

TRABAJOS GENERALES

Nutrición y Bioquímica del sistema nervioso durante el desarrollo

CARLOS E. SALAS B.* y FERNANDO MONCKEBERG B.

Departamento de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Universidad de Chile,
Casilla 15138, Santiago, Chile.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo consiste en reunir información en torno a los siguientes cambios que ocurren durante el desarrollo del sistema nervioso: variación del metabolismo de ADN, del metabolismo de mielina, de la actividad de ciertas enzimas, de la síntesis de ARN y proteínas, cambios de tipo hormonal y morfológico. Más adelante se establece una relación entre la desnutrición durante el período de desarrollo en el sistema nervioso y su influencia sobre los cambios antes mencionados.

INTRODUCCION

El desarrollo del sistema nervioso ha sido motivo de interés para muchos investigadores, porque es allí donde reside la actividad conductual de los seres superiores. No obstante, aparte de una descripción anatómica detallada que de él se posee en la actualidad, junto a indudables avances en el campo de la transmisión de un impulso nervioso, subsiste el problema del almacenamiento de la información, sea esta, adquirida a través de la experiencia o en el caso más general la que necesariamente deben poseer los organismos más evolucionados para que a través de su desarrollo puedan estructurar un sistema nervioso maduro.

* Presents address:
Mental Health Research Institute
University of Michigan Medical Center
Ann Arbor, Michigan 48104.
Recibido: 4-5-73.

Si consideramos que la información genética está contenida en el ADN celular, podemos afirmar que el desarrollo del cerebro resulta de interacciones muy complejas entre el genomio y diversos factores exógenos que contribuyen a la expresión de este lenguaje. Paralelamente si aceptamos que en el cerebro al igual que otros tejidos, las etapas que median entre la información contenida en el genomio y su expresión como proteínas son: transcripción seguida de traducción, resulta de interés estudiar las variaciones que sufren ambos procesos durante la maduración del sistema nervioso (1-16)

CAMBIOS DURANTE EL DESARROLLO

Varios investigadores han establecido los períodos en que se produce el mayor crecimiento celular durante el desarrollo del sistema nervioso, usando como indicadores, la variación del número de células, variación del contenido de ADN, crecimiento celular axonal, dendrítico, establecimiento de sinápsis, mielinización, entre otros. De ellos se puede concluir que, el desarrollo del sistema nervioso puede presentarse como una secuencia ordenada de eventos. En este sentido, Patterson, ha señalado que el aumento de ADN, proteínas y lípidos, durante el desarrollo fetal y postnatal temprano de cerebro de oveja sigue una forma logarítmica (17).

Recientemente Grossfeld y otros investigadores, al estudiar los cambios en la composición proteica durante el desarrollo ontogénico señalaron que el cambio más drástico, medido por la acumulación de proteínas, ocurrió durante las primeras semanas de vida postnatal en el cerebro de ratón (7-18). Asimismo, diversas regiones del cerebro exhiben diferentes velocidades de proliferación celular, y las actividades de varias enzimas aparecen de manera secuencial en el cerebro del hombre. Respecto a la síntesis de mielina y de diversos metabolitos, se ha encontrado que la velocidad de formación es máxima durante un período específico en la rata y el cerdo; otro tanto ocurre en relación a la influencia de ciertas hormonas que actúan sobre el sistema nervioso (19-24).

Al hacer un análisis de los factores más importantes que determinan el desarrollo cerebral en distintas especies, podemos destacar:

CAMBIOS DEL METABOLISMO DE ADN

Al estudiarse la ribonucleótido reductasa, enzima que ha sido considerada como uno de los sitios de control en la síntesis de ADN y la división celular, (25, 26) se encuentra una estrecha correlación entre su actividad en cerebro de rata, pollo y hombre y los períodos de división celular. Recientemente al analizarse las actividades de dos ADN polimerasas cerebrales, se ha probado que una de ellas sufre cambios importantes durante le etapa prenatal y postnatal temprana en cerebelo y corteza cerebral de rata (27).

METABOLISMO DE MIELINA DURANTE EL DESARROLLO

Desde hace varios años se ha demostrado que la síntesis de diversos fosfátidos se hace a ritmos diferentes, durante el desarrollo del cerebro de rata. Posteriormente ha quedado en evidencia que la mielina se sintetiza como una extrusión de la membrana plasmática de la célula oligodendroglía y que además la capacidad biosintética en cerebros de ratas de 20 días, equivale a un 10% de la capacidad biosintética medida a los 10 días (28-32).

CAMBIOS DE ALGUNOS PATRONES ENZIMATICOS

Al estudiarse fracciones enriquecidas en células neuronales y gliales se ha demostrado que las enzimas: fosfofructoquinasa, (2.7.1.11); fumarato hidratasa, (4.2.1.2); β -galactosidasa, (3.2.1.23); β -glucosidasa, (3.2.1.21); manosidasa, (3.2.1.24); fosfatasa ácida, (3.1.3.2); β -glucuronidasa, (3.2.1.31); arilsufatasa, (3.1.6.1); cambian su actividad durante el desarrollo del cerebro de rata (33-35).

CAMBIOS EN EL METABOLISMO DE ARN

Los primeros datos señalaron que el nivel de ARN polimerasa mostraba una disminución de la actividad, a medida que el cerebro alcanzaba su estado adulto (36,37). Paralelamente la actividad ribonucleásica, (fosfomonoesterasa y fosfodiesterasa) poseía niveles mayores en cerebros de ratas jóvenes y que además el contenido de ARN polisomal aumentó linealmente hasta los 20 días, fecha en que adquirió un valor cons-

tante (37, 38). Corroborando esta idea, poco después, al medir la actividad de las enzimas que intervienen en la síntesis de ARN, se observó que los niveles de ellas son mayores en ratas de 10 días y que los valores de las enzimas degradativas son sustancialmente menores. Datos similares se obtuvieron, cuando se midió la incorporación de precursores a diversos tipos de ARN cerebral, (1, 2, 3, 5) y mediante el análisis del decaimiento del ARN hibridizable, donde se encontró que tanto en núcleo como en citoplasma, la pérdida de esta fracción era más rápida en animales jóvenes, sugiriendo un mayor recambio de ARN mensajero en el cerebro inmaduro (4, 39, 40, 41).

