

# Desnutrición experimental en la rata

JULIA ARAYA<sup>1</sup>, GONZALO DONOSO<sup>2</sup> Y MARÍA ANGÉLICA TAGLE<sup>1</sup>

Unidad de Nutrición Básica. Departamento de Nutrición.  
Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

## RESUMEN

Se realizaron 4 ensayos de desnutrición experimental:

- A: Ratas recién nacidas, colocadas desde el primer día de vida en camadas de a 16 crías por madre; destete a los 14 días y posterior administración de dieta apteica ad lib. y oferta de mezcla grasa durante 3 horas cada día.
- B: Semejante a A; diferente en que el destete fue a los 21 días.
- C: 16 crías por camada desde el primer día de vida; destete a los 14 días y posterior administración de dieta de caseína con 3.7 NDpCal%.
- D: Ratas amamantadas de a 9 por madre, destete a los 21 días y posteriormente dieta de caseína con 3.7 NDpCal%.

Las ratas de los ensayos A y B presentaron desnutrición con algunas características de kwashiorkor: importante descenso en la seroalbúmina y disminución marcada del índice N/H<sub>2</sub>O corporal. La gravedad de la desnutrición fue mayor en A que en B.

Las ratas de los ensayos C y D presentaron desnutrición con algunas características de marasmo: menor disminución de la seroalbúmina y mantención de la relación N/H<sub>2</sub>O corporal dentro del rango de normalidad. La gravedad del cuadro fue mayor en C que en D.

Queda demostrado que no sólo en algunas características de marasmo, sino que también algunas del kwashiorkor pueden reproducirse en la rata, empleando artificios dietarios y escasa manipulación, sin recurrir al sistema de alimentación forzada.

Las ratas desnutridas, obtenidas según estos modelos, se proponen como población adecuada para el ensayo de la potencialidad de alimentos para recuperar de la desnutrición.

<sup>1</sup> Departamento de Nutrición. Zañartu 1042. Santiago, Chile.

<sup>2</sup> Who Medical Nutritionist. P. O. Box 1555. Tehran, Irán.

Recibido: 12-6-1969

Numerosos investigadores han tratado de reproducir los cuadros de desnutrición infantil en el animal de experimentación, especialmente en la rata y en el cerdo, en busca de mayor conocimiento de las alteraciones bioquímicas y fisiológicas que los caracterizan (1-21). Se pretende averiguar cómo y cuánto los caminos metabólicos se desvían de lo "normal", si el daño es reversible o no, las consecuencias en el desarrollo posterior del individuo, etc.

Existe además una motivación de orden práctico: los animales desnutridos podrían ser considerados como una población adecuada para el ensayo de diferentes dietas en cuanto a su capacidad para promover recuperación (22-24). Ello es especialmente interesante referido a las nuevas fuentes proteicas: proteínas semiconvencionales o no convencionales y sus mezclas, diseñadas para combatir la desnutrición (23, 24).

La desnutrición infantil severa se presenta en forma de dos síndromes extremos: marasmo y kwashiorkor (25). Generalmente se acepta que en la etiología del marasmo la deficiencia de proteínas va acompañada de deficiencia calórica, en tanto que el kwashiorkor se asocia a dietas pobres en proteínas con relativa abundancia de calorías (25). Sin embargo, vale la pena recalcar que los dos síndromes son los extremos de un espectro continuo y que todos los grados intermedios pueden encontrarse (4).

Cuadros de desnutrición experimental tipo marasmo son relativamente fáciles de obtener porque la ingesta voluntaria se reduce considerablemente (8, 19, 21, 26-28) cuando el valor proteico de la dieta es inadecuado. Este mismo hecho hace improbable lograr una ingesta (voluntaria) calórica alta con aporte proteico bajo (28) y, generalmente, los investigadores que desean obtener un síndrome tipo kwashiorkor se ven en la necesidad de usar alimentación forzada (26).

En esta comunicación detallamos la manera de producir características de ambos síndromes en ratas muy jóvenes, alimentadas con diferentes dietas, sin recurrir al sistema de alimentación forzada, usando sólo administración de dieta *ad libitum*. Pretendemos dar a este trabajo el enfoque de contribución metodológica.

## MATERIALES Y METODOS

*Dieta:*

Dieta apteica (en gramos): maicena, 500; grasa vegetal, 100; aceite de maravilla, 50; mezcla de vitaminas hidrosolubles (29), 30; mezcla de vitaminas liposolubles (29), 20; mezcla mineral (29), 50; almidón de papa, 75; glucosa, 125, y celulosa en polvo, 50. Contiene 4.2 Cal y 0.6 mg de nitrógeno por gramo.

