

TRABAJOS DE INVESTIGACION

Metabolismo del hierro durante la recuperación de la rata desnutrida¹

JULIA ARAYA ARAYA

Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Sede Santiago Norte,
Universidad de Chile, Santiago, Chile

RESUMEN

Alteraciones importantes en el metabolismo del hierro, han sido provocadas por la falta de proteínas durante la desnutrición proteica precoz en la rata.

Desnutrición experimental en la rata, desde el nacimiento hasta el destete y la entrega posterior de una dieta apteica, provoca la aparición de ciertos signos similares a los observados en niños que sufren de Kwashiorkor: anemia hipocroma microcítica, bajos niveles de hierro circulante (no hemoglobínico), bajos niveles de betaglobulina y hierro en médula ósea y alta concentración de hierro en hígado.

Durante la recuperación de la rata depletada de proteínas desde muy temprana edad, con dietas de adecuado valor proteico, estimula la salida de hierro desde los depósitos hacia el plasma y médula ósea, normalizándose el hematocrito, sin embargo los niveles de hemoglobina permanecen significativamente más bajos que lo exhibido por animales controles.

Se destaca que la hemodilución no es causa directa de la anemia.

Nuestros resultados muestran la remoción del hierro no hemínico almacenado en el hígado hacia la circulación y médula ósea, durante el lapso experimental de recuperación. Además la síntesis de hemoglobina aparece como importante en el grupo realimentado, cuando se expresa por peso total aunque no se detecta cuando se expresa por 100 ml de sangre.

Pareciera que la disponibilidad de hierro en la rata en el período de recuperación, fuera insuficiente para alcanzar los niveles de hemoglobina de las ratas controles, debido al rápido crecimiento del animal y a la simultánea expansión de su volumen sanguíneo.

1. Esta investigación fue financiada con los fondos generales del Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Sede Santiago Norte de la Universidad de Chile. Recibido: 19-9-1974.

INTRODUCCION

El metabolismo del hierro ha sido ampliamente estudiado en el adulto normal, observándose variaciones importantes en algunas condiciones fisiológicas y patológicas.

De los muchos criterios para diagnosticar anemia por deficiencia de hierro, una de las más frecuentemente usadas en estudios de prevalencia, es la medida de la concentración de hemoglobina en la sangre (g/100 ml). Sin embargo, debemos hacer notar que un nivel dado de hemoglobina no informa acerca del contenido de hierro en todo el organismo, referido especialmente a individuos con desnutrición proteico-calórica precoz.

Recientemente hemos comunicado (1) sobre el contenido de hierro hepático y circulante (no hemoglobínico) en ratas desnutridas precozmente y durante la recuperación de la desnutrición con dietas experimentales del mismo valor proteico, IONpCa1%.

Las proteínas usadas en las dietas empleadas para el período de recuperación fueron: harina de pescado, harina de semilla de girasol suplementada con lisina y treonina (2), caseína y una mezcla de estas proteínas. Durante el período de recuperación (30 días), todas las dietas estimularon la salida del hierro acumulado en el hígado durante la desnutrición, pero los niveles de hemoglobina permanecieron significativamente más bajos que las ratas controles de edad similar.

Nos pareció interesante seguir nuestros estudios para conocer el destino seguido por el hierro hepático durante la realimentación.

Pretendemos conocer: a) si el hierro acumulado en el hígado es transportado hasta la médula, principal lugar de síntesis de hemoglobina; b) si la cantidad de hierro que eventualmente llega a la médula durante la realimentación es suficiente para satisfacer la velocidad de síntesis de hemoglobina; c) si la anemia mantenida durante la realimentación es causa de una hemodilución.

MATERIAL Y METODOS

Provocamos desnutrición proteica precoz en ratas de nuestro stock, de acuerdo al método de Araya J. y cols. (3). A la edad de 35 días un grupo de ratas desnutridas se sacrificaron

por decapitación, y en ellas medimos hierro no hemoglobínico en plasma, hígado y médula (4, 5), hemoglobina (6), hematocrito (7), electroforesis de proteínas del suero (8) y volumen plasmático total (9).