CAMBIOS DEL METABOLISMO DE PROTEINAS

Cuando se estudió en un sistema polisomal libre de células, la capacidad para incorporar aminoácidos radioactivos, se demostró que al décimo día de vida postnatal dicha incorporación es máxima y que posteriormente disminuía al igual que la proporción de polisomas pesados, lo cual confirmó los datos de Sellinger y colaboradores (42), quienes usando un sistema *in vivo*, demostraron que la agregación de ribosomas cerebrales debe ser un proceso más rápido en animales inmaduros. Ese mismo año, se demostró que la síntesis de proteínas mielínicas es más lenta en ratas maduras que durante el desarrollo (43). Anteriormente se había establecido (44), que los microsomas de cerebro de ratón maduro, disminuían la velocidad de síntesis proteica, cuando se incubaban con un sistema libre de células provenientes de ratas jóvenes; lo que se sumaba a las evidencias que indicaban que la disminución en la capacidad de incorporación del aminoácido leucina C^{14} no se podía atribuir a una pérdida de la actividad enzimática de la fracción pH 5 través de la edad, pero que en cambio, dicho grado de incorporación era inversamente proporcional a la edad del cerebro del cual se aíslan los microsomas (12, 45). Sin embargo, los resultados que surgen usando aminoácidos C^{14} deben analizarse cuidadosamente, porque al parecer algunos aminoácidos inhiben la incorporación de otros y además, por las dificultades que presenta el transporte de ciertos aminoácidos a través de las membranas (46-48). También, hay que considerar el efecto estimulador sobre la sín-

tesis proteica que poseen los aminoácidos, glicina y ácido gamma aminobutírico en cerebro de rata durante el desarrollo. Aparentemente, dicha estimulación tiene lugar a nivel de la incorporación del aminoácido al ARN de transferencia.

A las evidencias anteriores habría que agregar que varios investigadores han dado su apoyo a la hipótesis que postula que el control de la síntesis proteica está regulado a través de la formación o ruptura de poliribosomas, cuando se demostró que la incorporación de fenilalanina C¹⁴ en proteínas ribosomales de cerebro disminuía con la edad en forma coetánea a la disminución de poliribosomas.

Finalmente, creemos importante destacar que diversos investigadores han señalado que la metilación de cadenas laterales en las proteínas cerebrales altera su actividad. Más aún, se ha demostrado que la actividad de las metilasas cerebrales es alta en fetos de cerebros de ratas para disminuir abruptamente después del nacimiento (49-52).

CONTROL HORMONAL DURANTE EL DESARROLLO

Desde el punto de vista hormonal podemos señalar que, a través de una serie de estudios se ha demostrado la importancia de la hormona tiroidea en el metabolismo de los ácidos nucleicos en cerebro de rata y aunque la ablación de esta glándula no altera el contenido de ADN en cambio modifica la cantidad de ARN y proteína, lo cual indica que la deficiencia tiroidea afecta el tamaño de las células cerebrales (53-58). Sin embargo, otras hormonas también desempeñan un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso; en este sentido se ha señalado, que la hipofisectomía, reduce la síntesis de proteína y ARN, produciéndose una disminución de la relación ARN/ADN y observándose al cabo de tres semanas una franca disminución de los polisomas más pesados en el cerebro de la rata (59-67).

Al estudiarse el efecto de otras hormonas sobre el cerebro de la rata queda de manifiesto que los glucocorticoides reducen la división celular; sin embargo, 15 días después de una ingestión de cortisol, las relaciones ARN/ADN y proteína/ADN, son semejantes a los controles no tratados, lo cual indicaría que el cortisol no altera el proceso de diferenciación bioquímica en forma irreversible (68-70).

CAMBIOS MORFOLOGICOS EN EL DESARROLLO

Desde el punto de vista morfológico, también ocurren cambios importantes; al observar el espacio extracelular se encontró que el volumen ocupado por él disminuye durante el desarrollo, pudiéndose afirmar además que el cambio más importante ocurre durante la tercera semana de vida postnatal (71, 72).

ESTADO NUTRICIONAL Y MADURACION DEL SISTEMA NERVIOSO

El conjunto de evidencias presentadas hasta aquí indican que en la última fase de vida intrauterina y/o durante la primera fase de vida postnatal ocurren cambios bastante marcados que más tarde configuran las características del sistema nervioso maduro. El lapso que demoren estos cambios estará dado por el tipo de complejidad que adquieran estas estructuras una vez maduras, de acuerdo al grado de evolución en la escala animal de la especie estudiada. Es así, como se ha demostrado que el cerdo, el intervalo de desarrollo se ha fijado entre la octava semana y la 20ª de vida postnatal, en rata, entre 0 y 20 días de vida postnatal y en el hombre, entre el 5º mes postgestacional y el 30 mes de vida postnatal (73). Recientemente, ha quedado en evidencia, que interferencias con esta secuencia ordenada de eventos no solo retardará la maduración, sino que provocará trastornos irreversibles (16). Por lo tanto, la desnutrición durante el crecimiento proliferativo, retarda la velocidad de división celular, lo que provoca una reducción permanente en el número de células cerebrales (74-76). Sin embargo, si el mismo grado de desnutrición ocurre cuando no hay división celular, pero sí crecimiento, este se detiene, reduciéndose el contenido de proteína por célula, no obstante, este cambio se revierte al restaurar las condiciones normales. Diversos investigadores, (74-76) han empleado el término vulnerabilidad del sistema nervioso, queriendo señalar que, factores exógenos producen alteraciones irreversibles en el sistema nervioso en desarrollo, durante la etapa proliferativa, engendrándose un cerebro más pequeño, con diferencias en los constituyentes químicos que lo hacen distinto del patrón normal. En este sentido se ha planteado que la desnutrición producida al 6º mes de vida en el hombre,