Mezcla grasa (en gramos): crema de leche (\*), 100; glucosa, 10; aceite de maravilla, 10; vitaminas liposolubles (29), 0.5, y vitaminas hidrosolubles (9), 0.5. Contiene 3.1 Cal/g.

Dieta de caseína con 3.7 NDpCal% (\*\*), la misma composición de la dieta apteica, excepto que 65 g de maicena fueron reemplazados por la cantidad equivalente de caseína. Contiene 4.2 Cal y 8.95 mg de nitrógeno por gramo. El valor proteico de 3.7 garantiza la mantención del peso corporal (30) y en los animales jóvenes conduce a cuadros de desnutrición.

*Animales:*

Ratas recién nacidas, hijas de madres normales, con peso promedio de 5 g (habitual en nuestra colonia), se distribuyeron en camadas de 9 ó de 16 individuos por madre. El destete se realizó a los 21 días o, cuando se deseaba producir daño mayor, las crías se separaron precozmente de las madres a los 14 días.

Se emplearon dos sistemas de alimentación: I) dieta apteica *ad libitum* y, además, oferta de mezcla grasa por un lapso de 3 horas diariamente, y II) únicamente dieta de caseína con 3.7 NDpCal%, *ad libitum*. Los animales tenían libre acceso al agua de bebida. Se realizaron 4 ensayos (A, B, C y D), cuyas condiciones experimentales aparecen en la Tabla 1.

Las ratas se pesaron cada dos días. A partir del destete se mantuvieron en grupos de 6 a 8 individuos por jaula y se controló la ingesta. Las características ambientales del vivero fueron 28°C y 70% de humedad. No se detectó ninguna infección durante la realización de los ensayos.

(\*) Composición de la crema de leche (en gramos): humedad, 68.5; lípidos, 25.0; glúcidos, 3.5, y proteínas, 2.5

(\*\*) NDpCal%: Net Dietary protein Calories %, en palabras, el porcentaje de las calorías totales de la dieta que es suministrado en forma de proteínas utilizables. Hemos preferido la abreviación inglesa, ya que es la más conocida.

En el ensayo B durante la lactancia se usó un comedero especial, alto, al que sólo la madre tenía acceso. Este detalle fue necesario sólo en este ensayo, ya que la rata joven comienza normalmente a ingerir dieta a partir de los 14 ó 15 días de edad.

En el ensayo D, en que se buscaba producir desnutrición posterior al destete habitual, no se evitó la posibilidad de ingesta de dieta materna por parte de las crías.

Los animales se sacrificaron por decapitación. Se tomaron muestras para microhematocrito y hemoglobina (31); se recogió sangre para analizar proteínas totales y seroalbúmina (32); se determinó el contenido de agua y de nitrógeno en las carcasas y se calculó la relación N/H<sub>2</sub>O corporal (33, 34); se determinó proteína (32) y grasa (35) en hígado. Los números entre paréntesis se refieren a los métodos empleados. No todos los análisis se hicieron en los 4 ensayos. En el ensayo D se efectuó la medición del consumo de oxígeno en el animal total, usando un calorímetro de circuito cerrado.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Las ratas desnutridas carecían de vivacidad y se veían francamente emaciadas. Presentaban cambios en la calidad y en la cantidad de pelaje; incluso en algunos casos hubo zonas de alopecia. Tenían la piel fría y tendían a agruparse; además, la mayoría de ellas mostraba cianosis, especialmente en las extremidades. Los signos descritos fueron menos marcados en los animales del ensayo D, es decir, en aquellos que tuvieron alimentación materna normal y que sólo después de los 21 días fueron sometidos a desnutrición.

Al realizar la autopsia, los animales con dieta aprroteica y mezcla grasa (ensayos A y B) contenían abundante líquido en la cavidad peritoneal, hecho que fue más evidente en las ratas A. Hubo un alto porcentaje de mortalidad durante los ensayos: alrededor de 65% en A y C; 25% en B y 30% en D en un período experimental mucho mayor, cifras que confirman la menor gravedad del impacto de la desnutrición, cuando éste es posterior a una lactancia normal. La mayor mortalidad en A que en B es otro hecho que destaca la importancia del momento de implante de la dieta inadecuada: las ratas en ambos casos recibieron insuficiente cantidad de leche materna,