El resto de las ratas desnutridas se realimentó durante 30 días con dieta con caseína con IONDpCa1% (*), la que contenía 85 microgramos de hierro por gramo. Al final del período experimental, las ratas fueron sacrificadas y en ellas se determinaron los mismos índices bioquímicos que en las ratas desnutridas. Los resultados obtenidos en ambos grupos, se comparan con los observados en ratas normales de edad similar.

Para medir volumen plasmático en nuestras ratas tuvimos que adaptar la técnica de Reeve a nuestro modelo experimental.

Existen muchos métodos para medir volumen sanguíneo y plasmático. Todos ellos incluyen la introducción lenta de sustancias difusibles y no tóxicas al torrente circulatorio.

Usamos para nuestras determinaciones Azul de Evans T 1824, porque este colorante se une firmemente a la seroalbúmina impidiendo el paso del colorante fuera de la circulación. Tomamos amplias precauciones para evitar hemolisis y medimos el tiempo óptimo para asegurar una distribución homogénea del Azul de Evans en la circulación, éste fue de 3 minutos.

Los animales fueron anestesiados con pentotal sódico intraperitoneal, 35 miligramos por 100 gramos rata, con esta dosis logramos tranquilizar a los animales para facilitar la técnica operacional.

(*) Caseína con IONDpCa1%. Caseína purificada (1) se usó como fuente de proteínas. La dieta fue preparada de acuerdo a la siguiente fórmula (en gramos), caseína 325; maicena 175; grasa vegetal 100; aceite girasol 50; vitaminas liposolubles (2) 20; vitaminas hidrosolubles (3) 30; mezcla mineral (4) 50; almidón papa 75; glucosa 125 y alfaced 50.

(1) Obtenida de Nutritional Corp. Cleveland Ohio.

(2) Vitaminas liposolubles: retinol 45.000 microgramos; Vit. D2 750 microgramos; de alfa tocoferol 5000 miligramos y vitamina K (II) 5 miligramos; homogenizado con 100 g de maicena.

(3) Vitaminas hidrosolubles (en gramos): cloruro de colina 10; ácido p aminobenzoico 5,0; inositol 1,0; ácido nicotínico 0,5 pantotenato de Ca 0,25; riboflavina 0,25; tiamina HCl 0,2; piridoxina HCl 0,05; ácido fólico 0,05; biotina 0,01; vitamina B12 0,0005 y maicena 300 g.

(4) Mezcla mineral (en gramos): CaCO₃, 600; K₂HPO₄, 645; CaHPO₄ 2H₂O, 150; NaCl, 335; MgSO₄·7H₂O, 204; MnSO₄, 10; Fe citrato, 20; ZnCl₂, 1,5; CuSO₄·5H₂O, 1,0; KI, 0,2 CoCl₂, 0,05; KAl(SO₄)₂, 0,1; Na₂SeO₃, 0,01 y NaF, 0,2.

TABLA 3
ELECTROFORESIS DE PROTEINAS DEL SUERO EN RATAS DESNUTRIDAS DURANTE LA RECUPERACION DE LA DESNUTRICION Y EN RATAS CONTROLES

Grupo	Seroalbúmina (g/100 ml)	G L O B U L I N A S (g/100 ml)			
		α 1	α 2	β	γ
Desnutridas (7)	2,14 \pm 0,16	0,56 \pm 0,10	*0,24 \pm 0,06	*0,51 \pm 0,06	0,42 \pm 0,04
Caseína 10NDp Cal% (17)	4,20 \pm 0,13	0,66 \pm 0,04	*0,72 \pm 0,07	**1,30 \pm 0,07	0,40 \pm 0,06
Control	4,48 \pm 0,09	0,51 \pm 0,07	0,31 \pm 0,06	**0,84 \pm 0,06	0,42 \pm 0,04
			*p < 0,01	*p < 0,001 **p < 0,001	

() = Número.

