

MODIFICACION POSTNATAL DEL FENOTIPO CAUSADA POR LA DESNUTRICION

I

PATRON DE ACTIVIDAD PROTEOLITICA DEL HIGADO¹

DR. JOAQUÍN CRAVIOTO²

Se desnutrieron ratas durante los primeros 21 días de la vida, mediante la reducción de la ingesta de leche materna, producida por la presencia de un número excesivo de animales en la camada. La determinación de actividad proteolítica a pH 7.0 y 4.5 en homogenizado de hígado total reveló la presencia de un patrón diferente de actividad al encontrado para el animal normal en función de la edad. A pesar de que los animales desnutridos fueron realimentados a partir del día 21 con dietas adecuadas, el nuevo patrón enzimático no regresó a lo normal.

Cuando ratas normalmente criadas durante la lactancia fueron desnutridas gravemente mediante reducción de la ingesta alimentaria, su patrón de actividad proteolítica a pH 7.0 y pH 4.5 fue muy semejante al que presentan a la misma edad las ratas que habían sufrido desnutrición en los primeros 21 días de la vida. La producción de esta modificación en un sistema de regulación metabólica, añade un dato más en apoyo de la idea de que el período crítico para el desarrollo de la rata se encuentra comprendido en las primeras semanas de la vida. Durante este período manipulaciones de cierta magnitud son capaces de producir un nuevo fenotipo. (GAC. MÉD. MÉX. 98: 523, 1968).

DEBIDO a las relaciones tan íntimas que guardan entre sí el estado nutricional de la familia y su posición en

la escala social, existe cierta tendencia a concluir que el estado social *per se* es capaz de producir los trastornos de desarrollo y crecimiento que se observan en estos individuos.

¹ Trabajo de ingreso a la Academia Nacional de Medicina, presentado en la sesión ordinaria del 8 de noviembre de 1967.

² Académico numerario, Hospital Infantil de México.

Es bien cierto que en casi todas las sociedades los individuos desnutridos

y los niños sujetos a mayor riesgo de desnutrición, tienden a concentrarse en los segmentos más desfavorecidos de la población. Estos segmentos difieren significativamente del resto no únicamente en su mayor riesgo de exposición a desnutrición e infección sino también en otra gran cantidad de variables, tales como bajos niveles de saneamiento, poco poder de compra, pobre educación formal, mayor conservación de patrones tradicionales de cuidado al niño.¹ Todas estas variables son expresiones de una manera de vivir que inevitablemente reduce la posibilidad de alcanzar una competencia adecuada en los niveles tecnológico y cultural.² Parece ser que los efectos de esas circunstancias pueden ser intergeneracionales y expresarse como el facsímil de un proceso familiar o hereditario.³

Considerando estos hechos y sus asociaciones es desde luego inevitable que cualquier consecuencia en el crecimiento y desarrollo del niño derivada de estas condiciones de mayor riesgo, estará estadísticamente asociada al estado social. Sin embargo, es desafortunado que la interpretación se haga en el sentido de que la clase social es el factor determinante. Es una situación de tan grande interrelación la tarea del científico es encontrar cuales son las variables efectivas que actúan entre clase social y alteración del crecimiento y desarrollo, ya que obviamente la clase social como tal no puede determinar la estatura por ejemplo, sino que por el contrario los individuos presentarán tallas inferiores a lo normal cuando su posición social les provea de un am-

biente general el cual a través de nutrición, infección, habitación y hábitos influencia los procesos biológicos que determinan el crecimiento. De manera semejante, el desarrollo mental es modificado en la medida en que las condiciones de vida asociadas con una posición social de inferioridad actúen directamente modificando el crecimiento y diferenciación del sistema nervioso central, e indirectamente modificando las oportunidades y motivaciones asociadas a la buena utilización de las experiencias que el ambiente proporciona.⁴

La presencia de desnutrición en conjunción con una alta prevalencia de condiciones asociados con mal desarrollo, hace difícil la tarea de determinar la contribución que la desnutrición pueda tener de por sí, en las alteraciones de crecimiento tanto en tamaño como en función.