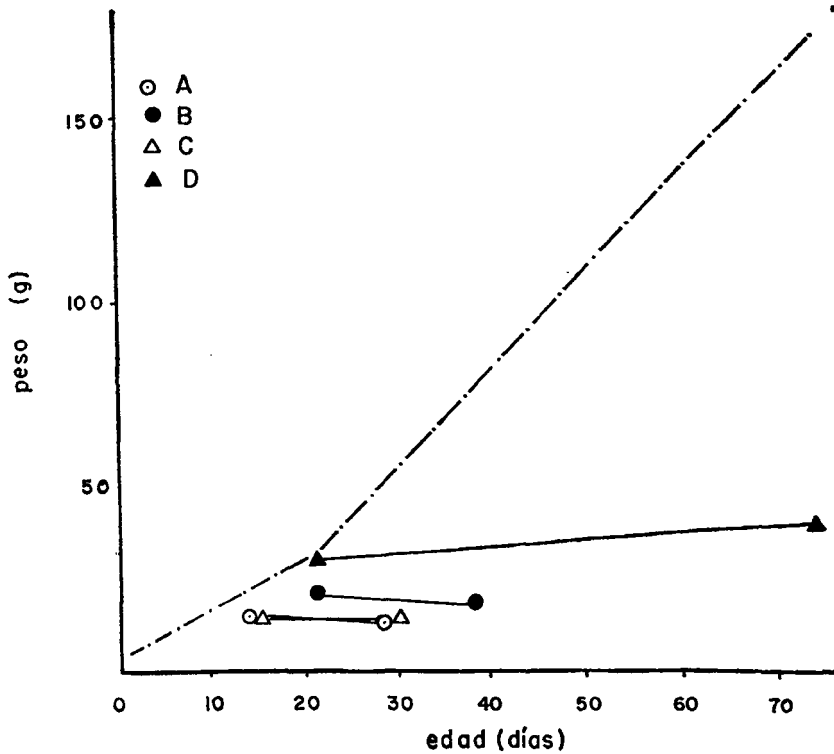


Fig. 1.—Evolución ponderal de ratas sometidas a experiencias de desnutrición. Comparación con la evolución normal en nuestra colonia (línea discontinua).

por 14 días para A y 21 días para B, y la mortalidad fue menor en los animales amamantados durante más tiempo.

La evolución del peso en las ratas desnutridas se muestra en la figura 1, donde, a guisa de comparación, también se ha incluido el peso de ratas normales de nuestra colonia entre 0 a 75 días de edad (línea discontinua). Puede observarse que la dieta de caseína con 3.7 NDpCal% fue capaz de frenar totalmente el crecimiento en el ensayo C, pero no lo hizo en forma tan drástica cuando fue administrada después de una lactancia normal (D). Por otra parte, el conjunto dieta apteica y mezcla grasa produjo una disminución de 12.5% con respecto al peso de destete en el ensayo A, y de 13.6% en B, en períodos de 14 y 16 días, respectivamente (Tabla 1).

En la Tabla 2 se muestran algunos cambios químicos atribuibles al estado de malnutrición. Puede observarse que las

**TABLA 1**  
**DESCRIPCION DE LOS ENSAYOS DE DESNUTRICION**  
**EXPERIMENTAL EN LA RATA**

Ensayo	Crías por camada	Edad del destete	Peso al destete g	Sistema de alimentación (*)	Edad final	Peso final g
A	16	14	16	I	28	14
B	16	21	22	I	37	19
C	16	14	15	II	28	15
D	9	21	30	II	74	41

(\*) I dieta aprroteica ad lib., y mezcla grasa durante 3 horas diariamente;  
 II dieta de caseína con 3.7 NDpCal % ad lib.

ratas con dieta aprroteica y mezcla grasa presentaron seriamente disminuidas las proteínas totales, la seroalbúmina y el hematocrito, y el daño fue mayor cuanto más precoz fue el implante de este sistema de alimentación: A mayor daño que B. Aun las ratas B tuvieron índices sanguíneos significativamente disminuidos con relación a los valores normales.

Los animales de los ensayos A y C, de la misma edad, mostraron importantes diferencias en los índices recién señalados: las ratas C tuvieron menor descenso en los niveles de proteínas totales, seroalbúmina y hematocrito (ver Tabla 2).

La misma dieta del ensayo C (3.7 NDpCal%), administrada hasta 53 días a contar del término de una lactancia adecuada (ensayo D), pudo mantener las proteínas totales y la seroalbúmina, pero no logró defender al hematocrito, el que aparece significativa disminuido ( $39 \pm 2.0$  vs.  $45 \pm 1.0$ ). Reforzando este hallazgo, la hemoglobina fue significativamente inferior a lo normal:  $10.9 \pm 0.7$  vs.  $15.0 \pm 0.7$  g/100 ml.