TABLE 4
 HIERRO NO HEMOGLOBINICO EN PLASMA, HIGADO Y MEDULA OSEA, EN RATAS DESNUTRIDAS, DURANTE LA REALIMENTACION CON CASEINA CON 10NDpCals% Y EN RATAS CONTROLES DE LA MISMA EDAD

Grupo	Hemoglobina	HIERRO NO HEMOGLOBINICO		
		Plasma ug/100 ml	Hígado ug/g tejido fresco	Médula ósea líoofilizada ug/g
Desnutridas	11.43 ± 0,16	64 ± 4,9	*325,1 ± 23,9	*0,125 ± 0,02
Caseína	11,61 ± 0,17 (17)	88 ± 12,9 (5)	105,1 ± 19,8 (7)	0,137 ± 0,04 (18)
Controles	14,17 ± 0,23 (17)	204 ± 15,8 (14)	*120,6 ± 24,6 (12)	*0,250 ± 0,05 (6)
() Número	*p < 0,05	*p < 0,001		

Se les inyectó por punción cardíaca 0,2 ml de una solución de Azul de Evans T 1824 (100 microgramos = N) disuelto en suero fisiológico el que contenía 50 mg del colorante por 100 ml. Después de 3 minutos de la inyección del colorante (tiempo adecuado para lograr distribución homogénea en la circulación), las ratas fueron sacrificadas por decapitación y la sangre se recibió en tubos heparinizados. Se determinó la cantidad de colorante en 1 ml de plasma (n) libre de hemolisis y usando como blanco plasma de ratas no inyectadas, calculamos el volumen de plasma total dividiendo N por n. Volumen plasmático total N/n.

RESULTADOS Y DISCUSION

La Tabla 1 informa acerca del volumen plasmático total, hemoglobina y hematocrito en ratas controles. El volumen plasmático total está expresado por $\text{Kg}^{0.73}$ y por el Log natural del peso de la rata en gramos ($e = 2.718281\dots$). Al relacionar los valores de plasma total encontrados experimentalmente en ratas controles con el Log de su peso en gramos, encontramos una correlación en que $r = 0.93$.

En la Tabla 2 informamos de los mismos parámetros de las ratas controles, pero encontrados en ratas en recuperación de la desnutrición proteica precoz. Aquí observamos que la hemoglobina y el volumen plasmático total están disminuídos, no así el hematocrito que alcanzó los niveles de las ratas controles.

En la Figura 1 se han graficado los valores experimentales del volumen de plasma total versus el Log del peso en gramos, en ratas controles y durante la recuperación de la desnutrición, se puede observar que el volumen plasmático total de las ratas en recuperación es inferior al volumen plasmático total de ratas controles de peso similar, por lo tanto debemos descartar la anemia por hemodilución en el grupo realimentado.

Ya que la hemodilución no es causa inmediata de la anemia en nuestro grupo, fijamos nuestra atención en el transporte y destino del hierro acumulado en el hígado de las ratas desnutridas.

Se sabe que el hierro es transportado totalmente en el plasma, unido específicamente a la transferrina (siderofilina), que es una globulina y tiene una movilidad electroforética en la beta 1 globulina (10). La ceruloplasmina, proteína responsable del transporte del Cu, y que tiene una movilidad electroforética en la alfa 2 globulina es directamente responsable de la oxidación a Fe^{+++} en la transferrina (11).

La Tabla 3 da cuenta de la electroforesis del suero de ratas desnutridas, durante la recuperación con caseína con 10 NDp Ca1% y de ratas controles de edad similar. Se observa una disminución estadísticamente significativa de la fracción beta globulina durante la desnutrición ($0,61 \pm 0,06$ vs $0,84 \pm 0,06$) $p < 0,02$ si se compara con animales controles y una elevación importante durante la recuperación ($1,30 \pm 0,07$ vs $0,64 \pm 0,06$) $p < 0.01$.

