

METABOLISMO ENERGETICO DURANTE EL DESARROLLO DE LA PLACENTA EN RATAS – EFECTO DE LA DESNUTRICION MATERNA CRONICA¹

Julia Araya², Manuel Ruz³ y Ana María Aguilera⁴

Facultad de Medicina
Universidad de Chile
Santiago, Chile

RESUMEN

Se estudió el efecto de la desnutrición crónica materna en el metabolismo energético durante el desarrollo de la placenta en ratas y su relación con el crecimiento fetal. Ratas hembras vírgenes de la cepa Wistar se sometieron a la restricción de una dieta con 25^o/o de caseína, desde la pubertad y durante la preñez.

Los resultados revelaron que la desnutrición materna disminuye significativamente la actividad de adenilato kinasa expresada por gramo de DNA, y aumenta significativamente el contenido de adenina nucleótidos (ATP y ADP) en la placenta, cerca del término de la preñez. Se postula que el aumento significativo de la carga energética ($ATP + 1/2 ADP / ATP + ADP + AMP$) de la placenta de ratas desnutridas, es el resultado de una inhibición de los sistemas que utilizan ATP para procesos de síntesis de macromoléculas y transporte activo de sustratos en las últimas etapas de la gestación.

Ello coincide con la significativa disminución del crecimiento fetal en esa etapa.

INTRODUCCION

El suministro de nutrientes hacia el feto depende de la cantidad y composición de la sangre materna que llega a la placenta y de la capacidad de este órgano para transferirlos hacia el lado fetal (1). El retardo del

Manuscrito modificado recibido: 24-4-86.

- ¹ Este proyecto contó con el apoyo económico del Departamento de Investigaciones y Bibliotecas de la Universidad de Chile.
- ² Profesor Titular y Director del Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, Independencia 1027, P. 3, Santiago, Chile.
- ³ Académico del Departamento de Nutrición de la citada Facultad.
- ⁴ Tesista de Pregrado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

crecimiento del feto se atribuye a varios factores tales como desórdenes genéticos, patología materna, insuficiencia placentaria y desnutrición fetal intrauterina originada por desnutrición materna (2). El efecto de esta última en el crecimiento feto-placentario ha sido extensamente investigado, pero existe relativa poca información acerca de la relación que existe entre el retardo de crecimiento del feto y la capacidad funcional de la placenta para transportar nutrientes. La capacidad de la placenta para secuestrar nutrientes de la circulación materna, concentrar, sintetizar, secretar y transportar sustratos, requiere energía metabólica, generada por este órgano a través de la liberación de energía a partir de nutrientes potencialmente energéticos, procesos que son catalizados por enzimas (3,4).

El propósito de este estudio, por lo tanto, fue determinar el efecto que la desnutrición materna crónica ejerce en el metabolismo energético durante el desarrollo de la placenta, y su relación con el crecimiento fetal en distintas etapas de la gestación. Se postula que la desnutrición materna puede modificar la carga y capacidad energética de la placenta, lo que podría afectar la eficiencia de los mecanismos responsables del transporte activo de sustancias entre circulación materna y fetal, originando un crecimiento insuficiente del feto.

MATERIAL Y METODOS

Cien ratas hembras vírgenes de 50 días de edad fueron divididas en dos grupos equivalentes, y se alojaron en jaulas individuales. Cincuenta ratas se destinaron al grupo control (C) alimentándose *ad libitum* con una dieta con caseína al 25^o/o; se midió diariamente la ingesta y la ganancia de peso. Las otras 50 ratas integraron el grupo desnutrido (D), y recibieron como alimento, la misma dieta ofrecida al grupo C, pero en forma restringida. Para ello, se consignó la cantidad de dieta consumida por 100 g de rata control, dándole sólo el 50^o/o de esa cantidad al grupo desnutrido, también en relación a 100 g rata. Al alcanzar las ratas de ambos grupos un peso promedio de 154 g, el grupo C a los 60 días y el grupo D a los 75 días, se cruzaron con machos control sólo durante 12 horas. Antes del cruzamiento se detectó la fase proestro en frotis de secreción vaginal, y después del apareamiento se detectaron espermios en la vagina.

Las hembras preñadas fueron devueltas a sus jaulas individuales, siguiendo con el mismo tratamiento dietético impuesto desde antes del cruzamiento. La composición de la dieta preparada con caseína al 25^o/o ha sido previamente informada (5).

