. ABU = alfa-aminobutirat. Els altres símbols corresponen als recomanats per la IUPAC-IUB.

Significativitat de les diferències respecte als controls:

o = $p < 0,05$; oo = $p < 0,01$; ooo = $p < 0,001$

Significativitat de les diferències respecte llurs mares:

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Els valors donats són mitjana \pm error tipus de 5 animals per grup.

Aminoàcids sulfurats

Els aminoàcids sulfurats, en general, tendeixen (Figura 3) a minvar lleugerament l'embaràs i a generar un fort gradient entre mare i fetus, en

favor d'aquest últim. La taurina i la «cisteïna» es comporten d'una manera similar (Figura 1) a l'esmentada, però la metionina més l'ornitina (Figura 2), posen degut a l'origen híbrid de les dades (una part sulfurada i un altre bàsica) mostren lleugeres variacions per sobre del nivell dels controls durant la gestació i un fort increment dels valors dels fetus, que és molt superior al que hom pot trobar en la taurina (principal component) o en la cisteïna.

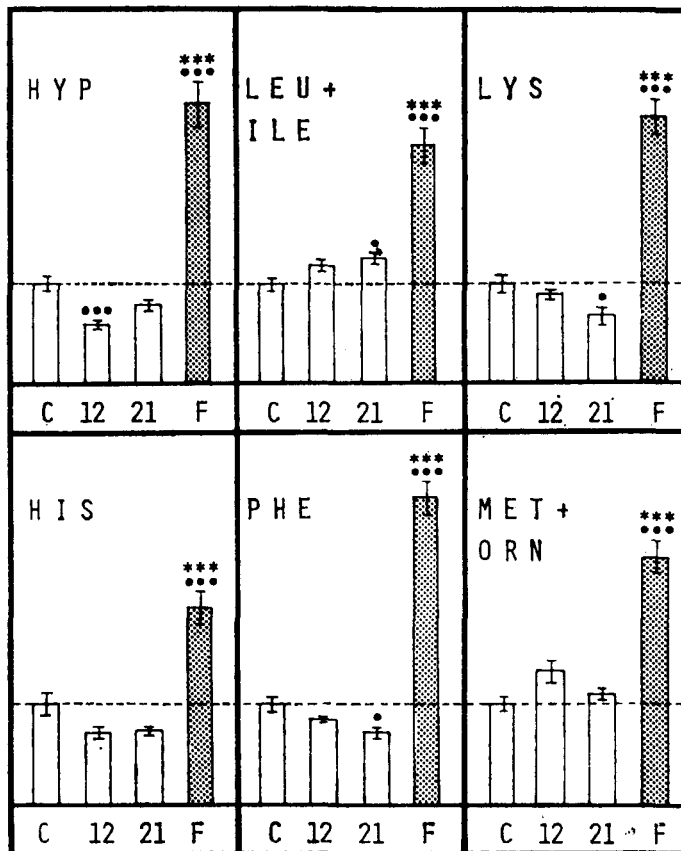


FIGURA 2: Variacions dels nivells d'aminoàcids plasmàtics en la rata gestant als 12 i 21 dies i en els fetus (F) de 21 dies, expressats com a percentatges dels valors dels controls (C).

Els signes convencionals són els mateixos que els de la Figura 1.

Aminoàcids aromàtics

Els aminoàcids aromàtics presenten tots una certa baixada amb l'embaràs, més marcada en el triptòfan i menys en la tirosina (Figura 1). Les relacions fetus/mare són sempre altes, especialment la de la fenilalanina (Figura 2). El triptòfan té uns valors en el fetus molt similars als dels

controls; tot i així són pràcticament el doble dels de llurs mares. El conjunt d'aquests aminoàcids (Figura 3) segueix la tendència descrita de descens progressiu durant l'embaràs i una gran acumulació d'aquests aminoàcids en la sang dels fetus, tant respecte a la mare com respecte als controls.