TABLA 1
VOLUMEN PLASMA TOTAL, HEMATOCRITO Y HEMOGLOBINA EN RATAS CONTROLES

Peso (g)	* Log Peso	V O L U M E N P L A S M A			Hemoglobna g/100 ml	Hematocrito %
		ml/rata	ml/Log peso	ml/Kg 0,73		
48	3,87	3,63	0,94	3330	15,30	42
50	3,91	2,83	0,72	2530	12,31	41
63	4,14	2,86	0,70	2150	12,41	45
71	4,26	4,95	1,16	3410	14,75	43
72	4,27	4,44	1,03	3040	15,30	41
85	4,44	3,86	0,87	2330	14,86	41
99	4,59	3,17	0,70	1690	13,98	43
100	4,60	4,76	1,03	2560	14,31	40
152	5,02	4,76	0,95	1890	12,32	44
158	5,06	4,98	0,98	1920	14,75	44
160	5,07	5,26	1,03	2010	15,30	44
215	5,37	5,77	1,07	1780	13,98	48
241	5,48	6,34	1,15	1800	14,72	50
250	5,52	6,10	1,10	1680	14,42	50
333	5,70	5,77	1,01	1290	13,98	48
375	5,92	7,01	1,18	1440	14,07	47
394	5,97	7,27	1,21	1440	15,02	50
			$0,99 \pm 0,03$	2134 ± 161	$14,17 \pm 0,25$	$44,6 \pm 0,84$

* Log = loge (base 2,71828...)

TABLA 2
VOLUMEN PLASMA TOTAL Y HEMATOCRITO Y HEMOGLOBINA DURANTE LA RECUPERACION DE LA RATA
DESNUTRIDA CON CASEINA 10NDp CAL%

Peso (g)	* Log Peso	V O L U M E N P L A S M A			Hemoglobina	Hematocrito
		ml/rata	ml/Log peso	ml/Kg.,73		
80	4,38	3,76	0,86	2540	11,38	40
82	4,40	5,54	0,83	2260	10,00	40
84	4,43	4,81	1,08	2330	10,69	40
85	4,44	4,38	0,98	2650	11,38	40
91	4,51	2,94	0,65	1650	12,07	44
91	4,51	3,66	0,81	2100	11,04	44
92	4,52	2,50	0,55	1430	12,50	44
94	4,54	3,73	0,82	2100	11,73	50
95	4,55	3,66	0,80	1800	11,73	44
95	4,58	3,23	0,71	2040	11,38	44
98	4,58	3,81	0,83	1070	11,73	48
99	4,59	3,47	0,75	1890	11,73	42
120	4,78	4,67	0,98	2160	11,38	47
132	4,88	3,25	0,66	1430	11,38	43
151	5,02	4,53	0,90	1810	11,73	47
161	5,08	4,78	0,94	1824	12,50	47
173	5,15	3,07	0,60	1100	13,11	43
			$0,81 \pm 0,03$	1930 ± 124	$11,61 \pm 0,17$	$43,9 \pm 0,73$
					$p << 0,001$ vs control	

* Log = loge (base 2,71828...)