A los 16, 18 y 20 días post-concepción se sacrificaron de nueve a 15 ratas de cada grupo, y en cada oportunidad se les extrajeron los fetos, los cuales se pesaron. Se extrajeron todas las placentas, y la mitad de las placentas de cada rata fue congelada de inmediato, recibéndolas en dispositivos metálicos, los que previamente fueron colocados y mantenidos en un baño de acetona-hielo seco. Los órganos se congelaron de inmediato, se pesaron rápidamente y se vaciaron sobre una solución de ácido perclórico helado, el cual fue congelado inmediatamente. Luego se homogenizaron, permitiendo un descongelamiento lento que da lugar a la incorporación del perclórico al tejido antes de que éste esté totalmente descongelado. El homogenizado se centrifugó en frío, y en el sobrenadante neutra-

lizado se determinó ATP, ADP y AMP, enzimáticamente, según la técnica de Adam (6). El resto de las placentas que no fue sometido a congelación, fue recibido en solución de sacarosa 0.25 M fría. Se homogenizaron en sacarosa 0.25 M al 100/o (peso/volumen) y las mitocondrias fueron separadas por centrifugación diferenciada en frío, según Dow (7). Las mitocondrias aisladas fueron resuspendidas en buffer Tris 10mM pH 7.5, agregando sacarosa 1.8 M con 2 mM de ATP y 2 mM de $MgSO_4$. Esta suspensión se sonica para romper las membranas mitocondriales a una oscilación de 3 amperes por 15 segundos a 0°C. La suspensión sonicada se deposita sobre sacarosa 1.18 M y se centrifuga a 24,000 rpm durante tres horas, en frío. La subfracción soluble que corresponde a la capa superior de tres capas, se separa cuidadosamente y en esa fracción se mide actividad de adenilato kinasa según Sottocasa *et al.* (8).

Se determinó DNA en el homogenizado al 100/o según la técnica de Burton (9), y en la subfracción soluble, el contenido de proteína, de acuerdo a Lowry *et al.* (10).

Con los datos del contenido de adenina nucleótidos se determinó la carga energética siguiendo el método de Atkinson (11), que se define como $ATP + 1/2 ADP / (ATP + ADP + AMP)$ y la capacidad energética. Esta última se calculó multiplicando el nivel de energía disponible ($ATP + 1/2 ADP$) por la actividad de adenilato kinasa mitocondrial. La determinación del ATP, ADP, AMP y actividad de adenilato kinasa se hizo en la misma placenta, expresando los valores del contenido de los adenina nucleótidos y actividad de adenilato kinasa por gramo de DNA. Los resultados fueron expresados como promedios \pm desviación estándar de los promedios, y el cálculo de la significancia estadística de las diferencias entre los grupos se hizo aplicando la prueba "t" de Student.

RESULTADOS

El efecto de la restricción de una dieta balanceada sobre la ganancia de peso materno, peso de la placenta y peso fetal a los 16, 18 y 20 días post-concepción, se informa en la Tabla 1. Según se aprecia, la desnutrición materna crónica redujo significativamente ($P \ll 0.001$) la ganancia ponderal materna en las tres etapas estudiadas. El peso de la placenta y el peso fetal también disminuyeron significativamente, pero sólo al día 20, cercano al término.

El contenido de adenina nucleótidos expresados por gramo de DNA, aumentó significativamente al día 18 con respecto al día 16 en ambos grupos, a excepción del AMP que permaneció constante. El aumento en el contenido de ATP y ADP observado al día 18 se mantuvo alto hasta el día 20 post-concepción. Al comparar el contenido de ATP y ADP entre los grupos C y D, se observa que estos dos nucleótidos se encuentran significativamente aumentados en el grupo D, en relación al grupo C (Tabla 2).

La carga energética de la placenta calculada a partir de la relación $(ATP + 1/2 ADP) / (ATP + ADP + AMP)$, de ambos grupos se detalla en la Tabla 3. Puede observarse un aumento significativo de la carga energética en el grupo D al día 18 ($P < 0.05$) y día 20 ($P < 0.01$), con respecto al grupo C.