no presenta una rehabilitación total, al suprimirse el ayuno alimenticio (77). Esta idea se vió afianzada, al demostrarse que la desnutrición durante las primeras etapas de vida, produce un número de células menor (78, 79). Otros datos que apoyan este modelo en el hombre son: cambios en la composición de distintas áreas cerebrales, cambios en el contenido de ADN, ARN, proteínas y lípidos totales, cambios de la composición lipídica, cambios en el contenido de agua. Todas estas alteraciones se manifiestan a los 15 días de vida, si desde el primer día de vida postnatal se induce una desnutrición (73, 77, 80-82). Otros datos importantes son: disminución de la vía glicolítica por disminución de la actividad aldolásica, disminución del consumo de oxígeno mitocondrial, aumento de la relación plasmática fenilalanina/tirosina, presentando los pacientes características semejantes con los enfermos que sufren fenilcetonuria (33, 34, 76, 83-86). Más aún, se ha señalado que la desnutrición aguda en seres humanos altera la capacidad de aprendizaje, memoria y desarrollo motor, en cambio la desnutrición producida en adultos, solo afecta el rendimiento intelectual en forma transitoria, mientras dura la deprivación alimenticia (88). La idea anterior se ve reforzada ya que durante los primeros meses de vida, el cerebro, en el hombre como en otros animales es el órgano que crece a mayor velocidad, lo que explicaría que resulte más afectado por una alteración de la ingesta durante este período (89, 90). Recientemente al estudiarse las sinapsis corticales durante la deprivación de alimentos, se observó una reducción del 38% en los terminales axónicos de rata (91).

En torno a las alteraciones en el metabolismo de proteínas, usando cortes de cerebro e hígado de ratas, ha quedado de manifiesto que, después de cortos lapsos de ayuno se ve afectada la capacidad de incorporación de aminoácidos radioactivos y que el estado nutricional también altera la relación polisomas libres/polisomas asociados a membranas (92-98).

En el metabolismo de ARN podemos citar las siguientes evidencias que indican alteraciones a consecuencias de la desnutrición; al estudiar en tejido cerebral los efectos de una deprivación alimenticia, se demostró que hay una disminución de la capacidad biosintética de proteínas, que puede indicar un cambio del contenido de alguna especie de ARN,

pero, una vez que se restituye la dieta, aumenta marcadamente la incorporación de aminoácidos, alcanzando los valores normales (92, 93, 95-97). Se postula, que la actividad ribonucleásica del citosol, podría ser responsable de las variaciones en el contenido de las distintas especies de ARN cerebral. Sin embargo, no se descarta la posibilidad que otros factores jueguen un rol, en la disminución del contenido de ARN cerebral en animales sometidos a ayuno (99). Al respecto, los estudios en tejido cerebral durante el desarrollo, son escasos, en tanto que en otros tejidos y en células cultivadas *in vitro*, se han encontrado notables efectos producidos por la deprivación proteica sobre el metabolismo de ARN. Algunos autores (100) al estudiar en hígado y cerebro los efectos dietarios en la actividad de la ARN polimerasa dependiente de ADN, ven cambios significativos solo en hígado, pero hay que destacar que este estudio se lleva a cabo con ratas adultas, lo que podría explicar la indiferencia del cerebro ante los cambios dietarios. Recientemente, se ha descubierto, que la reducción progresiva de ARN ribosomal y no ribosomal en hígado en ayuno, es proporcional a la pérdida de peso, pero, una pérdida preferencial de ribosomas libres ocurrió durante el primer día de deprivación, al mismo tiempo, la incorporación de ácido orótico, fue preferencial en los ribosomas libres durante las primeras cuatro horas de ayuno (101). Los estudios en cultivo de tejidos, usando células humanas, indican que la deprivación aminoacídica, afecta la velocidad de síntesis de ARN ribosomal, (ARNr) y ARN de transferencia (ARNt). En ausencia de glutamina o leucina, la velocidad de síntesis de ARNr disminuye en 75%; la restitución de la dieta normal, no afecta por igual a las dos especies, demostrando de paso que la síntesis de ARNr y ARNt no ocurre en forma simultánea (102). Al respecto, el metabolismo de ARN ha sido el objeto de atención de muchos investigadores. Hay ciertos conceptos que aparecen como evidentes en cuanto al proceso de maduración de ARN de eucariontes, tanto en su compartimentalización, como en la secuencia de etapas que dan origen a las especies de ARN ya procesado (103, 104). Por ejemplo, se ha demostrado que al sacar valina del medio de cultivo en células He-la, se produce una reducción en la síntesis de ARN que sedimenta a 45S, efecto que es similar al de ciertos inhibidores de la síntesis proteica (105-108).