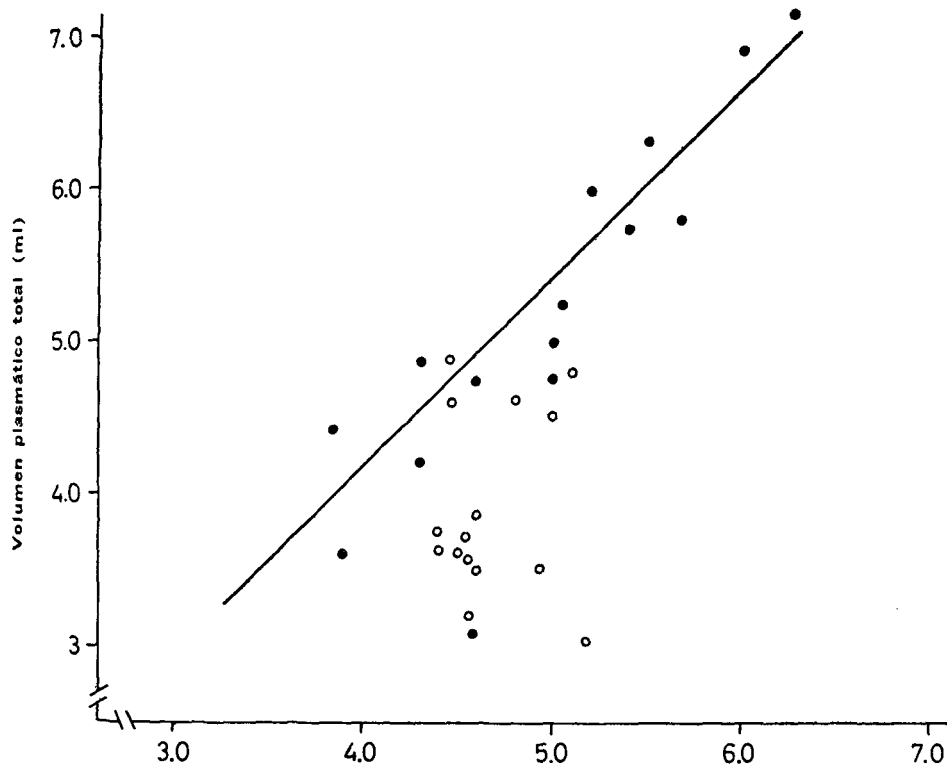


Fig. 1

Volumen Plasmático versus Log del peso (g) durante la recuperación de la desnutrición y en ratas controles $r = 0.93$. Ratas controles (●), durante la recuperación (°).

Estos resultados corroborarían la información sobre movilización del hierro hepático desde el lugar de depósito hacia la circulación general durante la realimentación con caseína en nuestras ratas.

El hierro plasmático bajo condiciones normales refleja los niveles de hierro para síntesis de hem. Una mirada de nuestros resultados en Tabla 4, nos muestran que para una síntesis adecuada de hemoglobina en ratas controles entre 31 a 60 días es necesario un nivel de 120 microgramos de hierro por 100 ml de plasma. En el grupo desnutrido este nivel sólo alcanza a 64 microgramos de hierro por 100 ml de plasma (aún cuando el animal dispone de gran cantidad de este nutriente en su hígado), indicando que el hierro que llega a la médula ósea durante la desnutrición sería insuficiente para síntesis de hem. No descartamos la posibilidad de una disminución de la actividad de las enzimas reguladoras de la síntesis de hem (*delta amino levulínico sintatasa* y *citocromo oxidasa*) ya que estos animales están recibiendo una dieta sin proteína, durante la desnutrición experimental.

Al entregar al grupo desnutrido una dieta de alto valor proteico, los niveles de hierro plasmático se incrementaron, lo mismo la cantidad de hierro no hemínico en médula, Tabla 4. Los niveles de beta globulina y alfa 2 globulina aumentaron por sobre los niveles de ratas controles, Tabla 3, sin lugar a dudas estamos ante el hecho de un estímulo en la salida del hierro y posiblemente cobre para ser puestos a disposición de los órganos hematopoyéticos, pero esto no se ve reflejado en un aumento de los niveles de hemoglobina cuando se expresan por 100 ml de sangre.

La rata en recuperación se enfrenta a un rápido crecimiento ($\Delta 3,92$ g/día) su velocidad metabólica celular se ve aumentada, reflejada en un alto consumo de O_2 , como ha sido observado por Asworth en niños (12). De esta manera podría explicarse que estos animales agoten sus reservas de hierro, siendo aún insuficiente el hierro entregado en la dieta durante la realimentación. El hierro que ha llegado a la médula una vez que aumenta el transporte en el período de la realimentación se hace insuficiente para los requerimientos, de allí que no haya una respuesta significativa de los niveles de hemoglobina.

Los valores de hematocrito normalizados al término de la realimentación, Tabla 2, estarían hablando de una eritropoyesis adecuada, no sucede lo mismo con la síntesis de hemoglobina.

SUMMARY

Iron Metabolism During Recovery From Malnutrition in the Rat

Relevant alterations in iron metabolism are caused by lack of protein during early malnutrition in the rat.