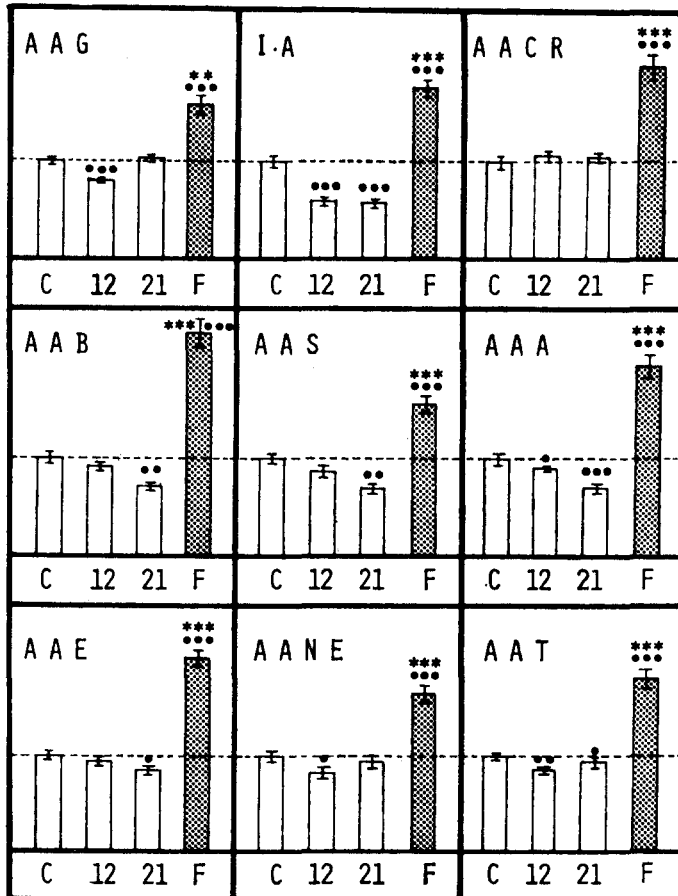


FIGURA 3: Variacions dels nivells de grups d'aminoàcids plasmàtics en la rata gestant als 12 i 21 dies en els fetus (F) de 21 dies, expressats com a percentatges dels valors del controls (C).

AAG = aminoàcids «gluconeogenètics»; IA = iminoàcids; AACR = aminoàcids de cadena ramificada; AAB = aminoàcids bàsics; AAS = aminoàcids sulfurats; AAA = aminoàcids aromàtics; AAE = aminoàcids essencials; AANE = aminoàcids no essencials; AAT = aminoàcids totals.

Els signes convencionals són els mateixos que els de la Figura 1.

Aminoàcids totals

En la Figura 3 es poden veure els gràfics corresponents al conjunt d'aminoàcids essencials i al dels no essencials. Els essencials tendeixen a

disminuir els seus nivells amb l'embaràs, seguint en la seva distribució el patró de la lisina i de la fenilalanina com exemples més representatius, amb uns nivells molt elevats en els fetus, pràcticament el doble dels dels controls i més del doble dels de les mares. En els aminoàcids no essencials s'adverteix molt l'influència de l'alanina i altres aminoàcids glucogenètics en el sentit de que a l'embaràs es produeix un descens clar als 12 dies, que cap als 21 ja s'ha recuperat considerablement. Les diferències dels fetus respecte a les mares i als controls no són tan marcades com en els aminoàcids essencials. Els aminoàcids totals (Figura 3) mostren un clar descens dels nivells d'aminoàcids durant l'embaràs que és més important als 12 que als 21 dies (conseqüència de la forta presència d'aminoàcids no essencials respecte als essencials) i una relació de concentracions de fetus/mare de l'ordre de 2 aproximadament.

Discussió Les concentracions d'aminoàcids indicades per a les rates femelles verges coincideixen d'una manera general amb les dades publicades per altres autors (8, 10, 11, 12, 13). Els aminoàcids ramificats tenen concentracions similars a las de Scharff i Wool (13) i les de Bloxam i Fisher (14), els nostres valors d'iminoàcids són similars als de Ferris i Clark (12) i els «gluconeogenètics» als de Christophe i altres (11) i als de Itoh i altres (15). Els valors trobats d'aminoàcids sulfurats són generalment més elevats que els generalment citats en la literatura, probablement per l'inclusió de la taurina. En general coincideixen amb les dades de Scharff i Wool (13). La lisina trobada en les mostres estudiades estava considerablement per sobre de les dades que hom pot trobar a la bibliografia (10), del mateix ordre (14) i fins i tot més baixes que les descrites per Itoh i altres (15). Els valors de triptòfan són també molt més alts que els indicats a la bibliografia (16), probablement degut a que en el nostre mètode de desproteïnitació s'aconsegueix una total alliberació del triptòfan lligat a la fracció proteïca del plasma.