En la maduración de ARN de transferencia, la metilación que sufre, puede provocar cambios en su estructura secundaria y/o terciaria, lo cual afectaría la interacción de él, con otros componentes macromoleculares, alterando el proceso de síntesis proteica (109, 110). Concretamente, se ha demostrado que la aminoacilación del fenilalanil ARNt se restringe cuando el ARNt no está metilado y se restituye cuando el ARNt se vuelve a metilar (111). Además, queda claro, que la depleción de algunos aminoácidos esenciales, disminuye la velocidad de síntesis del precursor de ARNt, como asimismo su maduración, y que en cambio la carencia de valina solo deprime la síntesis del precursor (112). Las variaciones en el contenido de ARNt, pueden ser importantes, pues se ha señalado insistentemente el papel regulatorio que puede jugar el ARNt en el mecanismo de expresión genético (113-115). Johnson, al estudiar la actividad de la ARNt sintetasa y del ARN de transferencia a distintas edades en cerebro de rata, demostró que no había variaciones de la actividad enzimática, ni de la capacidad de carga del ARNt, pero, que sin embargo, había un gran recambio del ácido nucleico, durante el desarrollo del cerebro, para disminuir luego en forma progresiva (116). Sin embargo, en este tipo de análisis, no se hace una separación previa de las distintas especies de ARNt, para estudiar el papel regulatorio de algunas de ellas en la síntesis proteica. Al respecto en cerebros de ratas en desarrollo, se ha encontrado junto al valil ARNt normal una segunda actividad aceptora de valina, pero esta nueva actividad desaparece después de la tercera semana de vida postnatal (117). Recientemente, se ha podido constatar una reducción en la capacidad de carga de varios ARNt de cerebro de rata durante el desarrollo (11).

En el metabolismo de ARN ribosomal, la metilación que sufre es importante para alcanzar su actividad funcional normal (113, 118, 119); al respecto, se ha señalado que al bloquear la síntesis de ARN con actinomicina D disminuye la incorporación de grupos metilo en todas las especies de ARN. Esto indicaría que solo el ARN que sedimenta a 45S, serviría como sustrato para las metilasas del núcleo (120). Sin embargo, otros autores han indicado que la metilación del ARN 45S, no es condición necesaria para su transformación

en ARN 32S, y que el efecto de la carencia de metionina, disminuyendo el contenido de ARNr, se debe principalmente a su condición de aminoácido esencial, pues otros aminoácidos esenciales producen efectos análogos (121). De acuerdo a Hayashi y otros investigadores, el metabolismo de ARN ribosomal hepático (18S y 28S) sufre alteraciones al cabo de un día de ayuno, pues la incorporación de ácido orótico, se hace de preferencia en los polisomas libres, disminuyendo la incorporación del precursor en los polisomas unidos a membrana (102, 122).

Sobre el metabolismo de ARN mensajero, la información que se posee es escasa. Munro, ha señalado que el contenido celular de una especie de ARN mensajero es función de lo activo del metabolismo de la proteína la cual codifica (121). Esta hipótesis se ha visto confirmada para el ARN mensajero de hemoglobina de reticulocito (124). Además se ha propuesto, que hay dos tipos de ARN mensajero, uno de vida media corta y otro cuya vida media es más larga. El ayuno afecta principalmente al mensajero de vida media corta (123, 125).

Hasta aquí, ha sido nuestra intención mostrar los efectos de la desnutrición como factor exógeno, tratando de relacionar este hecho, con el conjunto de cambios que sufre el cerebro durante el desarrollo.

A la luz de los antecedentes expuestos anteriormente, referentes al rol de la desnutrición en el proceso de transcripción y posterior procesamiento del ARN, como asimismo, en el proceso de traducción proteica, postulamos nuestra hipótesis, al señalar que la vulnerabilidad del sistema nervioso en su período de desarrollo temprano se debe a una alteración irreversible en el proceso transcripcional y postranscripcional, teniendo en cuenta que el sistema nervioso se encuentra en pleno proceso de diferenciación celular durante esta etapa. El hecho que una vez alcanzada la maduración del cerebro, la desnutrición no provoque un daño irreversible, confirma la existencia de la etapa vulnerable antes mencionada.

Dentro del proceso postranscripcional, fijamos nuestra atención en aquellas etapas que conducen a la formación del ARN funcional a partir de su respectivo precursor. Los causantes de estas alteraciones serían los cambios cualitativos o cuantitativos de las bases purínicas y pirimídicas, como asi-

mismo la pentosa correspondiente. Además, como es lógico, podemos esperar, cambios en el contenido de enzimas que permiten la maduración de este ARN. A consecuencia de esto se observará una modificación del contenido y/o la calidad de algunas de las especies de ARN, viéndose afectados los procesos celulares de traducción del mensaje genético.

Recientemente Kumar (99) ha observado una reducción de la capacidad aceptora aminoacídica en la fracción de ARN 4S, al estudiar ratas sometidas a una deprivación proteica durante el desarrollo. Dicho déficit puede llegar hasta el 50% de sus respectivos controles y no se observa una recuperación de la capacidad normal al reponer la dieta completa. Lo anterior permite abrigar esperanzas para encontrar efectos similares producidos por la desnutrición en otras especies de ARN.

SUMMARY

Nutrition and Biochemistry of the Nervous System during Development

The purpose of this review is to gather the available information dealing with the following changes that take place during the development of the nervous system: DNA metabolism, the metabolism of myelin, the activity of certain enzymes, the synthesis of RNA and protein, the effects of hormones and morphological alterations. A relation between undernutrition during development of the nervous system and its effects on the changes mentioned above is outlined.