Experimental malnutrition in rats from birth to weaning and afterwards fed on a protein-free diet showed some signs similar to those of children with Kwashiorkor, hypochromic and microcytic anaemia, low levels of circulating (non heme) iron, low levels of betaglobulins and bone marrow iron, and high concentration of iron in the liver.

During the recovery of the protein depleted rats with a casein diet with 10 NDpCa1%, liver iron stores decreased plasma non heme iron, bone marrow iron and betaglobulin were increased, and the haematocrit (%) reached normal values erythropoiesis was particularly stimulated. Nevertheless, haemoglobin level was still significantly lower than in control animals.

The possibility that increased plasma volume could have been the partly to the effect of anaemia was discarded, when total plasma volume in the experimental groups were determined.

Our results presents the removal of iron stored in the liver during malnutrition towards general circulation and bone marrow during the recovery period (30 days). The haemoglobin synthesis appears to be important in the refed group, when expressed per total body weight although it was not detected when the values were expressed per 100 ml of blood.

Iron availability in the rat appears to be insufficient to reach haemoglobin levels showed by control rat, because of fast increase of body weight and simultaneous expansion of blood volume during the experimental feeding up period.

BIBLIOGRAFIA

1. Araya, J. and M. A. Tagle. Hepatic and circulating (non hem) iron during recovery from malnutrition in the rat. *Am. J. Clin. Nutr.* 26: 482, 1973.
2. Araya, J., M. A. Tagle y G. Donoso. Casein, fish flour sunflower presscake diets in the recovery of the preweanling protein depleted rat. *Nutr. Bromatol. Toxicol.* 7: 73, 1968.
3. Araya, J., M. A. Tagle y G. Donoso. Desnutrición Experimental en la rata. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 19: 389, 1969.
4. Barkan, G. and S. W. Burnham. Determination of serum iron and pseudo-hemoglobin iron with o-phenantroline. *J. Biol. Chem.* 135: 37, 1940.
5. IOB, V. and W. W. Swanson. A study of fetal iron. *J. Biol. Chem.* 124: 263, 1938.
6. Canaan, R. K. Hemoglobin standard. *Science* 127: 1376, 1958.

Estos resultados corroborarían la información sobre movilización del hierro hepático desde el lugar de depósito hacia la circulación general durante la realimentación con caseína en nuestras ratas.

El hierro plasmático bajo condiciones normales refleja los niveles de hierro para síntesis de hem. Una mirada de nuestros resultados en Tabla 4, nos muestran que para una síntesis adecuada de hemoglobina en ratas controles entre 31 a 60 días es necesario un nivel de 120 microgramos de hierro por 100 ml de plasma. En el grupo desnutrido este nivel sólo alcanza a 64 microgramos de hierro por 100 ml de plasma (aún cuando el animal dispone de gran cantidad de este nutriente en su hígado), indicando que el hierro que llega a la médula ósea durante la desnutrición sería insuficiente para síntesis de hem. No descartamos la posibilidad de una disminución de la actividad de las enzimas reguladoras de la síntesis de hem (delta amino levulínico sintatasa y citocromo oxidasa) ya que estos animales están recibiendo una dieta sin proteína, durante la desnutrición experimental.

Al entregar al grupo desnutrido una dieta de alto valor proteico, los niveles de hierro plasmático se incrementaron, lo mismo la cantidad de hierro no hemínico en médula, Tabla 4. Los niveles de beta globulina y alfa 2 globulina aumentaron por sobre los niveles de ratas controles, Tabla 3, sin lugar a dudas estamos ante el hecho de un estímulo en la salida del hierro y posiblemente cobre para ser puestos a disposición de los órganos hematopoyéticos, pero esto no se ve reflejado en un aumento de los niveles de hemoglobina cuando se expresan por 100 ml de sangre.