El fet de que els aminoàcids plasmàtics presentin un descens considerable durant la gestació ha estat descrit des de fa molt temps (3); aquí hem trobat que aquest efecte és més pronunciat als 12 que als 21 dies de gestació, raó per la qual nombrosos autors que estudiaren el fenomen de la gestació indicaren resultats aparentment contradictoris (5, 6) ja que s'utilitzaren rates cap al final de la gestació. L'alanina és, amb els altres aminoàcids gluconeogenètics, el principal responsable de la recuperació dels nivells dels aminoàcids totals cap al final de l'embaràs; la raó d'aquest comportament cal cercar-la en una disminució de l'utilització metabòlica d'aquests aminoàcids per la mare a partir dels 12 dies, i un augment en l'ingestió d'aliment (1). Aquesta data és una fita que marca el canvi de la primera a la segona fase de la gestació, caracteritzada per un fort creixement sigmoidal del fetus, i un augment paradoxal en l'excreció nitrogenada (4), que hom pot explicar parcialment per l'utilització dels aminoàcids pel fetus i a l'excreció de les desfetes d'aquest mitjançant la mare, així com un descens en la capacitat de retenció dels aminoàcids pel ronyó. L'increment de l'excreció nitrogenada en la última fase de l'embaràs coincideix amb l'implantació de fortes mesures de conservació del nitrògen amínic instaurades amb la finalitat de protegir la cobertura de necessitats d'aminoàcids del fetus (17). La mare tracta d'evitar l'utilització excessiva d'ami-

noàcids per la gluconeogènesi, que és similar a la dels controls al final de la gestació (4), raó per la qual es probable que es conserven millor els nivells dels aminoàcids més utilitzats per la gluconeogènesi: alanina, serina, glutamat més glutamina, etc. La majoria dels altres aminoàcids, especialment els essencials, indiquen una forta tendència al descens durant la gestació; els que ho mostren més clarament són la prolina, la lisina, la valina, la «cisteïna», la taurina, el triptòfan i la fenilalanina; aquesta disminució podria ésser explicada lògicament per l'efecte xuclador del fetus, que s'emporte una considerable massa d'aminoàcids per a la síntesi de proteïna pròpia, així com de prolina i glicina per a la síntesi de collagen. El cas de la taurina no està gaire clar, ja que encara no es coneix el mecanisme de la seva utilització en l'organisme. Se sap, però, que en els òrgans dels animals joves la concentració de taurina és molt considerable (18) tot i que encara no se sap quin és el paper fisiològic que pot jugar, especialment en el múscle en plé desenvolupament.

Les concentracions d'aminoàcids en el plasma dels fetus de les rates són considerablement més elevats que els de llurs mares i que els dels controls adults; aquests resultats coincideixen de manera general amb altres dades publicades per altres autors (19, 20, 21, 22) indicant l'existència d'un procés actiu de concentració dels aminoàcids per la placenta en el costat fetal (19). És curiós observar que la distribució percentual dels aminoàcids en els fetus és molt més semblant a la dels adults que a la de llurs mares d'una manera general; les relacions de concentracions entre controls i fetus són molt més constants que les relacions entre fetus i mare. Probablement hi ha considerables diferències respecte a la capacitat de la placenta per a concentrar aminoàcids, discriminant en principi en favor dels aminoàcids essencials, però mantenint, en definitiva una distribució general molt similar a la dels adults no gestants. A les mares, la pèrdua d'aminoàcids produïda per les demandes fetals sembla que és parcialment compensada per un increment relatiu dels aminoàcids no essencials, mantenint la concentració total vorejant els valors normals en una relació clarament homeostàtica.

Les relacions materno-filials trobades aquí, son generalment més elevades que les descrites en la bibliografia, encara que entren dintre de l'ordre general de dades descrites per a situacions similars (20, 21, 22, 23). La diferència es troba principalment en el fet de que les dades generalment descrites en la bibliografia es refereixen a comparacions entre la sang umbilical de nadons humans comparada amb la de llurs mares. La diferència amb les rates no és massa considerable, però sí que ho és el moment de l'agafada de mostres, ja que en el nostre cas ho hem fet poc abans de que s'indueixi el part natural de la rata (dia 22 de gestació normalment), agafant-se així un punt realment més representatiu de la situació fetal que les dades obtingudes en el moment del naixement. Només hem trobat valors més baixos que els dels controls per la treonina; aspartat i asparaguina, citrullina, valina, «cisteïna» i triptòfan, però, no indiquen increments significatius respecte als controls; quan es comparen amb les concentracions de les mares només la citrullina, l'aspartat més l'asparaguina i la treonina mantenen la manca de significació estadística en les diferències respecte a llurs mares.