BIBLIOGRAPHY

1. Johnson, T. C. The effects of maturation on in vitro RNA synthesis by mouse brain cells. *J. Neurochem.* 14: 1075-1081, 1967.
2. Jacob, M., J. Samec, P. Stevenin, J. Garel and P. Mandel. Polysomes and polysomal RNA of rat brain. *J. Neurochem.* 14: 169-178, 1967.
3. Cain, D. F. Biosynthesis of RNA of guinea pig cerebral cortex. *J. Neurochem.* 14: 1175-1185, 1967.
4. Kimberlin, R. H. RNA synthesis in mouse brain. *J. Neurochem.* 14: 123-134, 1967.
5. Wegelin, I. and F. A. Manzol. Free Nucleotides in the chick embryo brain during development. *J. Neurochem.* 14: 1161-1165, 1967.
6. Jakoubek, B., E. Gutmann, J. Fischer and A. Babicky. Rate of protein renewal in spinal motoneurons of adolescent and old rats. *J. Neurochem.* 15: 6336-6341, 1968.
7. Winick, M. and A. Noble. Quantitative changes in DNA, RNA and protein during prenatal and postnatal growth in the rat. *Devel. Biol.* 12: 451-466, 1965.
8. Murthy, M. R. Protein synthesis in growing rat tissues, polyribosomes concentration of brain and liver as function of age. *Biochem. Biophys. Acta.* 119: 599-613, 1966.

9. Lerner, M. P. and T. C. Johnson. Regulation of protein synthesis in developing mouse brain tissue. *J. Neurochem.* 18: 193-201, 1971.
10. Lerner, M. P. and T. C. Johnson. Regulation of protein synthesis in developing mouse brain tissue. *J. Biol. Chem.* 245: 1388-1393, 1970.
11. Barra, H. S., L. E. Uñates, M. S. Sayavedra and R. Caputto. Capacities for binding amino acids by tRNA from rat brain and their changes during development. *J. Neurochem.* 19: 2289-2297, 1972.
12. Johnson, T. C. and M. W. Luttges. The effects of maturation on in vitro protein synthesis by mouse brain cells. *J. Neurochem.* 13: 545-552, 1966.
13. Gilbert, B. E. and T. C. Johnson. Protein turnover during maturation of mouse brain tissue. *J. Cell. Biol.* 53: 143-147, 1972.
14. Guroff, G. and M. Brodsky. Enzymes of nucleic acid metabolism in the brains of young and adult rats. *J. Neurochem.* 18: 2077-2084, 1971.
15. Menzies, R. A. and P. H. Gold. The apparent turnover of mitochondria ribosomes and sRNA of the brain in young, adult and aged rats. *J. Neurochem.* 19: 1671-1683, 1972.
16. Winick, M., P. Rosso, and J. A. Brasel. In "Lipids, malnutrition and developing brain". Elsevier Excerpta Med., North Holland. Ed. Assoc. Scient. Publ. Amst. Lond. 1972, p. 199.
17. Patterson, D. S. P., D. Sweasey, and C. N. Hebert. Changes occurring in the chemical composition of the CNS during foetal and postnatal development of the sheep. *J. Neurochem.* 18: 2027-2040, 1971.
18. Grossfeld, R. M. and E. M. Shooter. A study of the changes in protein composition of mouse brain during ontogenic development. *J. Neurochem.* 18: 2265-2277, 1971.
19. Winick, M. Changes in nucleic acid and protein content of the human brain during growth. *Pediat. Res.* 2: 352-361, 1968.
20. Duckett, S. and A. G. E. Pearse. Proc. 5th Intern. Congress of Neuropath. (Intern. Congress, Series N° 100) Excerpta Med. Amst. 1966, p. 738.
21. Davidson, A. N. and J. Dobbing. In "Applied Neurochemistry". Davidson, A. N. and J. Dobbing, Eds., Blackwell, Oxford, 1968, p. 253.
22. Sereni, F. N. Principi, L. Perletti and L. Sereni. Undernutrition and the developing rat. Influence of acetyl cholinesterase and succinic dehydrogenase activities and on norepinephrine and 5-OH tryptamine tissue concentrations. *Biol. Neonat.* 10: 254-265, 1966.
23. Gelber, S., P. L. Campbell, G. E. Deibler and L. Sokoloff. Effects of L-thyroxine on amino acid incorporation into protein in mature and immature rat brain. *J. Neurochem.* 11: 221-229, 1964.
24. Milstein, J. M., J. G. White, and K. F. Swaiman. Oxidative phosphorylation in mitochondria of developing rat brain. *J. Neurochem.* 15: 411-415, 1968.
25. Millard, S. A. Ribonucleotide reductase in developing brain. *J. Biol. Chem.* 247: 2395-2400, 1972.
26. Reichard, P., Z. N. Canellakis, and E. S. Canellakis. Studies on a possible regulatory mechanism for the biosynthesis of DNA. *J. Biol. Chem.* 236: 2514-2519, 1961.