El contenido proteico en el hígado se encontró significativamente disminuido en todas las ratas malnutridas; nuevamente a través de este índice se detecta la desventaja de los animales con lactancia inadecuada. Nos llamó la atención que las ratas A y C presentaron valores similares.

Una manera relativamente simple de informar acerca de la composición corporal es a través de la relación N/H<sub>2</sub>O (Tabla 2). Se ha demostrado que esta relación varía según la

TABLA 2

PROTEINAS SERICAS, HEMATOCRITO, HEMOGLOBINA, PROTEINA Y GRASA HEPATICA, Y RELACION N/H<sub>2</sub>O CORPORAL EN RATAS DESNUTRIDAS

Ensayo	PROTEINAS SERICAS		Hematocrito %	Hemoglobina g/100 ml	Proteína hepática mg/g	Grasa hepática mg/g	N/H <sub>2</sub> O
	Totales g/100 ml	SA					
A	3.77±0.27 (22) (*)	2.06±0.10 (23)	31.6±0.8 (22)	—	101.9±2.7 (9)	—	28.3±2.4 (11)
B	—	2.82±0.14 (13)	34.1±0.2 (14)	11.4±0.5 (10)	131.1±4.9 (11)	49.8±5.2 (12)	—
C	5.95±0.29 (18)	3.64±0.15 (19)	34.5±1.1 (19)	—	99.3±3.4 (19)	—	34.7±1.7 (12)
D	6.95±0.37 (17)	3.65±0.32 (16)	39.1±2.0 (10)	10.9±0.7 (9)	155.8±7.0 (9)	51.0±10.0 (8)	43.5±1.9 (10)
Ratas normales	6.60±0.11 (17)	4.27±0.07 (17)	45.0±1.0 (20)	15.0±0.7 (20)	220.8±4.9 (17)	34.8±1.2 (17)	(**)

(\*) El número entre paréntesis significa los animales en cada caso.

(\*\*) Varía con la edad. Ver figura 2.

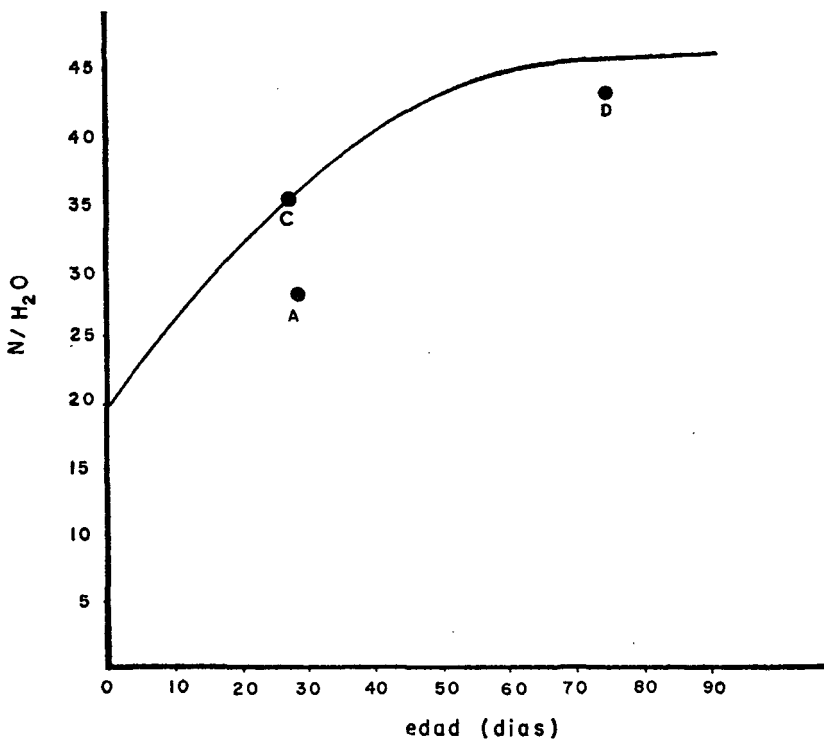


Fig. 2.—Relación N/H<sub>2</sub>O en ratas sometidas a experiencias de desnutrición. Comparación con los valores normales encontrados en nuestra colonia (Yañez y Donoso, 1963).