TABLA 1

INCREMENTO DEL PESO MATERNO, PESO DE PLACENTA Y PESO FETAL DURANTE LA PREÑEZ DE RATAS CONTROL Y DESNUTRIDAS

| Edad gestacional (días) | Ganancia ponderal materna (g) | | Peso placenta (mg) | | Peso fetal (mg) | |
|----------------------------|----------------------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|-------------------------|
| | Control | Desnutridos | Control | Desnutridos | Control | Desnutridos |
| 16 | 58.6* ± 10.9 | 24.4 ^a ± 8.3 | 245 ± 36 | 215 ± 37 | 279 ± 62 | 251 ± 20 |
| 18 | 93.5 ± 12.6 | 37.8 ^a ± 7.5 | 341 ± 52 | 308 ± 43 | 787 ± 50 | 654 ± 30 |
| 20 | 115.3 ± 19.5 | 55.1 ^a ± 10.6 | 477 ± 40 | 391 ^b ± 49 | 2,390 ± 36 | 1,750 ^a ± 16 |

* Valor promedio ± desviación estándar. El número de ratas preñadas sacrificadas en cada oportunidad y en cada grupo fue de 9 a 15.

^a Desnutridas con respecto al control, $P \leq 0.001$.

^b Desnutridas con respecto al control, $P < 0.001$.

TABLA 2
CONTENIDO DE ATP, ADP Y AMP EN PLACENTAS DE RATAS CONTROL Y DESNUTRIDAS

| Edad gestacional (días) | ATP ^o | | ADP ^o | | AMP ^o | | Adenina nucleótidos totales ^o | |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------|---------------------------|------------------|--------------|--|----------------------------|
| | Control | Desnutridas | Control | Desnutridas | Control | Desnutridas | Control | Desnutridas |
| 16 | 153.8 ^o ± 38.6 | 183.0 ± 49.5 | 191.0 ± 49.1 | 226.1 ± 42.2 | 105.0 ± 12.8 | 123.2 ± 13.5 | 462.5 ± 79.5 | 514.7 ± 70.0 |
| 18 | 219.4* ± 41.2 | 316.0* ± 89.0 | 244.4* ± 20.2 | 287.8* ± 49.3 | 110.8 ± 30.4 | 124.1 ± 30.4 | 580.5* ± 54.4 | 674.6* ± 90.2 |
| 20 | 209.2 ± 34.3 | 356.0 ^a ± 81.3 | 254.8 ± 55.3 | 343.8 ^a ± 61.2 | 123.8 ± 22.8 | 133.8 ± 22.8 | 538.8 ± 22.0 | 823.3 ^a ± 127.9 |

o Valores expresados en μ moles por gramo de DNA.

● Valores promedios \pm desviación estándar de 9 a 15 ratas sacrificadas en cada grupo y en cada edad gestacional.

^a Grupo desnutrido versus control, $P < 0.001$.

* Estadísticamente diferente con respecto a la edad gestacional precedente, en cada grupo, a un nivel de por lo menos $P < 0.01$.

TABLA 3

CARGA ENERGÉTICA EN PLACENTAS DE RATAS CONTROL Y DESNUTRIDAS*

| Edad gestacional (días) | Carga energética* | | P |
|----------------------------|----------------------------------|---------------------|--------|
| | Control ^o | Desnutridas | |
| 16 | 0.54 ^o ± 0.04 (10) | 0.54 ± 0.07 (10) | NS |
| 18 | 0.60 ± 0.05 (9) | 0.64 ± 0.02 (11) | < 0.05 |
| 20 | 0.59 ± 0.04 (10) | 0.64 ± 0.04 (13) | < 0.01 |

*

$$\left[\frac{\text{ATP} + 1/2 \text{ADP}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}} \right]$$

- ^o Valores expresados en μ moles por gramo de DNA.
- Valores promedio \pm desviación estándar del número de determinaciones entre paréntesis.
- * Cada determinación enzimática del ATP, ADP y AMP se hizo en la misma placenta. NS = No significativo.

La actividad de adenilato kinasa expresada por g de DNA o por mg de proteína mitocondrial para ambos grupos, figura en la Tabla 4. Al expresar la actividad de la enzima por gramo de DNA, no se observan cambios con el progreso de la preñez; sin embargo, al comparar el grupo D con el grupo C se observan valores menores en el grupo D (70-80% del valor del grupo C), alcanzando diferencias estadísticamente significativas sólo al día 16 post-concepción. Al expresar la actividad por mg de proteína mitocondrial, se aprecian diferencias entre ambos grupos, siendo significativamente menor la actividad del grupo desnutrido sólo al día 20 de edad gestacional.