27. Chiu, J. and S. G. Sung. Pattern of developmental changes in two DNA polymerases of rat brain. *Biochem. Biophys. Acta.* 269: 364-369, 1972.
28. Freysz, L., R. Bieth, C. Judes, M. Sensenbrenner, M. Jacob, and P. Mandel. Distribution quantitative des divers phospholipides dans les neurones et les cellules gliales isolées du cortex cérébral de rat adulte. *J. Neurochem.* 15: 307-313, 1968.
29. Sheltaby, A. and R. M. C. Dawson. The polyphosphoinositides and other lipids of peripheral nerves. *Biochem. J.* 100: 12-18, 1966.
30. Cuzner, M. L., A. N. Dawson, and N. A. Gregson. The chemical composition of vertebrate myelin and microsomes. *J. Neurochem.* 12: 469-481, 1965.
31. Peters, A., S. L. Palay, and F. H. Webster. *The fine structure of the nervous system.* Harper and Row. Ed. New York 1970, p. 125.
32. Bernshon, S. and S. R. Cohen. In "Lipids malnutrition and developing brain. Elsevier Excerpta Med., North Holland, Ed., 1972, p. 159.
33. Adlard, B. P. F. and J. Dobbing. Vulnerability of developing brain, development of four enzymes in the brains of normal and undernourished rats. *Brain. Res.* 28: 97-107, 1971.
34. Adlard, B. P. F. and J. Dobbing. Phosphofructokinase and fumarate hydratase in developing rat brain. *J. Neurochem.* 18: 1299-1302, 1971.
35. Raghavan, S. S., D. B. Rhoads and J. N. Kanfer. Acid hydrolases in neuronal and glial enriched fractions of rat brain. *Biochem. Biophys. Acta.* 268: 755-760, 1972.
36. Barondes, S. H. Studies with an RNA polymerase from brain. *J. Neurochem.* 11: 663-669, 1964.
37. Weiss, S. B. Enzymatic incorporation of ribonucleoside triphosphates into the interpolynucleotide linkages of ribonucleic acids. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 46: 1020-1030, 1960.
38. Yamagami, S. and K. Mori. Changes in polysomes of the developing rat brain. *J. Neurochem.* 17: 721-731, 1970.
39. Bondy, S. C., S. Roberts. Messenger ribonucleic acid of cerebral nuclei. *Biochem. J.* 105: 1111-111, 1967.
40. Vesco, C. and A. Giuditta. Pattern of RNA synthesis in rabbit brain. *Biochem. Biophys. Acta.* 142: 385-402, 1967.
41. Yamagami, S., R. R. Fritz, and D. A. Rappoport. Biochemistry of the developing rat brain. Changes in the ribosomal system and nuclear RNA, s. *Biochem. Biophys. Acta.* 129: 532-547, 1966.
42. Sellinger, O. Z., W. G. Ohlsson, A. J. Frankel, J. M. Azcurra, and P. D. Petiet. A study of the nascent polypeptides synthesized on the free polyribosomes of rat brain in vivo. *J. Neurochem.* 18: 1243-1260, 1971.
43. Sammeck, R., R. E. Marteson, and R. O. Brady. Studies of the metabolism of myelin basic proteins in various regions of the central nervous system of immature and adult rats. *Brain. Res.* 34: 241-254, 1971.
44. Johnson, T. C. and G. Bellytschko. Alteration in microsomal protein synthesis during early development of mouse brain. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 62: 844-851, 1969.

45. Murthy, M. R. V. and D. A. Rappoport. Preparation and properties of ribosomes. *Biochem. Biophys. Acta.* 95: 132-145, 1965.
46. Folbergrova, J. Incorporation of labeled amino acids into the proteins of brain cortex slices *in vitro* in the presence of other nonradioactive amino acids. *J. Neurochem.* 13: 553-562, 1966.
47. Vahvelainen, M. L. and S. S. Oja. Kinetics of influx of phenylalanine tyrosine and tryptophan, histidine and leucine into slices of brain cortex from adult and seven day old rats. *Brain Res.* 40: 477-488, 1972.
48. Appel, A. S. In "Protein metabolism of the nervous system". Lajtha, Ed., Plenum Press. 1970, p. 621.
49. Baxter, C. F. and S. Tewari. In "Protein metabolism of the nervous system". Lajtha, Ed., Plenum Press. 1970, p. 439.
50. Paik, W. K. and S. Kim. Protein methylation in rat brain *in vitro*. *J. Neurochem.* 16: 1257-1261, 1969.
51. Paik, W. K. and S. Kim. Protein methylation. *Science*, 174: 114-119, 1971.
52. Paik, W. K., S. Kim and A. W. Lee. Protein methylation during the development of rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46: 933-941, 1972.
53. Argiz, C. A. G., J. M. Pasquini, S. Kaplun and C. J. Gómez. Hormonal regulation of brain development. Effect of neonatal thyroidectomy on succinate dehydrogenase and other enzymes in developing cerebral cortex and cerebellum of the rat. *Brain. Res.*, 6: 635-646, 1967.
54. Geel, S. E. and P. S. Timiras. Influence of neonatal hypothyroidism and of thyroxine on the acetylcholinesterase and cholinesterase activities in the developing central nervous system of the rat. *Endocrinol.*, 80: 1069-1074, 1967.
55. Correze, C. L., A. Fellous, P. Pinell, R. Lahalle, and J. Núñez. Capacité de charge et formation du complexe ternaire dans un système acellulaire de foie de rats thyroïdoprives. *Biochem. Biophys. Acta.*, 272: 596-606, 1972.
56. Horn, G. Thyroid deficiency and inanition. *Anat. Rec.*, 121: 63-79, 1972.
57. Meites, J. and L. F. Wolterink. Uptake of radioactive iodine by the thyroids of underfed rats. *Science*, 111: 175-176, 1950.
58. Levine, S. and R. F. Mullins. Hormonal influences on brain organization in infant rats. *Science*, 152: 1585-1592, 1966.
59. Block, J. B. and W. B. Essman. Growth hormone administration during pregnancy: A behavioral difference in offspring rat. *Nature*, 205: 1136-1137, 1965.
60. Monckeberg, F., G. Donoso, S. Oxman, N. Pak and J. Meneghello. Human growth hormone in infant malnutrition. *Pediatr.*, 31: 58-64, 1963.
61. Beas, F., I. Contreras, and A. Maccioni. Growth hormone in infant malnutrition: The arginine test in marasmus and kwashiorkor. *Brit. J. Nutr.*, 26: 169-175, 1971.