Otro factor fundamental en la evaluación de la desnutrición como posible productor de alteraciones en el crecimiento y desarrollo está constituido por el hecho de que para un buen número de funciones el lapso que transcurre entre el momento de acción del agente y el momento en que las alteraciones pueden cuantificarse es a menudo muy prolongado. Este lapso permite asimismo la acción de otras variables capaces de producir la misma alteración, con la consecuencia real de no poder establecerse fácilmente la importancia que cada agente pueda tener en la producción de las alteraciones que aparezcan tardíamente.

El problema se complica aún más cuando se estudian órganos o sistemas

cuya vulnerabilidad hacia un agente causal varía grandemente de acuerdo a la edad. Así por ejemplo Davidson y Dobbing⁵ han demostrado que la velocidad de mielinización del sistema nervioso central no sólo varía con la especie, sino que esta velocidad puede alterarse por influencia de la desnutrición únicamente durante un cierto período en la vida del animal. De manera que no sólo es el agente actuante lo que puede producir la alteración del crecimiento, sino que el tiempo en el que actúe se constituye en determinante primario de la presencia o ausencia del resultado y de su duración. Mc Cance⁶ ha podido documentar que la acción de un mismo agente (reducción de la ingesta alimentaria) produce alteraciones permanentes en el crecimiento de la rata sólo cuando actúa en los primeros días de vida del animal; si la desnutrición se produce después del destete, su efecto sobre el crecimiento desaparece en cuanto los animales son re-alimentados adecuadamente.

Esta breve revisión del problema de la desnutrición y sus efectos sobre el crecimiento y desarrollo es suficiente para comprender que para poder llegar a determinar el verdadero papel que puede jugar la desnutrición en el desarrollo final del individuo es indispensable evaluar simultáneamente el papel de otras variables, entre las cuales las más conspicuas pertenecen a los campos de la infección y de la clase social, ambos considerados en relación a la época de la vida en que la desnutrición se produzca y la época en la cual pue-

dan reconocerse de manera adecuada las alteraciones producidas.

Es obvio por todo lo dicho anteriormente que el problema en la especie humana puede ser evaluado de manera satisfactoria sólo a través de estudios ecológicos, longitudinalmente orientados, siguiendo desde la época intrauterina, por lo menos, una falange de nacimientos de tamaño adecuado, a manera que permita la parcialización estadística de los agentes contribuidores y de sus interrelaciones. Orientado de manera longitudinal el estudio ecológico puede identificar condiciones específicas de riesgo en cada edad, relacionar antecedentes y consecuentes en diferentes estadios de crecimiento y desarrollo, e integrar escala de tiempo tanto biológico como social. El estudio permite así considerar el ambiente general y el microambiente del individuo en desarrollo e interpretar la interacción de las variables sociales y biológicas.

Los estudios longitudinales sin embargo, toman mucho tiempo en producir resultados y mientras esto se lleva a cabo es posible obtener información pertinente por medio de estudios de carácter transversal en humanos, y de tipo experimental en modelos animales.

El empleo del modelo animal es fundamentalmente pertinente cuando se desea estudiar la composición bioquímica del organismo o el funcionamiento de sistemas enzimáticos tisulares, en distintos momentos de la vida del sujeto. Asimismo, el modelo animal permite si la acción de un agente específico es en un corto tiempo poder determinar

transitoria o si la alteración producida afecta al animal por el resto de su vida. En virtud de no ser siempre aplicables a la especie humana los resultados obtenidos en otras especies animales, estos modelos deben tomarse como exclusivamente complementarios de los estudios ecológicos longitudinales.