edad del animal, pero a una determinada edad es constante en condiciones de dieta adecuada (36). La Fig. 2 muestra la relación N/H<sub>2</sub>O en ratas normales de nuestra colonia de 0 a 90 días de edad y contra ella compara los promedios encontrados en los ensayos A, C y D. Puede observarse que los grupos A y C, que juzgados según retardo de crecimiento serían comparables, juzgados a través del índice N/H<sub>2</sub>O aparecen como universos diferentes:  $28.3 \pm 2.4$  vs.  $34.7 \pm 1.2$  (Tabla 2). El promedio encontrado en C es semejante al valor encontrado en ratas normales de la misma edad:  $34.7 \pm 1.7$  vs.  $34.4 \pm 1.6$ . El promedio en D,  $43.5 \pm 1.9$ , tampoco fue distinto del de las ratas normales de igual edad:  $46.1 \pm 1.6$ . En nuestras condiciones experimentales, el conjunto de dieta apteica y mezcla grasa es el único sistema de alimentación capaz de alterar significativamente este índice.

TABLA 3

## PROMEDIOS DE INGESTA CALORICA Y PROTEICA EN RATAS DESNUTRIDAS

Ensayo	INGESTA CALORICA		Ingesta proteica NDpCal/Kg <sup>0.73</sup> /día
	Cal/rata/día	Cal/Kg <sup>0.73</sup> /día	
A	9.1	193.6	(*)
B	(**)	(**)	(*)
C	5.6	119.1	4.4
D	15.4	175.0	6.5

(\*) Cantidades mínimas ingeridas como contaminantes de la dieta y de la mezcla grasa;

(\*\*) No se controló la ingesta durante todo el período experimental; en los días controlados fue del mismo orden de lo informado en el ensayo A.

El contenido de grasa hepática, estudiado en los grupos B y D, fue de  $49.8 \pm 5.2$  y de  $41.0 \pm 10.0$ , respectivamente, cifras superiores a las encontradas en ratas normales,  $34.8 \pm 1.2$ , pero que tampoco son lo suficientemente altas como para traducir hígado graso como característica de grupo. Llama la atención la gran disparidad de los valores individuales, hecho que queda en evidencia por la magnitud del error de la media (Tabla 2).

Los datos de ingesta proteica y calórica aparecen en la Tabla 3. Puede observarse que los animales que mantuvieron su peso corporal (ensayo C) tuvieron una ingesta calórica promedio de  $119.1 \text{ Cal/kg}^{0.73}/\text{día}$ , cifra similar a la aceptada como requerimiento energético de mantención,  $121 \text{ Cal/kg}^{0.73}/\text{día}$  (37), comparable también con el valor de  $122.5 \text{ Cal/kg}^{0.73}/\text{día}$ , encontrado por nosotros en ratas de diferente edad y en muy distintas condiciones experimentales (38). Usando esta misma expresión, la ingesta calórica de las ratas alimentadas con dieta apteica y mezcla grasa (ensayo A) y de los animales del ensayo D, fueron  $62.5$  y  $47.0\%$  mayores. Sin embargo, el desarrollo ponderal no podía correlacionarse con el exceso de calorías sobre el gasto de mantención, debido a la restricción de nitrógeno; por el contrario, existen evidencias experimentales en el sentido de demostrar que en casos de

deficiencia proteica el exceso relativo de calorías es agravante (11, 18).

El requerimiento proteico para mantención de peso, determinado por nosotros en ratas jóvenes, es de 6.8 NDpCal/kg<sup>0.73</sup>/día (39), cifra del mismo orden que la usada por Miller y Payne (40) para calcular la pérdida endógena de nitrógeno, 6.00 NDpCal/kg<sup>0.73</sup>/día, ó 250 mg N/kg<sup>0.73</sup>/día. Teniendo en cuenta estas cifras sería posible predecir mantención para las ratas del ensayo D; sin embargo, éstas crecieron algo y la mantención del peso fue observada en el ensayo C con menor ingesta proteica. También llama poderosamente la atención que las ratas de los ensayos A y B, que recibían dieta apteica, sólo perdieron alrededor de 13% del peso inicial (Tabla 1).

Cabe preguntarse entonces cómo estos animales desnutridos aparecen con mayor eficiencia que la que pudiera esperarse a partir de datos obtenidos en animales normales.

Miller y Mumford (41), al estudiar individuos con ingestas excesivamente altas y que no aumentan de peso como era de esperar, aducen 4 posibles respuestas metabólicas que teóricamente podrían dar cuenta de la discrepancia: aumento de la actividad física, reducción de la digestibilidad, cambios en la composición corporal y aumento en la producción de calor.