62. Jakoubek, B. M. Buresova, I. I. Hajek, J. Etrychova, A. Paulik and A. Dedkova. Effect of ACTH on the synthesis of rapidly labelled RNA in the nervous system of mice. *Brain Res.*, 43: 417-428, 1972.
63. Korner, A. Growth hormone control of biosynthesis of protein and RNA. *Recent Progr. Horm. Res.*, 21: 205-236, 1965.
64. Tata, J. R. The formation and distribution of ribosomes during hormone induced growth and development. *Biochem. J.*, 104: 1-16, 1967.
65. Gupta, S. L. and G. P. Talwar. Effect of growth hormone on ribonucleic acid metabolism. *Biochem. J.*, 110: 401-406, 1968.
66. DeVellis, J. and D. English. Hormonal control of glycerolphosphate dehydrogenase in rat brain. *J. Neurochem.*, 15: 1061-1070, 1968.
67. Gispen, W. H., D. Dewied, P. Schotman, and Z. H. S. Jans. Effect of hypophysectomy on RNA metabolism in rat brain stem. *J. Neurochem.*, 17: 751-761, 1970.
68. Yu, F. and P. Feigelson. Effect of cortisone on orotic acid transport and RNA synthesis in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, 141: 662-667, 1970.
69. Namiki, H., W. Ruch, and A. Gorbman. Further studies of qualitative changes in RNA transcription in brains of femalerats given testosterone soon after birth. *Comp. Biochem. Physiol.*, 42B: 563-568, 1972.
70. Balazs, R., M. Cotterrell. Effect of hormonal state on cell number and functional maturation of the brain. *Nature*, 236: 348-350, 1972.
71. Bondareff, W. and J. J. Pysh. Distribution of the extracellular space during post natal maturation of rat cerebral cortex. *Anat. Rec.*, 160: 773-780, 1968.
72. Bondareff, W. and R. Narotzky. Age changes in the neural microenvironment. *Science*, 176: 1135-1136, 1972.
73. Dobbing, J. and M. C. Path. In "Malnutrition, Learning and Behaviour". Scrimshaw, N. S. and Gordon, Ed., Press Cambridge, 1967, p. 181.
74. Winick, E. and A. Noble. Quantitative changes in ribonucleic acid and protein during normal growth of rat placenta. *Nature*, 212: 34-36, 1966.
75. Dobbing, J., J. N. Hopewell, and A. Lynch. Vulnerability of developing brain. Permanent deficit of neurons in cerebral and cerebellar cortex following early mild undernutrition. *Exper. Neurol.*, 32: 439, 447, 1971.
76. Dobbing, J. Vulnerable periods in developing brain. In "Applied Neurochemistry". Davison, A. N., J. Dobbing, Eds., Blackwell. Scient. Publ. Ltd. 1968, p. 287.
77. Monckeberg, F. In "Malnutrition, Learning and Behavior". Scrimshaw, N. S. and Gordon, Ed., MIT Press, Cambridge 1967, p. 269.
78. Bass, N. H., M. G. Netsky, E. Young and V. Charlottesville. Microchemical and histologic study of myelin formation in the rat. *Arch. Neurol. (Chicago)* 23: 303-313, 1970.

79. Dickerson, J. W. E., J. Dobbing, and R. A. McCance. The effect of undernutrition on the postnatal development of the brain and cord in pigs. *Proc. Roy. Soc. Biol.*, 166: 396-407, 1967.
80. Steward, R. J. and B. S. Platt. In "Malnutrition, Learning and Behaviour". Scrimshaw, N. S. and Gordon, J. E., Ed., MIT Press Cambridge (1967), p. 168.
81. Cravioto, J. E., E. DeLicardie and C. Birch. Nutrition, growth and neurointegrative development: an experimental and ecologic study. *Pediatric*, 38: 319, 1965.
82. Monckeberg, F., G. Donoso, S. Valiente and A. Arteaga. Análisis y comentario de la encuesta nutritiva y de las condiciones de vida de la población infantil de la provincia de Curicó. *Rev. Chil. Ped.*, 38: 522-535, 1967.
83. Oxman, S., A. Maccioni, A. Zúñiga, R. Spada and F. Monckeberg. Disturbances of carbohydrate metabolism in infantil marasmus. *Am. J. Clin. Nutr.*, 21: 1285, 1968.
84. Muzzo, S., R. Egaña, and F. Beas. Consumo de O en mitocondrias de encéfalo total de ratas desnutridas marasmicas. Reunión Anual Sociedad Latinoamericana Investigaciones Pediátricas, Chile, 1969.
85. McKean, C. M., D. E. Boggs and N. A. Peterson. The influence of high phenylalanine and tyrosine on the concentrations of essential amino acids in brain. *J. Neurochem.*, 15: 235-241, 1968.
86. Adlard, B. P. F., J. Dobbing, and J. L. Smart. Undernutrition and the development of certain enzymes in rat brain. *Biochem. J.*, 119: 46, 1970.
87. Smart, S. L., and J. Dobbing. Vulnerability of developing brain. Relative effects of foetal and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Res.*, 33: 303-314, 1971.
88. Monckeberg, F., S. Tisler, S. Toro, V. Gattás and L. Vega. Malnutrition and mental development. *Am. J. Clin. Nutr.*, 25: 766-772, 1972.
89. Dickerson, J. W. T. and J. Dobbing. Prenatal and postnatal growth and development of the central nervous system of the pig. *Proc. Roy. Soc. B.*, 166: 384-395, 1967.
90. Scrimshaw, N. S. Malnutrition, learning and behaviour. *Am. J. Clin. Nutr.*, 20: 493-502, 1967.
91. Cragg, B. G. The development of cortical synapses during starvation in the rat. *Brain*, 95: 43-51, 1972.
92. Von der Decken, A. Evidence for regulation of protein synthesis at the translation level in response to dietary alterations. *J. Cell. Biol.*, 33: 657-663, 1967.
93. Von der Decken, A. Modification of the in vitro amino acid incorporation capacity of rat liver after in vivo and in vitro treatments. *Eur. J. Biochem.*, 1: 87-94, 1968.
94. Von der Decken, A. Regulation of the rate of amino acid incorporation into protein by rat liver cell sap components. *Exp. Cell. Res.*, 56: 309-318, 1969.