En la Tabla 5 se informa la capacidad energética de las placentas de ambos grupos, calculada del producto del nivel de energía disponible (ATP + 1/2 ADP) por la actividad de adenilato kinasa, expresados ambos valores por mg de DNA placentario. Según revelan los datos, en ambos grupos se observa un aumento de la capacidad energética con el avance de la preñez, específicamente al día 18 con respecto al día 16, manteniéndose el nivel alto hasta el día 20. La capacidad energética del grupo D es el 72-75% de la del grupo C.

TABLA 4

ACTIVIDAD DE ADENILATO KINASA EN FRACCION SUBMITOCONDRIAL DE PLACENTA DE RATAS CONTROL Y DESNUTRIDAS

| Edad gestacional (días) | Actividad de adenilato kinasa | | | |
|-------------------------|---|--------------------------------------|--|---------------------------------------|
| | Control (μ moles/g DNA) ^o | Desnutridas | Control (μ mmoles/mg prot) [*] | Desnutridas |
| 16 | 43.26* \pm 18.0 (8) | 30.75 ^a \pm 7.8 (12) | 102.8 \pm 15.7 (8) | 110.9 \pm 29.1 (10) |
| 18 | 44.29 \pm 17.6 (9) | 35.9 \pm 8.9 (9) | 181.59 \pm 66.3 (8) | 137.3 \pm 37.6 (9) |
| 20 | 44.0 \pm 16.9 (14) | 34.8 \pm 20.7 (12) | 178.7 \pm 57.4 (12) | 110.8 ^a \pm 47.5 (11) |

- o Expresado en micromoles de ADP formados o utilizados por gramo de DNA por minuto.
- Expresado en milimicromoles de ADP formados o utilizados por miligramo de proteína de la subfracción soluble mitocondrial por minuto.
- * Valores promedio \pm desviación estandar de las placentas correspondientes al número de ratas sacrificadas, entre paréntesis.
- a Nivel de significancia, desnutridas vs control, $P < 0.01$.
- b Nivel de significancia con respecto a la edad gestacional precedente, $P < 0.01$.

TABLA 5

CAPACIDAD ENERGETICA DE LA PLACENTA DE RATAS CONTROL Y DESNUTRIDAS

| Edad gestacional (días) | Capacidad energética* | | o/o con respecto al grupo control |
|-------------------------|--|--------------------------|-----------------------------------|
| | Grupo control (μ moles/mg ADN) ^o | Grupo desnutridas | |
| 16 | 10.58 \pm 6.48 (8) | 7.98 \pm 2.28 (8) | 75.4 |
| 18 | 18.43 \pm 7.72 (8) | 13.29 \pm 4.57 (8) | 72.1 |
| 20 | 17.32 \pm 6.58 (11) | 13.06 \pm 2.90 (10) | 75.4 |

- o Los valores se expresan en μ moles por miligramo de ADN.
- * Capacidad energética [(ATP + 1/2 ADP) AK].
Los números entre paréntesis se refieren a aquellas muestras en las cuales se pudo determinar en la misma placenta el ATP, ADP y actividad de adenilato kinasa, lo que permite el cálculo de la capacidad energética.

DISCUSION

Los resultados de este estudio muestran que la desnutrición materna crónica provocó un retardo en el crecimiento fetal, retardo que adquirió significado estadístico ($P < 0.001$) en las últimas etapas de su desarrollo intrauterino. El hallazgo de menor peso fetal puede atribuirse a muchos factores, entre los cuales se ha postulado una disminución de la capacidad funcional de la placenta para cumplir las funciones para las que ha sido programada.