En la rata gestant es dona una forta tendència cap a la conservació pròpia del nitrògen amínic, combinada amb unes necessitats cada cop més

marcades en el fetus, que va xuclant de la mare tot el que necessita. Cal suposar que el fetus utilitza aquests aminoàcids preferentment per a la síntesi proteica, ja que les seves necessitats energètiques semblen prou assolides amb el considerable suministre de glucosa i cossos cetònics que lliura la mare a través de la placenta (24, 25).

Resum S'efectuaren medicions d'aminoàcids individuals del plasma en rates verges i de 12 i 21 dies de gestació, així com en fetus de 21 de vida intrauterina, mitjançant un micromètode radioquímic de marcatge amb DansCl (C^{14}). Als 12 dies de gestació s'observà un descens significatiu, respecte als controls verges, dels nivells d'aminoàcids totals, degut especialment a una forta baixada dels principals aminoàcids glucogenètics. Als 21 dies s'aprecià una certa recuperació, però els nivells són encara significativament més baixos que els dels controls, àdhuc el fort increment en la ingestió d'aliment que hom pot observar des del dia 12 de gestació. Els aminoàcids gluconeogenètics (alanina, glutamat, glutamina, etc.) acusen més fortament aquest efecte, amb un mínim als 12 dies, tot recuperant-se als 21 dies. Els aminoàcids essencials van baixant d'una manera general, amb un mínim cap al final de la gestació. En els fetus s'observen elevades concentracions d'aminoàcids, que són estadísticament significatives tant respecte a la mare com respecte a les rates control. Les relacions de concentració entre fetus i mare dels aminoàcids estudiats indiquen una considerable capacitat de concentració que és màxima en la lisina, la fenilalanina i la hidroxiprolina. La continuada extracció d'aminoàcids de la mare per part dels fetus és un factor fonamental per a llur desenvolupament, però produeix una considerable alteració en l'equilibri metabòlic nitrogenat de la mare.

Summary Measurements of certain aminoacids in plasma were performed in virgin rats, in rats at the 12th and 21st day of pregnancy and in rat-foetus at their 21st day of intrauterine life, with a radioactive tracer-micromethod (Dans C^{14}). At the 12th day of pregnancy a significant reduction in the total aminoacid concentration was observed, this lowering being the consequence of an intense reduction of the neoglucogenic aminoacids (alanine, glutamate, glutamine, etc...) whose maximum took place at the 12th day. At the 21st day a certain recovery was stated, but the levels—however—were lower than those found in the controls notwithstanding the increase in the ingestion of food normally observed from the 12th day of pregnancy up. The essential aminoacids plasmatic concentration decreases progressively during the pregnancy attaining its minimum at this end. High aminoacids concentration (statistically significant) were observed in the foetuses when compared with their respective mothers and with the controls rats.

The ratios between foetus and mother levels suggest the existence of a considerable concentration ability, whose maximum was found for lysine, phenyl-alanine and hydroxiproline. Continuous aminoacids drainage from the mother by the foetus is a fundamental fact for his intrauterine development, but it gives place to significant changes in the mother's metabolic aminoacid equilibrium.