En el caso de las ratas desnutridas en que la discrepancia también existe, pero en sentido inverso, podrían aducirse las 4 posibilidades contrarias: disminución de actividad física, aumento de la digestibilidad, cambios opuestos en la composición corporal y disminución de la termogénesis. El aumento de la digestibilidad puede descartarse por absurdo porque se ha demostrado fehacientemente que los cuadros de desnutrición se acompañan de alteraciones patológicas en el intestino, especialmente en la zona de las vellosidades; también se ha comunicado disminución de enzimas digestivas en estados de desnutrición (7).

En nuestra experiencia no medimos la actividad de las ratas, tampoco la temperatura corporal; pero en la apreciación general se observó disminución de ambas. Para mayor información en algunas ratas del ensayo D se determinó consumo de oxígeno en el animal total y el resultado fue signifi-

cativamente inferior que el obtenido en ratas normales:  $1.01 \pm 0.05$  vs.  $1.36 \pm 0.05$  ml/hr/cm.<sup>2</sup>

Los resultados presentados señalan que hemos logrado reproducir en la rata características clínicas y bioquímicas de los cuadros de desnutrición descritos en población infantil. Indudablemente que los cuadros obtenidos no son puros. Ello queda claramente en evidencia en la descripción del aspecto de las ratas, como también a través de algunos de los índices bioquímicos.

En tres de los cuatro ensayos realizados, las ratas fueron sometidas a condiciones de lactancia insuficiente en cantidad y en dos de ellos insuficiente también en el tiempo, tratando de remedar las condiciones de la lactancia humana en nuestro medio (42). El hecho de colocar 16 crías por madre implica mayor competencia entre las crías por la leche materna y una ingesta individual inadecuada en cantidad (1, 5), condiciones que favorecerían la implantación de un marasmo. La administración posterior de una dieta de inadecuado valor proteico, 3.7 NDpCal%, con ingesta proteica y calórica inferior a los requerimientos (37), permitiría considerar los animales del ensayo C como portadores de desnutrición con características predominantes de tipo marasmo. Apoyarían esta afirmación la menor disminución en la seroalbúmina y la mantención de la relación nitrógeno/agua dentro del rango de normalidad. En nuestras condiciones experimentales la sola administración de la dieta con 3.7 NDpCal% por un período prolongado después de una lactancia normal, condujo a resultados comparables.

Por otra parte, la implantación de dieta aprroteica y exceso de calorías sobre los requerimientos de mantención (ensayos A y B), favorecería la aparición de algunas características de kwashiorkor, hecho que queda apoyado por la disminución franca de la seroalbúmina y la significativa alteración de la relación nitrógeno/agua.

Podría cuestionarse el interés de seguir en este tipo de experiencias, ya que hay abundancia de publicaciones sobre el tema. Sin embargo, creemos que los resultados aquí presentados son de valor práctico, puesto que con artificios dietarios y con el mínimo de manipulación se logran características de kwashiorkor y de marasmo con alimentación *ad lib.* en tiempos relativamente breves (ensayos A, B y C). Los índices bio-

químicos que se estudiaron son de fácil realización, lo que permite trabajar con grupos grandes de animales y seguir su evolución gradual, tanto en el período de desnutrición como posteriormente si se desea controlar la recuperación.

Las ratas desnutridas, por el hecho de simular las condiciones de uno de los sectores más exigentes de la población humana, el sector de la infancia desnutrida, aparecen como material de selección para el ensayo de mezclas de proteínas semiconvencionales y/o no convencionales, dedicadas a la población infantil. Proponemos que el ensayo de la potencialidad de un alimento para recuperar de la desnutrición sea usado como dato complementario a los habituales de calidad y valor proteico.

#### SUMMARY

##### Experimental malnutrition in the rat

With the aim of reproducing in the rat some characteristics of infant malnutrition, four trials were performed:

- A: New born rats placed 16 per mother, weaned at the age of 14 days. Thereafter they were fed ad libitum a non protein diet. Besides, during three hours daily they were offered a fat mixture.
- B: Similar to A, except that weaning time was 21 days.
- C: New born rats, placed 9 per mother, weaned at the age of 21 days. Thereafter a casein diet with 3.7 NDpCal% was fed ad libitum.
- D: New born rats, placed 9 per mother, weaned at the age of 21 days. Thereafter a casein diet with 3.7 NDpCal% was fed ad libitum.

The rats in trials A and B showed some signs of kwashiorkor: low serum albumin levels and a marked decrease in body N/H<sub>2</sub>O ratio. Malnutrition in A was more serious than in B. The rats in trials C and D showed some features of a marasmatic type of malnutrition: a slower decrease in the serum albumin level and a normal body N/H<sub>2</sub>O ratio. Animals in trial C were more damaged than those in trial D.