El mayor contenido de adenina nucleótidos, ATP y ADP al día 18 y 20 post-concepción en la placenta de ratas desnutridas, comparada con el grupo control, se traduce en una mayor carga energética en ese grupo. El contenido de ATP celular, que es considerado como un buen índice del nivel de energía disponible para funciones metabólicas y fisiológicas, refleja un balance entre los sistemas que generan ATP y aquéllos que lo utilizan. Atkinson (11), ha demostrado que las enzimas que generan ATP responden a la carga energética del sistema. Según nuestros hallazgos, se encontró la actividad de adenilato kinasa, enzima generadora de ATP, disminuida en la placenta del grupo desnutrido, lo que estaría en desacuerdo con la mayor carga energética de este grupo. No obstante, conforme a lo comunicado por Atkinson (11), la mayor carga energética actuaría como un sistema de regulación tipo retroalimentación negativa, ocasionado por el aumento del producto final sintetizado, en este caso ATP. Ya se ha demostrado el efecto inhibitor de ATP para otras enzimas generadoras de ATP (12).

Cabría postular que la mayor carga energética podría atribuirse probablemente a una menor demanda de ATP por la placenta de ratas desnutridas. Se ha propuesto y demostrado (13) que el ADP y AMP inhiben los procesos que utilizan energía, a diferencia del ATP que inhibe los sistemas que la generan. Altos niveles de ADP o AMP inhiben la actividad de aminoacil t RNA sintetasa, enzima biosintética que utiliza ATP (14), indicando así que la carga energética podría controlar la síntesis proteínica.

Los niveles de ADP en placenta de ratas desnutridas se encontraron elevados, lo que bien puede explicar el menor contenido de proteína y menor tamaño celular de la placenta, hallazgo comunicado previamente por otros autores (15).

Rosado *et al.* (16), al comparar la actividad de adenilato kinasa por gramo de DNA y el contenido de adenina nucleótidos en placentas de término de niños normales y pequeños para la edad gestacional, no encontraron diferencias en la actividad de la enzima. Sin embargo, al igual que en nuestro estudio, encontraron una mayor capacidad energética en las placentas de niños con retardo de crecimiento intrauterino. Los autores del presente trabajo no discuten las diferencias del potencial energético placentario entre los dos grupos.

Como sabemos, la placenta requiere un sistema muy activo en la generación de energía metabólica para manejar su propio metabolismo y crecimiento, así como para cumplir el rol de transferencia de nutrientes hacia el lado fetal. La carga de energía de la placenta aumentó significativamente con el progreso de la preñez en ambos grupos, al parecer, anticipándose

a la alta actividad metabólica de ese órgano y a las altas exigencias fetales, acordes con el significativo aumento del peso fetal al día 18 y 20 post-concepción. Se ha evidenciado una efectiva transferencia de nucleótidos marcados por la placenta hacia el lado fetal en ratas preñadas, ya cercanas al término de la preñez (17), demostrado por la rápida incorporación de los nucleótidos marcados en el RNA fetal y por una mínima incorporación en el RNA placentario.

Los mayores niveles de ATP observados en la placenta de las desnutridas, permiten postular una transferencia insuficiente de estos nucleótidos, lo que originaría una menor incorporación de ellos a la célula fetal, disminuyendo la disponibilidad energética para síntesis de la célula fetal. Un menor contenido de ATP en hígado de fetos de ratas desnutridas ha sido comunicado por los autores de esta investigación (18).

El estudio aquí descrito, demuestra que la desnutrición materna crónica en ratas, afecta el metabolismo energético celular de la placenta y el crecimiento fetal cerca del término de la preñez. El aumento de la carga energética de la célula placentaria y la disminución de la actividad de las enzimas generadoras de ATP en placentas de ratas desnutridas, permiten sugerir una inhibición de los sistemas que utilizan energía metabólica para procesos de síntesis y transporte activo de sustratos.

SUMMARY

ENERGY METABOLISM DURING PLACENTAL DEVELOPMENT IN RATS — EFFECT OF CHRONIC MATERNAL MALNUTRITION

The effect of maternal malnutrition on the energy metabolism of the developing rat placenta, related to fetal growth, was studied. Female virgin rats of the Wistar strain were fed restricted amounts of 25% casein diet, from puberty and throughout pregnancy. According to results, a significant decrease occurred in the activity of adenylate kinase, as well as a significant increase in the energy charge of the adenylate system (ATP, ADP), per gram of DNA of placental tissue near term, in the malnourished group. The data suggest that the significant increase of energy charge (ATP + 1/2 ADP: /ATP + ADP + AMP) of the placenta in the malnourished group, is the consequence of an inhibition of the reactions controlling ATP-consuming process, such as macromolecular synthesis pathways and active transport of substrates near term. This coincides with the simultaneous and significant decrease in fetal growth in this group.