Tomando como base las consideraciones anteriores y en vista de los informes, que han aparecido, principalmente durante los últimos 15 años, donde se señalan las alteraciones bioquímicas que la desnutrición es capaz de producir tanto en animales experimentales como en seres humanos^{7, 8, 9} se decidió estudiar si algunas de las alteraciones bioquímicas pueden llegar a ser permanentes y cual es la relación entre duración de la lesión y tiempo de la vida en que actuó el agente.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para explorar el problema planteado se buscó un sistema enzimático que reuniera tres características básicas: primero ser un sistema de función general a todo el organismo y no específico para un órgano determinado. Segundo, la actividad deberá tener un patrón cuyo desarrollo fuera específico para la edad; y finalmente el patrón debe ser susceptible de modificación por medio de la desnutrición.

En los últimos años un buen número de trabajos han señalado que las enzimas proteolíticas intracelulares se encuentran en todos los tejidos de mamíferos donde se han buscado y que la actividad proteolítica intracelular parece estar fuertemente relacionada con

la fase catabólica del recambio protéico. Así por ejemplo, Faulhaber et al¹⁰ han encontrado que la actividad proteolítica se encuentra más elevada en aquellos órganos cuya velocidad de recambio protéico es más alta. Maver y colaboradores¹¹ han señalado que tanto en el hígado en regeneración como en los neoplasmas hepáticos la actividad proteolítica a pH bajo es mucho mayor que en el hígado normal. Weissman¹² a su vez, ha encontrado que durante el período de crecimiento de la cola de la larva de *Xenopus laevis* la actividad proteolítica disminuye de manera concomitante al aumento en nitrógeno total; finalmente la presencia de la actividad proteolítica ácida en los lisosomas¹³ y de la actividad proteolítica neutra en la fracción microsomal especialmente en el componente de membrana¹⁴ añaden valor a la idea de que el papel de estas enzimas está muy probablemente relacionado al metabolismo protéico, en particular con la fase catabólica del recambio.

Para determinar si la actividad proteolítica sigue un patrón específico para la edad y si este patrón es modificable por la desnutrición se tomaron ratas blancas cepa Wistar, de la colonia existente en el Hospital Infantil de México y se determinó en el hígado la actividad proteolítica a pH 7.0 y 4.5, a partir del nacimiento y periódicamente a intervalos de 3 a 4 días hasta los 55 días de edad. La razón de dar por terminado el experimento en esta edad y la selección del hígado como el órgano indicador se debieron exclusivamente a razones de facilidad técnica.

La desnutrición fue producida usando el método de Kennedy tal como ha sido empleado por McCance.⁶ Ratas recién nacidas dentro de un período no mayor de 6 horas, se mezclaron entre sí y se dividieron en camadas desiguales. 15 animales se adscribieron a una madre y 8 animales a otra. Las madres fueron alimentadas ad libitum con una dieta de purina y leche con pan de trigo, teniendo libre acceso al agua de bebida. Las crías fueron alimentadas por las madres hasta el día 21 de vida en que fueron separadas, colocadas en cajas individuales con piso de rejilla de alambre y alimentadas ad libitum con dieta de purina.

lo que indica que el daño sufrido en los primeros días de vida continuó ejerciendo su efecto aún después de que el agente causal había sido eliminado.

TÉCNICA BIOQUÍMICAS

Preparación del homogenizado. Una vez sacrificados los animales por decapitación, fueron desangrados. No se hizo perfusión del hígado, en vista de que Umaña¹⁵ ha señalado que la actividad proteolítica es la misma en los hígados perfundidos y en los hígados no perfundidos provenientes de animales desangrados. Los hígados fueron secados con papel absorbente, pesados y homogeneizados durante tres minutos en un homogenizador tipo Dounce. Volúmenes apropiados de cloruro de sodio 0.14M bien frío, fueron añadidos al homogenizador de manera que la concentración final del homogenizado fuera del 10%. Para evitar el aumento de temperatura durante el proceso de homogenización todas las operaciones se realizaron manteniendo el homogenizador rodeado de hielo picado. En estas condiciones la homogenización no produce inactivación de las actividades proteolíticas estudiadas. Alícuotas de tamaño apropiado fueron empleadas para la determinación de nitrógeno total y para la cuantificación de las actividades proteolíticas.