La rata en recuperación se enfrenta a un rápido crecimiento ($\Delta 3,92$ g/día) su velocidad metabólica celular se ve aumentada, reflejada en un alto consumo de O_2 , como ha sido observado por Asworth en niños (12). De esta manera podría explicarse que estos animales agoten sus reservas de hierro, siendo aún insuficiente el hierro entregado en la dieta durante la realimentación. El hierro que ha llegado a la médula una vez que aumenta el transporte en el período de la realimentación se hace insuficiente para los requerimientos, de allí que no haya una respuesta significativa de los niveles de hemoglobina.

Los valores de hematocrito normalizados al término de la realimentación, Tabla 2, estarían hablando de una eritropoyesis adecuada, no sucede lo mismo con la síntesis de hemoglobina.

SUMMARY

Iron Metabolism During Recovery From Malnutrition in the Rat

Relevant alterations in iron metabolism are caused by lack of protein during early malnutrition in the rat.

Experimental malnutrition in rats from birth to weaning and afterwards fed on a protein-free diet showed some signs similar to those of children with Kwashiorkor, hypochromic and microcitic anaemia, low levels of circulating (non heme) iron, low levels of betaglobulins and bone marrow iron, and high concentration of iron in the liver.

During the recovery of the protein depleted rats with a casein diet with 10 NDpCa1%, liver iron stores decreased plasma non heme iron, bone marrow iron and betaglobulin were increased, and the haematocrit (%) reached normal values erythropoiesis was particularly stimulated. Nevertheless, haemoglobin level was still significantly lower than is control animals.

The possibility that increased plasma volume could have been the partly to the effect of anaemia was discarded, when total plasma volume in the experimental groups were determined.

Our results presents the removal of iron stored in the liver during malnutrition towards general circulation and bone marrow during the recovery period (30 days). The haemoglobin synthesis appears to be important in the refed group, when expressed per total body weight although it was not detected when the values were expressed per 100 ml of blood.

Iron availability in the rat appears to be insufficient to reach haemoglobin levels showed by control rat, because of fast increase of body weight and simultaneous expansion of blood volume during the experimental feeding up period.

BIBLIOGRAFIA

1. Araya, J. and M. A. Tagle. Hepatic and circulating (non hem) iron during recovery from malnutrition in the rat. *Am. J. Clin. Nutr.* 26: 482, 1973.
2. Araya, J., M. A. Tagle y G. Donoso. Casein, fish flour sunflower presscake diets in the recovery of the preweanling protein depleted rat. *Nutr. Bromatol. Toxicol.* 7: 73, 1968.
3. Araya, J., M. A. Tagle y G. Donoso. Desnutrición Experimental en la rata. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 19: 389, 1969.
4. Barkan, G. and S. W. Burnham. Determination of serum iron and pseudo-hemoglobin iron with o-phenantroline. *J. Biol. Chem.* 135: 37, 1940.
5. IOB, V. and W. W. Swanson. A study of fetal iron. *J. Biol. Chem.* 124: 263, 1938.
6. Canaan, R. K. Hemoglobin standard. *Science* 127: 1376, 1958.

7. Guest, G. M. and V. E. Siler. A centrifuge method for determination of cells blood. *J. Lab. and Clin. Med.* 19: 757, 1939.
8. Uriel, J. et P. Grabar. Emploi de colorants dans l'analyse électrophorétique et immuno électrophorétique en milieu gélifié. *Annal Ins. Pasteur* 90: 427, 1956.
9. Reeve, E. B. Methods of estimating plasma and total red cell volume. *Nutr. Abstracts and Rev.* 17: 811, 1948.
10. Schade, L. A., R. W. Reinhart and H. Levy. Carbon dioxide and oxygen in complex formation with iron and siderophilin. The iron binding component of human plasmas. *Arch. Biochem.* 20: 170, 1949.
11. Frieden, E. Ceruloplasmin, a link between copper and iron metabolism. *Nutr. Rev.* 28: 87, 1970.
12. Asworth, A., R. Bell, W. P. T. James and J. C. Waterloo. Calorie requirement of children recovery from protein calorie malnutrition. *Lancet* 2, 600, 1968.