BIBLIOGRAFIA

1. Widdowson, E. Nutrition of the foetus and the newly born. How the foetus is fed. *Proc. Nutr. Soc.*, 28:17-24, 1969.
2. Urrusti, J., P. Yoshida, L. Velasco, S. Frenk, A. Rosado, A. Sosa, M. Morales, T. Yoshida & J. Metcalf. Human fetal growth retardation: I. Clinical features of sample with intrauterine growth retardation. *Pediatrics*, 50:547-558, 1972.
3. Dhand, U., M. Jeacock, D. Shepherd, E. Smith & G. Carole Varnam. Activities of enzymes concerned with pyruvate, oxaloacetate, citrate, acetate and aceto-

- acetate metabolism in placental cotyledons of sheep. *Biochem. Biophys. Acta*, **222**:216-218, 1970.
4. Diamant, Y. & E. Shafrir. Enzymes of carbohydrate and lipid metabolism in the placenta and liver of pregnant rats. *Biochem. Biophys. Acta*, **270**:424-430, 1972.
 5. Araya, J. & M. Ruz. Influencia de la situación nutricional preconcepcional materna sobre el crecimiento y desarrollo fetal. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, **31**:133-145, 1981.
 6. Adam, H. Adenosine 5' triphosphate, adenosine 5' diphosphate and adenosine 5' monophosphate. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. H. U. Bergmeyer (Ed.). New York, N. Y., Academic Press, 1963, p. 539, 573.
 7. Dow, D. S. The isolation of skeletal muscle mitochondria showing tight coupling, high respiratory indices, and differential adenosine triphosphatase activities. *Biochemistry*, **6**:2915-2922, 1967.
 8. Sottocasa, G. L., B. Kuylenstierna, L. Ernest & E. Anders Bergstrand. *Methods in Enzymology*. Vol. X. Eastabrook(Ed.) 1967, p. 448.
 9. Burton, K. A study of the conditions and mechanisms of diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, **62**:315-322, 1956.
 10. Lowry, O. M., J. Rosebrough, A. L. Farr & R. J. Randall. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**:265-275, 1951.
 11. Atkinson, D. E. The energy charge of the adenilate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry*, **7**:4030-4034, 1968.
 12. Shen, L. C., L. Fall, G. M. Walton & D. Atkinson. Interaction between energy charge and metabolic modulation in the regulation of enzymes of amphibolic sequences. Phosphofructokinase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemistry*, **7**:4041-4045, 1968.
 13. Klungsoyr, L., J. H. Hagemen, L. Fall & D. Atkinson. Interaction between energy charge and product feedback in the regulation of biosynthetic enzymes. Aspartokinase, phosphoribosyl-adenosine, triphosphate synthetase and phosphoribosyl pyrophosphate synthetase. *Biochemistry*, **7**: 4035-4040, 1968.
 14. Brenner, M., F. de Lorenzo & B. N. Ames. Energy charge and protein synthesis. *J. Biol. Chem.*, **245**:450-452, 1970.
 15. Araya, J., M. C. Reyes, C. M. Baginsky & M. Ruz. Crecimiento celular de útero, placenta y fetos durante la restricción calórica materna crónica en ratas. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, **33**:814-825, 1983.
 16. Rosado, A., A. Bernal, A. Soza, M. Morales, J. Urrusti, P. Yoshida, S. Frenk, L. Velasco, T. Yoshida & J. Metcuff. Human fetal growth retardation. III. Protein, DNA, RNA, adenine nucleotides and activities of the enzymes pyruvic and adenylate kinase in placenta. *Pediatrics*, **50**:568-577, 1972.
 17. Hayashi, T. T. & B. I. Garvey. Transplacental passage of nucleotides, nucleosides, and bases. *Am. J. Obstet. Gynec.*, **102**:1154-1161, 1968.
 18. Ruz, M. & J. Araya. Efecto de la nutrición materna en la carga y capacidad energética de la placenta e hígado fetal en ratas. En: **II Reunión Latinoamericana de Ciencias Farmacéuticas, Santiago, Chile, noviembre-diciembre, 1983.** (Libro de Resúmenes).