Determinación de nitrógeno total: El nitrógeno total fue determinado por la técnica del micro-Kjeldahl tal como ha sido descrita por la AOAC (Asociación de Químicos Agrícolas Oficiales).¹⁶

CRECIMIENTO EN DOS CAMADAS DE RATAS

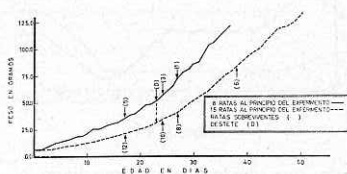


FIGURA 1

Se tomó el peso de los animales diariamente, y como era de esperarse (Fig. 1) la camada pequeña tuvo aumentos de peso mucho mayores que los correspondientes a la camada grande puesto que en estos animales la disponibilidad de leche materna por individuo se encuentra reducida. Es de interés comprobar una vez más que aún después del destete, cuando los animales ya no tuvieron reducción en la ingesta, por estar alimentadas ad libitum, el peso continuó siendo menor,

Cuantificación de la actividad proteolítica a pH 4.5: El sistema usado para esta determinación fue el descrito por Kozsalka y Miller.¹⁷ Una solución de hemoglobina al 2.5% en urea 8M fue usada como sustrato empleando HCl para ajustar el pH a 4.5.

La composición de la mezcla de ensayo fue cuidadosamente determinada a manera de obtener una tasa de reacción que siga una cinética de orden cero con respecto al sustrato. La mezcla adecuada consistió de 5 ml. del sustrato hemoglobina-urea, 6 ml. de agua y 4 ml del homogenizado al 10%. La mezcla fría fue colocada en un baño tipo Dubnoff a 37°C. Exactamente a los 5 y 25 minutos se tomaron sendas alícuotas de 2 ml y la reacción se detuvo vertiendo la alícuota en un frasco Erlenmeyer conteniendo 5 ml. de ácido tricloroacético al 10%. Después de dejar reposar los frascos durante 30 minutos se filtró el contenido y la absorbancia del filtrado fue determinada a 280 mu. La actividad proteolítica del homogenado se calculó restando a la absorbancia obtenida a los 25 minutos la absorbancia leída en la alícuota de 5 minutos.

Cuantificación de la actividad proteolítica a pH 7.0: El método fue semejante al empleado para determinar la actividad proteolítica ácida, excepto que el sustrato estuvo constituido por una solución al 2.5% de seroalbúmina bovina en urea 8M. La composición de la mezcla de ensayo que proporcionó una tasa de reacción con cinética de orden cero estuvo formada por: sustrato 5 ml. agua deionizada 8 ml.

y homogeneizado de hígado al 10% 2 ml. El tiempo y la temperatura de incubación, así como la forma de calcular la actividad son iguales a los descritos para la cuantificación de la actividad a pH 4.5.

RESULTADOS

En la Figura 2 se presenta la evolución de las actividades proteolíticas neutra y ácida en las ratas normales. En ella puede observarse que la actividad ácida después de una ligera eleva-

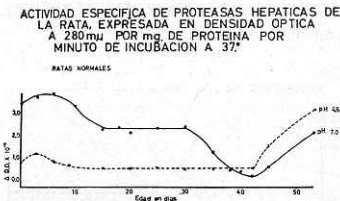


FIGURA 2

ción que alcanza su máximo hacia el cuarto día de vida para descender a los niveles del nacimiento al octavo día, se conserva en valores prácticamente iguales a los del nacimiento hasta los 42 días de edad en que asciende rápidamente. Por el contrario, la actividad proteolítica neutra, que se encuentra al nacimiento en valores tres veces superiores a los correspondientes para la actividad ácida, describe una curva descendente después de un ligero aumento en los primeros días. El descenso en la actividad alcanza un mínimo hacia el día 15 de vida, para permanecer constante hasta el día 30 en

que se inicia una caída pronunciada que dura hasta el día 42, en que vuelve a presentarse un ascenso, con una pendiente paralela a la de la actividad ácida, sólo que en valores absolutos menores.