It is shown that with the help of dietary tricks and scarce handling of the animals, without force feeding, not only marasmus signs but also kwashiorkor features can be easily reproduced in the rat.

Malnourished rats, obtained according to these models, are proposed as animal population for testing the biological potenciality of any food in the recovery from malnutrition.

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) Platt, B. S., C. R. C. Heard & J. R. C. Stewart.—Experimental protein - calorie deficiency. In: *Mammalian Protein Metabolism*, ed. H. N. Munro and J. B. Allison. Academic Press, New York, volume II, p. 446-514.

- (2) Widdowson, E. M. & R. A. McCance.—The effect of chronic undernutrition and of total starvation on growing and adult rats. *Brit. J. Nutr.*, 10: 363-373, 1956.
- (3) Waterlow, J. C., G. A. O. Alleyne, H. Chan, J. S. Garrow, A. Hay, P. James, D. Picou & J. M. L. Stephen.—Observations on the mechanism of adaptation to the low protein intakes. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 16: 175-200, 1966.
- (4) Viteri, F., M. Béhar & G. Arroyave.—Clinical aspects of protein malnutrition. In: *Mammalian Protein Malnutrition*, ed. H. N. Munro and J. B. Allison. Academic Press, New York, volume II, p. 523-561.
- (5) McCance, R. A.—Food, growth and time. *Lancet* 2: 671-676, 1962.
- (6) Wikramanayake, T. W.—Protein malnutrition in the rat induced by protein - calorie imbalance. *Brit. J. Nutr.* 20: 641-648, 1966.
- (7) Solimano, G., E. A. Burgess & B. Levin.—Protein-calorie malnutrition. Effect of deficient diets on enzyme levels of jejunal mucosa of rats. *Brit. J. Nutr.* 21: 55-68, 1967.
- (8) Platt, B. S., K. Halder & B. H. Doell.—Pathology of acute experimental protein malnutrition in the force-fed rat. *Proc. Nutr. Soc.* 21: VI-VII, 1962.
- (9) Waterlow, J. C. & J. M. L. Stephen.—Adaptation of the rat to a low-protein diet: the effect of a reduced protein intake on the pattern of incorporation of L C<sup>14</sup> lysine. *Brit. J. Nutr.* 20: 461-484, 1966.
- (10) Dobbing, J.—The effect of undernutrition on the myelination in the central nervous system. *Biol. Neonat.* 9: 132-147, 1965/1966.
- (11) McDonald, I. & E. M. Gharavi.—Some effects of the dietary sucrose in experimental protein deficiency. *Proc. Nutr. Soc.* 19: 29-30, 1960.
- (12) Widdowson, E. M., J. W. T. Dickerson & R. A. McCance.—Severe undernutrition in growing and adult animals. 4. The impact of severe undernutrition on the chemical composition of soft tissues of the pig. *Brit. J. Nutr.* 14: 457-471, 1960.
- (13) Elkinton, J. R. & E. M. Widdowson.—Effect of chronic undernutrition on body composition in the rat. *Metabolism* 8: 404-417, 1959.
- (14) Williams, J. N.—Reponse of the liver to prolonged protein depletion. I. Liver weight, nitrogen and deoxyribonucleic acid. *J. Nutrition* 73: 199-209, 1961.
- (15) Culley, W. J. & E. T. Mertz.—Effect of restricted food intake on growth and composition of the preweanling rat brain. *Pro. Soc. Exptl. Biol. Med.* 118: 233-235, 1965.
- (16) Umaña, R. y C. Tejada.—Reproducción en la rata blanca de algunas características de la desnutrición proteico-calórica humana. *Arch. Venezolanos Nutr.* 15: 33-51, 1965.
- (17) Cabak, V., G. A. Gresman & R. A. McCance.—Severe undernutrition in growing and adult animals. 10. The skin and hair of pigs. *Brit. J. Nutr.* 16: 635-640, 1962.
- (18) Lowrey, R. S., W. G. Pond, R. H. Barnes, L. Krook & J. K. Loosli. Influence of caloric level and protein quality on the manifestations of protein deficiency in the young pig. *J. Nutr.* 78: 245-253, 1962.
- (19) McRoberts, M. R.—Growth retardation of day-old chickens and physiological effects at maturity. *J. Nutr.* 87: 31-40, 1965.