Bibliografia

1. Knopp, R., Boroush, M. A., O'Sullivan, J. B.: Lipid metabolism in pregnancy II. Postheparin lipolytic activity and hypertriglyceridemia in the pregnant rat. *Metabolism*, 24: 481-493, 1975.
2. Stotsenburg, J. M.: The growth of the fetus on the albino rat from the thirteenth to the twenty-second day of gestation. *Anat. Rec.*, 9: 667-682, 1915.
3. Beaton, G. H., Beare, J., Ryu, M. H., McHenry, E. W.: Protein metabolism in the pregnant rat. *J. Nutr.*, 54: 291-304, 1954.
4. Herrera, E., Knopp, R. H., Freinkel, N.: Carbohydrate metabolism during pregnancy VI: Plasma fuels, insulin, liver composition, gluconeogenesis and nitrogen metabolism during late gestation in the fed and fasted rat. *J. Clin. Invest.*, 48: 2260-2272, 1969.
5. Metzger, B. E., Hare, J. W., Freinkel, N.: Carbohydrate metabolism during pregnancy IX: Plasma levels of gluconeogenesis fuels during fasting in the rat. *J. Clin. Endocrinol.*, 33: 869-872, 1971.
6. Felig, P., Kim, Y. J., Lynch, V., Hendler, R.: Amino acid metabolism during starvation in human pregnancy. *J. Clin. Invest.*, 51: 1195-1202, 1972.
7. Girard, J. R., Guillet, I., Marty, J., Marliss, E. B.: Plasma amino acid levels and development of hepatic gluconeogenesis in the newborn rat. *J. Physiol.*, 229: 466-473, 1975.
8. Arola, L.I., Palou, A., Herrera, E., Alemany, M.: Determination of plasma amino acids in small samples with the use of Dansylchloride. *Biochimie*, 58: 1221-1226, 1976.
9. Arola, L.I., Herrera, E., Alemany, M.: A new method for deproteinization of small samples of blood plasma for amino acids determination. *Anal. Biochem.*, en prensa, 1977.
10. Minemura, T., Lacy, W. W., Crofford, O. B.: Regulation of the transport and metabolism of amino acids in isolated fat cells. *J. Biol. Chem.*, 245: 3872-3881, 1970.
11. Christophe, J., Winand, J., Kutzner, R., Hebbelinc, M.: Amino acid levels in plasma, liver, muscle and kidney during and after exercise in fasted and fed rat. *Am. J. Physiol.*, 221: 453-457, 1971.
12. Ferris, C. M., Clark, J. B.: Early changes in plasma and hepatic free amino acids in partially hepatectomised rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 273: 73-79, 1972.
13. Scharff, R., Wool, I. G.: Effect of diabetes on the concentration of amino acids in plasma and heart muscle or rats. *Biochem. J.*, 99: 173-178, 1966.
14. Bloxam, D. L., Fisher, M. M.: Effects of ethionine on amino acids concentrations in liver and blood of male and female rats. *Lab. Invest.*, 31: 705-711, 1975.
15. Itoh, H., Kishi, T., Chibata, I.: Plasma amino acids and stomach contents of rats fed casein and the corresponding amino acid mixture. *J. Nutr.*, 104: 386-394, 1974.
16. Tagliamonte, A., Gessa, G., Biggio, G., Vargiu, L., Gessa, G. L.: Daily changes of free serum tryptophan in humans. *Life Sci.*, 14: 349-354, 1974.
17. Freinkel, N., Metzger, B. E., Nitzan, M., Hare, J. W., Shambaugh, G. E., Marshall, R. T., Surmaczynska, B. Z., Nagel, T. G.: «Accelerated starvation» and mechanisms for the conservation of maternal nitrogen during pregnancy. *Isr. J. Med. Sci.*, 8: 426-439, 1972.
18. Scharf, R., Wool, I. G.: Concentration of amino acids in rat muscle and plasma. *Nature*, 202: 603-604, 1964.
19. Crumpler, H. R., Dent, C. E., Lindan, O.: The amino acid pattern in human foetal and maternal plasma at delivery. *Biochem. J.*, 47: 223-227, 1950.
20. Glendingen, M. B., Margolis, A. J., Page, E. W.: Amino acid concentrations in fetal and maternal plasma. *J. Obst. Gynecol.*, 8: 591-593, 1961.
21. Ghadimi, H., Pecora, P.: Free amino acids of cord plasma as compared with maternal plasma during pregnancy. *Pediatrics*, 33: 500-506, 1964.
22. Berry, H. K., Poncet, I. B., Sutherland, B. S., Burkett, R.: Serum amino acid concentrations during pregnancy of women heterozygous for phenylketonuria. *Biol. Neonate*, 26: 102-108, 1975.
23. Butterfield, L. J., Walker, D. M., O'Brien, D.: Transplacental amino acid gradients. *Ann. Meet. Atlantic City*, p. 134, 1962.
24. Scow, R. O., Chernick, S. S., Brinley, M. S.: Hiperlipemia and ketosis in the pregnant rat. *Am. J. Physiol.*, 206: 796-800, 1964.
25. Freinkel, N., Herrera, E., Knopp, R. H., Ruder, H. J.: Metabolic realignments in late pregnancy: A due to diabetogenesis. A: «Early Diabetes» (Carnerini-Davalos, R. i Cole, H. S., Editors). Nova York, Academic Press, 1970, pags. 205-215.