La evolución de las actividades proteolíticas en las ratas desnutridas durante el período de lactancia se ilustra en la figura 3, donde puede verse que el patrón obtenido es totalmente diferente del correspondiente a los animales normales de la misma edad. La actividad proteolítica ácida acusa un ascenso mucho mayor en los primeros días de vida con un máximo hacia el quinto día de edad para descender a valores inferiores al nacimiento hacia el 12º día; a partir de esta edad la actividad ácida permanece constante hasta el día 38 en que la curva presenta un pico con máximo a los 42 días y regreso a la línea basal a los 45 seguido de aumento progresivo con pendiente menos pronunciada a partir de esta edad, hasta la terminación del experimento. La curva de evolución de la actividad proteolítica neutra también es totalmente diferente de la obtenida en ratas normales; así puede verse en la figura como la fase de caída es muy pronunciada llegando a

niveles inferiores a los que presenta la actividad ácida; presentando posteriormente dos ondas de variación, un pico semejante al de la actividad ácida en los días 38 a 42, y continuar con un ascenso progresivo en pendiente paralela a la de la actividad ácida, pero colocándose en valores absolutos por encima de la actividad ácida, en forma totalmente opuesta a lo encontrado en las ratas normales en las que la actividad proteolítica ácida es mayor que la neutra a partir del 42º día de edad. Estos resultados fueron constantes para el total de los 8 experimentos incluidos en el diseño.

Con el objeto de explorar si este patrón diferente, observado en las ratas que sufrieron desnutrición durante la lactancia constituye un nuevo patrón enzimático, se tomaron ratas de la misma cepa y colonia, que habían crecido en camadas de 8 animales cada una. Las crías se destetaron a los 21 días, se colocaron en jaulas individuales con piso de rejilla de alambre y de acuerdo a peso semejante se agruparon por pares. A un miembro de cada par (control) se le alimentó ad libitum con dieta de purina, mientras que al otro miembro del par (experimental) se le fue ajustando la cantidad de purina a modo de que la ingestión fuera de alrededor del 50% de la del animal control. Todos los animales tuvieron libre acceso al agua de bebida. Cuando la diferencia en peso entre control y experimental fue del 40% ambos animales se sacrificaron, se desangraron y se determinó en sus hígados la actividad proteolítica ácida y neutra, con-

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE PROTEASAS HEPATICAS DE LA RATA, EXPRESADA EN DENSIDAD OPTICA A 280 m μ POR mg. DE PROTEINA POR MINUTO DE INCUBACION A 37°

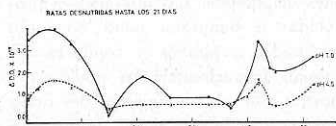


FIGURA 3

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE PROTEASAS
HEPATICAS DE LA RATA, EXPRESADA EN
DENSIDAD OPTICA A 280m μ POR mg DE
PROTEINA POR MINUTO DE INCUBACION A 37°

COMENTARIO

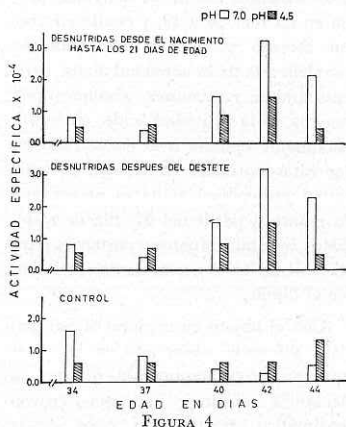


FIGURA 4

tenido de nitrógeno y agua total empleando los procedimientos ya descritos. La diferencia de 40% en el peso de los animales controles y experimentales se obtuvo a tiempos diversos por medio de ajustes apropiados en la dieta, a manera de lograr una curva evolutiva de la actividad enzimática en los tiempos que se juzgaron más convenientes.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 4. Puede fácilmente notarse que el patrón de actividad proteolítica difiere considerablemente del esperado para la misma edad en la rata normal, pero en cambio no difiere del esperado para animales que sufrieron desnutrición durante los primeros días de su vida y readaptación adecuada a partir del destete.