- (20) Cabak, V., J. W. T. Dickerson & E. M. Widdowson.—Response of young rats to deprivation of protein or of calories. *Brit. J. Nutr.* 17: 601-616, 1963.
- (21) Kirsch, R. E., S. J. Saunders & J. F. Brock.—Animal models and human protein-calorie malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 21: 1225-1228, 1968.
- (22) Cabak, V., J. W. T. Dickerson & M. W. Stanier.—Response of young rats to rehabilitation with diets containing different amounts of protein after deprivation of protein or of calories. *Brit. J. Nutr.* 17: 617-626, 1963.
- (23) Araya, J., M. A. Tagle y G. Donoso.—Caseína, harina de pescado y torta de maravilla en la recuperación de la rata precozmente desnutrida. I. Dietas de igual valor proteico suministradas ad libitum. *Nutr. Bromatol. Toxicol.* 7: 73-81, 1968.
- (24) Araya, J., G. Donoso y M. A. Tagle.—Caseína, harina de pescado y torta de maravilla en la recuperación de la rata precozmente desnutrida. II. Efecto de la suplementación de la proteína con sus aminoácidos limitantes y aumento del período de realimentación. *Nutr. Bromatol. Toxicol.* 7: 95-101, 1968.
- (25) Monckeberg, F. y G. Donoso.—Epidemiología de la desnutrición infantil. *Nutr. Bromatol. Toxicol.* 4: 39-48, 1965.
- (26) Sidransky, H. & E. Verney.—Clinical pathology of acute aminoacid deficiencias. *Arch. Pathol.* 78: 134-148, 1964.
- (27) Rex, A. y M. A. Tagle.—Deficiencia aminoacídica experimental. *Nutr. Bromatol. Toxicol.* 7: 39-45, 1968.
- (28) Miller, D. S. & P. R. Payne.—Weight maintenance and food intake. *J. Nutrition* 78: 255-262, 1962.
- (29) Tagle, M. A., E. Colombara y G. Donoso.—Mezclas de minerales y vitaminas para dietas experimentales (rata). (Por publicarse.)
- (30) Miller, D. S. & P. R. Payne.—Problems in the prediction of protein values of diets. The influence of protein concentration. *Brit. J. Nutr.* 15: 11-19, 1961.
- (31) Dacie, J. V. & V. E. Siler.—Hematología práctica. Ediciones Toray, S. A., Barcelona, España, p. 42-43, 1965.
- (32) Debro, J. R., H. Tarver & A. Korner.—The determination of serum albumin and globulin by a new method. *J. Lab. Clin. Med.* 50: 728-732, 1957.
- (33) Donoso, G. y E. Yáñez.—Estudio sobre el método de Miller y Bender para la determinación de la utilización proteica neta. *Nutr. Bromatol. Toxicol.* 1: 37-42, 1962.
- (34) Pellet, P. L.—The N: H<sub>2</sub>O ratio in the Sprague-Dawley rat and its variation with the diet under conditions of determination of net protein utilization. *Brit. J. Nutr.* 21: 609-616, 1967.
- (35) Pande, S. V., R. Parvin Khan & T. A. Venkitasubramanian.—Micro-determination of lipids and serum total fatty acids. *Anal. Biochem.* 6: 415-423, 1963.
- (36) Yáñez, E. y G. Donoso.—Variación de la composición corporal de la rata en función de la edad. Primer Congreso de Nutrición, Bromatología y Toxicología. Santiago de Chile, noviembre de 1963. Libro de resúmenes, pág. 30.

- (37) Committee on Animal Nutrition. National Academy of Sciences. National Research Council. Nutrient requirements of laboratory animals. Number X. Publication 990, 1962.
- (38) Tagle, M. A. & G. Donoso.—Protein requirements for the pregnant rat. *Nutritio et Dieta* 11: 44-52, 1969.
- (39) Tagle, M. A. & G. Donoso.—Effect of protein level on utilization of casein and gluten by weanling rats. *J. Nutrition* 93: 579-583, 1967.
- (40) Miller, D. S. & P. R. Payne.—A theory of protein metabolism. *J. Theoret. Biol.* 5: 398-412, 1963.
- (41) Miller, D. S. & P. Mumford.—Gluttony. I. An experimental study of overeating low-or high-protein diets. *Am. J. Clin. Nutr.* 20: 1212-1222, 1967.
- (42) Barja, I., D. Ballester, E. Yáñez, N. Pak, M. A. Tagle y G. Donoso.—Alimentación de la madre, composición química de la leche y duración de la lactancia. *Pediatría* 7: 20-24, 1964.