95. Von der Decken, A., and P. T. Omstedt. Protein feeding of rat after protein starvation. Incorporation of amino acid into polypeptide by skeletal muscle polyribosomes. *J. of Nutr.*, 100: 623-630, 1970.
96. Von der Decken, A. Activation in vitro of rat liver polyribosomes. *J. Cell. Biol.*, 43: 138-147, 1969.
97. Von der Decken and A. Wronski. Protein synthesis in vitro in rat brain after short-term protein starvation and refeeding. *J. Neurochem.*, 18: 2383-2388, 1971.
98. Sidransky, H., E. Verney, H. Shinozuka. Alterations in distribution of free and membrane bound ribosomes in the liver of rats force-fed a threonine-devoid diet. *Exp. Cell. Res.*, 54: 37-41, 1969.
99. Kumar, S. Isolation and characterization of low molecular weight 4-6S nuclear RNA in the developing rat brain and the effect of starvation. *Brain Res.*, 42: 455-464, 1972.
100. Von der Decken, A. and G. M. Anderson. Effect of protein intake on DNA dependent RNA polymerase activity and protein synthesis in vitro in rat liver and brain. *Nutr. Rep. Intern.*, 5: 413-419, 1972.
101. Hayashi, T. T. and D. Kazmierowski. Changes in the free and membrane bound ribosomes in the rat liver with starvation. *Biochemistry*, 11: 2371-2378, 1972.
102. Bolcsfoldi, G. and E. Eliasson. RNA metabolism during amino acid deprivation, synthesis of ribosomal and transfer RNA. *Biochim. Biophys. Acta.*, 272: 67-74, 1972.
103. Bourdon, R. H. Ribonucleic acid maturation in animal cells. *Ann. Rev. Biochem.*, 40: 33-73, 1971.
104. Martin, T. E. and B. J. McCarthy. Synthesis and turnover of RNA in the 30S nuclear ribonucleic protein complexes of mouse ascites cells. *Biochim Biophys. Acta.*, 277: 354-367, 1972.
105. Vaughan, M. H., R. Soeiro, J. R. Warner and J. E. Darnell. The effect of methionine deprivation on ribosome synthesis in He-1a cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 58: 1527-1534, 1967.
106. Socio, R., M. H. Vaughan, and J. E. Darnell. The effect of puromycin on intranuclear tepts in ribosomes biosynthesis. *J. Cell. Biol.*, 36: 91-101, 1968.
107. Willems, M., M. Penman, and S. Penman. The regulation of RNA synthesis and processing in the nucleus during inhibition of protein synthesis. *J. Cell. Biol.*, 41: 177-187, 1969.
108. Werner, J. R., M. Girard, H. Latham, and J. E. Darnell. Ribosome formation in He-1a cells in the absence of protein synthesis. *J. Mol. Biol.*, 19: 373-382, 1966.
109. Choe, B. K. and M. W. Taylor. Kinetics of synthesis and characterization of transfer RNA precursors in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, 272: 275-287, 1972.
110. Borek, E. and J. Chritman. A decrease in absorbancy in tRNA produced by enzymatic methylation. *Fed. Proc.*, 24: 292, 1965.
111. Shugart, L., B. H. Chastain, and M. Stulberg. Restoration of an aminoacylation activity of undermethylated transfer RNA by in vitro methylation. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 31: 404-416, 1968.

112. Bernhardt, D. and J. E. Darnell. tRNA synthesis in He-la cells. A precursor to tRNA and the effects of methionine starvation on tRNA synthesis. *J. Mol. Biol.*, 42: 43-56, 1969.
113. Allen, R. E., P. L. Raines, and D. M. Regen. Regulatory significance of transfer RNA charging levels. *Biochim. Biophys. Acta.*, 190: 323-336, 1969.
114. Yang, W. K., A. M. Hellman, D. H. Martin, K. R. Hellman, and G. D. Novelli. Isoaccepting transfer RNA's of L. M. in culture and after tumor induction in C3H mice. *Poc. Nat. Acad. Sci.*, 64: 1411-1418, 1969.
115. Gonano, F. V. P. Chiarugi, G. Pirro, and M. Marini. Transfer ribonucleic acid in rat liver and Morris 5123, minimal deviation hepatoma. *Biochem.*, 10: 900-913, 1971.
116. Johnson, T. C. Aminoacyl tRNA synthetase and tRNA binding activity during early mammalian brain development. *J. Neurochem.*, 16: 1125-1131, 1969.
117. Dellweg, H., R. Gerner and A. Wacker. Quantitative and qualitative changes in RNA of rat brain dependent on age training experiments. *J. Neurochem.*, 15: 1109-1119, 1968.
118. Bourdon, R. H. Methylation of nucleic acids in Kefs II Ascites tumour cells. *Nature*, 210: 797-799, 1966.
119. Mezei, G. and Y. W. Hu. The pattern methylation of RNA in peripheral nerve of the chick during development. *J. Neurochem.*, 19: 2071-2081, 1972.
120. Zimmerman, E. F. Secondary methylation of ribosomal ribonucleic acid in He-la cells. *Biochem.*, 7: 3156-3164, 1968.
121. Attardi, G. and F. Amaldi. Structure and synthesis of ribosomal RNA. *Ann. Rev. Biochem.*, 39: 183-226, 1970.
122. Wilson, S. H. and M. B. Hoagland. Physiology of rat liver polysomes, the stability of mRNA and ribosomes. *Biochem. J.*, 103: 556, 1967.
123. Munro, H. N. In "Mammalian protein metabolism". Munro, H. N. Ed. Vol. IV 1970, p. 3.
124. Kazazian, H. H. and H. A. Itano. Studies on the quantitative control of polypeptide synthesis in human reticulocytes. *J. Biol. Chem.*, 243: 2048-2055, 1968.