El hallazgo de una modificación bioquímica que perdura mucho más allá de la época en que el animal sufrió la influencia del estímulo negativo, añade un dato más a los informes de alteraciones permanentes en forma y función producidas en diversas especies animales mediante manipulaciones ocurridas en el período de lactancia. McCance¹⁸ además de señalar los efectos sobre el peso en ratas desnutridas durante la lactancia, ha informado sobre las alteraciones permanentes que se producen en la dentina de cerdos que fueron desnutridos durante su infancia. Pratt y col.¹⁹ encontraron que el tamaño del fémur de pollos rehabilitados de desnutrición sufrida a temprana edad no llega a alcanzar las dimensiones de los animales testigos. Lat y asociados²⁰ obtuvieron cambios permanentes en la conducta de ratas que fueron tempranamente desnutridas, Novakova a su vez²¹ ha descrito que la formación de reflejos condicionados es mucho más lenta en ratas adultas que fueron prematuramente destetadas; estos cambios neurológicos que se acompañan de disminución en el contenido de ácido ribonucleico en las neuromas de las células de Purkinje pudieron observarse hasta 26 meses después del destete. Las alteraciones producidas a temprana edad no están confinadas a tamaño y conducta del animal. Barraclough²² ha podido demostrar que el tratamiento del ratón hembra o de la rata mediante una sola inyección subcutánea de propionato de

testosterona a la edad de 2 a 5 días produce aberraciones en el fenómeno de reproducción, aberraciones que duran toda la vida del animal y que sin embargo son sólo pasajeras si las hembras ya tienen 20 días de edad en el momento de recibir la inyección.

Finalmente, Dubos²³ han ilustrado a través de una serie de observaciones epidemiológicas en seres humanos y en modelos experimentales animales que diversas experiencias de naturaleza infecciosa o nutricional de carácter poco severo, subclínico, son capaces de afectar permanentemente las características biológicas (fenotipo) del individuo.

En la esfera humana existen datos que sugieren que el período de lactancia es también crítico para el establecimiento del fenotipo, definiendo como fenotipo al conjunto de características manifiestas sean o no hereditarias.

En la esfera física, Leitch²⁴ y Ramos Galván²⁵ han documentado la existencia de disarmonía en el crecimiento de los distintos segmentos del organismo, en individuos expuestos a alto riesgo de desnutrición, y Aguilar describió en 1944 el enanismo de causa nutricional.²⁶ En el campo de la conducta humana es bien conocida la influencia que tienen muy diversas condiciones de falta o exceso de estimulación en la infancia sobre la personalidad del adulto. En particular un efecto probable de la desnutrición a temprana edad con repercusión permanente a edades posteriores ha sido sugerido por Stock y Smythe,²⁷ Cravioto y Robles²⁸ y Cravioto, Licardie y Birch.⁴

Vistos los hallazgos del presente es-

tudio desde el punto de vista de la fisiología química pudiera decirse que aún cuando por el hecho de haber empleado homogenizado de hígado total no se cuantificaron enzimas individuales, sino toda una gama de enzimas que hidrolizan de manera simultánea las proteínas de los substratos empleados dentro del rango de pH en que son activas, el patrón resultante de la acción de la desnutrición en los primeros 21 días de vida al tener invertidas la magnitud respectiva de las actividades proteolíticas ácida y neutra en edades muy posteriores a las que se presentan en el animal normal, facilitaría una mayor retención de nitrógeno; esto estaría de acuerdo a los trabajos que señalan que en sujetos previamente desnutridos el nitrógeno de la dieta es retenido a tasas superiores a las normales para la edad del individuo y comparables a las de un sujeto de menor edad.²⁹

En el momento actual es difícil decir si estos cambios fenotípicos tienen o no repercusiones en las generaciones subsiguientes. La posibilidad existe cuando se consideran las experiencias de Platt y su grupo³⁰ quienes encontraron que perros provenientes de madres que sufrieron desnutrición a muy temprana edad, muestran alteraciones fisiológicas del sistema nervioso central, no obstante que las crías son adecuadamente alimentadas desde el nacimiento. En la especie humana es bien conocido que el tamaño del hijo está directamente influenciado por el tamaño de la madre, sea éste genético o adquirido a temprana edad.

Considerando que no todos los órganos y tejidos del organismo sufren los efectos de la desnutrición por igual y que aun en presencia de desnutrición crónica avanzada existen tejidos cuyo crecimiento y desarrollo no parece alterarse³¹ es conveniente estudiar una serie de sistemas reguladores del metabolismo a efecto de conocer hasta dónde los cambios descritos en el presente trabajo son aplicables a otros órganos y si existe alguna secuencia en el orden de presentación de los cambios.

¿Qué otros estímulos aparte de la desnutrición son capaces de producir alteraciones de duración semejante; ¿cuál es su repercusión en generaciones subsecuentes? ¿cuál es el límite del período en que la manipulación es crítica para el desarrollo? Las respuestas a estas y otras preguntas semejantes que constituyen uno de los programas de investigación de nuestro departamento se presentarán en su debida oportunidad.

SUMMARY

Malnutrition of rats during their first 21 days of life was obtained, reducing the amount of breast milk intake, through the presence of an excess of animals in the litter. The measurement of proteolytic activity at a pH of 7.0 and 4.5 in total liver homogenates showed the presence of a different pattern of activity compared to that found in a normal animal of the same age. Even though the undernourished animals were re-fed after the twenty-first day with an adequate diet, the

new enzymatic pattern did not return to normal.

When rats normally fed during their breast feeding span were later seriously underfed by a reduction of food intake, their pattern of proteolytic activity at a pH of 7.0 and 4.5 was similar to that shown by rats of the same age that had been undernourished in the first 21 days of life. This modification in metabolic regulation system adds one more fact to support the theory that the critical period for the development of rats is found in the first weeks of life. During this period certain manipulations are capable of producing a new phenotype.

REFERENCIAS

1. Cravioto, J.; Birch, H. G.; De Licardie, E. y Rosales, L.: *Ecology of weight gain in a pre-industrial society*. Acta Paediat. Scand. 56: 71, 1967.
2. Richardson, S.: *Nutrition, learning and behavior*. A Symposium. Cambridge, M. I. T. Press. 1968 (En prensa).
3. Hsueh, A. M.; Agustín, C. E. y Chow, B. F.: *Growth of young rats after differential manipulation of maternal diet*. J. of Nutrit. 91: 195, 1967.
4. Cravioto, J.; De Licardie, E. y Birch, H. G.: *Nutrition, growth and neuro-integrative development*. Pediatrics 38: (Suppl. II): 319, 1966.
5. Davidson, A. N. y Dobbins, J.: *Myelination as a vulnerable period in brain development*. Brit. Med. Bull. 22: 40, 1966.
6. McCance, R. A.: *Food, growth and time*. Lancet 2: 621, 1962.
7. Waterlow, J. C.; Cravioto, J. y Stephen, J.: *Malnutrition in man*. Advances in protein chemistry. 15: 131, 1960. Academic Press. Inc.
8. Cravioto, J.: *Appraisal of the effect of nutrition on biochemical maturation*. Am. J. Clin. Nutrit. 11: 484, 1962.
9. Viteri, F.; Behar, M.; Arroyave, G. y

- Scrimshaw, N. S.: *Clinical aspects of protein malnutrition*. En: Mamalian Protein malnutrition. Eds. Munro, H. N. y Allison, J. B. New York. Academic Press. Inc., 1964.
10. Faulhaber, Von I.; Lehmann, F. E. y Von Hahn, H. P.: *Die Kathepsinaktivität einiger Organe von Ratte und Mann in ihrer Beziehung zu verschiedenen biochemischen Messgrößen*. *Helv. Physiol. Acta.* 19: 214, 1961.
 11. Maver, M. E.; Greco, A. E.; Loutrup, E. y Dalton, A. J.: *Catheptic activities of the nuclei of normal, regenerating, and neoplastic tissues of the rat*. *J. Natl. Cancer Institute* 13: 687, 1952.
 12. Weissmann, G.: *Changes in connective tissue and intestine caused by vitamin A in amphibia, and their acceleration by hydrocortisone*. *J. Exptl. Med.* 114: 581, 1961.
 13. Mego, J. L. y McQueen, J. D.: *Further studies on the degradation of injected¹³¹ albumin by secondary lysosomes of mouse liver*. *Biochemica acta* 111: 166, 1965.
 14. Ali, S. Y. y Lack, C. H.: *Studies on the tissue activator of plasminogen. Distribution of activator and proteolytic activity in the subcellular fractions of rabbit kidney*. *Biochem. J.* 96: 63, 1965.
 15. Umaña, R. y Dounce, A. L.: *Relationship of rat liver cathepsins to autolytic degradation of proteins of the liver cell nucleus during isolation*. *Exptl. Cell Res.* 35: 277, 1964.
 16. *Official and tentative methods of analysis*. 6a. Edition. Association of official Agricultural Chemists. Washington. D. C., 1945.
 17. Koszalka, T. A. y Miller, L. L.: *Proteolytic activity of rat skeletal muscle*. *J. Biol. Chem.* 235: 665, 1960.
 18. McCance, R. A.: *Some effects of undernutrition*. *J. of Pediat.* 65: 1008, 1964.
 19. Pratt, C. W. M. v McCance, R. A.: *Severe undernutrition in growing and adult animals. VI. Changes in the long bones during the rehabilitation of cockerels*. *Brit. J. Nutrit.* 15: 121, 1961.
 20. Lát, J.; Widdowson, E. M. y McCance, R. A.: *Some effects of accelerating growth. III. Behaviour and nervous activity*. *Proc. Roy. Soc. S. B.* 153: 347, 1960.
 21. Novakova, V.: *Premature weaning of the rats: its effect on the higher nervous activity and on the chemical pattern of neuron*. Seminar on post-natal development. Praga. Pergamon Press. 1967.
 22. Barraclough, C. A.: *Modifications in the CNS regulation of reproduction after exposure of prepubertal rats to steroid hormones*. *Rec. Prog. Horm. Res.* 22: 503, 1966.
 23. Dubos, R.; Savage, D. y Schaedler, R.: *Biological freudianism. Lasting effects of early environmental influences*. *Pediatrics* 38: 789, 1966.
 24. Leitch, I.: *Growth y health*. *Brit. J. of Nutrit.* 5: 142, 1951.
 25. Ramos-Galván, R.: *Comunicación al grupo científico de la Oficina Sanitaria Panamericana sobre Investigación en desnutrición proteico-calórica*. Bogotá, 1964.
 26. Aguilar, R. P.: *Estudios sobre avitaminosis y perturbaciones del crecimiento en niños hipoadimentados*. *GAC. Méd. Méx.* 75: 26, 1944.
 27. Stock, M. B. y Smythe, P. M.: *Does undernutrition during infancy inhibit brain growth and subsequent intellectual development?* *Arch. Dis. Childh.* 38: 546, 1963.
 28. Cravioto, J. y Robles, B.: *Evolution of adaptive and motor behavior during rehabilitation from kwashiorkor*. *Am. J. Orthopsychiat.* 35: 449, 1965.
 29. Gómez, F.; Ramos-Galván, R.; Cravioto, J. y Frenk, S.: *Absorción y retención del nitrógeno en niños desnutridos*. *Rev. Invest. Clin. (Méx.)* 9: 41, 1957.
 30. Platt, B. S.; Pampiglione, G. y Stewart, R. J. C.: *Experimental protein-calorie deficiency. Clinical, electroencephalographic and neuropathological changes in pigs*. *Develop. Med. Child Neurol.* 7: 9, 1965.
 31. Widdowson, E. M., Dickerson, J. W. T. y McCance, R. A.: *Severe undernutrition in growing and adult animals. IV. The impact of severe undernutrition on the chemical composition of the soft tissues of the pig*. *Brit. J. of Nutrit.* 14: 457, 1960.