

AMINOACIDOS LIBRES EN LIQUIDO AMNIOTICO DE 50 GESTANTES A TERMINO

Dr. JACK HARRISON

Dr. RENE CERVANTES BEGAZO (*)

El principal aspecto bioquímico del crecimiento fetal será dado fundamentalmente por la síntesis de estructuras proteicas a partir de aminoácidos libres por vía de la circulación placentaria o por medio de la ingestión de líquido amniótico por el feto. Con el fin de aportar en este aspecto, el presente trabajo muestra los resultados obtenidos al determinar los aminoácidos libres en líquido amniótico de 50 gestantes de 39 a 41 semanas, obtenido por amniocentesis transvaginal en el momento del parto y utilizando la técnica de cromatografía de intercambio iónico habiéndose identificado 19 aminoácidos que mostraron marcadas variaciones entre los valores de cada muestra respecto al mismo aminoácido.

INTRODUCCION

El principal aspecto bioquímico del crecimiento fetal está dado fundamentalmente por la síntesis de estructuras y funciones proteínicas a partir de los aminoácidos libres por vía de la circulación placentaria o por medio de la ingestión de líquido amniótico por el feto, el conocimiento de los niveles de dichos aminoácidos podría por lo tanto permitir la identificación "in útero" de ciertos trastornos metabólicos o defectos en el transporte de aminoácidos con miras a establecer un diagnóstico y terapéutica antes del nacimiento.

Para la determinación de los niveles de aminoácidos libres en el líquido amniótico humano se ha empleado la cromatografía en papel y en el año 1969, Levy y Montag (18) utilizaron el método de cromatografía automatizada de intercambio iónico en columna. Determinaciones seriadas según las diferentes edades gestacionales, fueron realizadas por Kerr y Kennan en la mona rhesus en 1969.

El presente trabajo, tiene por finalidad establecer, usando el método de cromatografía de intercambio iónico en columna, los niveles y tipos de aminoácidos libres existentes en el líquido amniótico de gestantes humanas a término en trabajo de parto y clínicamente normales.

(*) Profesor Asociado del Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos de Lima, Perú. Director del Programa Materno del Instituto de Neonatología y Protección Materno Infantil, Lima - Perú.

MATERIAL Y METODOS

El líquido amniótico fue extraído mediante amniocentesis transvaginal en 50 gestantes a término y sin complicaciones internadas en el Departamento de Ginecología y Obstetricia del INPROMI y en el Servicio de Obstetricia del Hospital Obrero de Lima. Sólo se incluyeron gestaciones con una duración calculada de 39 a 41 semanas y que terminaron con el nacimiento de un solo niño normal, con un peso que fluctuó entre 2.700 a 3.400 gramos. Todas las muestras fueron liberadas de sangre y meconio, presentando un pH de 7.0 o mayor.

A. Extracción de líquido amniótico

Las muestras consistentes en 5 cc. de líquido amniótico por paciente fueron extraídas por punción transvaginal a través de espéculo, transferidas a frascos estériles y llevados a refrigeración hasta congelación. Dentro de los 5 días posteriores a su obtención, cada muestra fue deshelada y filtrada a través de papel filtro Waltman N° 1. Luego se procedió a la desproteínización con ácido sulfosalicílico y centrifugación a 2.000 rpm por 20 min. usándose una parte del sobrenadante para la cromatografía de intercambio iónico.

B. Cromatografía en columna

Para la extracción de los aminoácidos libres del líquido amniótico, se usó el método cromatográfico en columna, utilizándose como muestra líquido amniótico previamente tratado con 25 mgrs. de ácido sulfosalicílico para 2 cc. de líquido, siendo centrifugados a 2.000 rpm durante 20 minutos.

De la muestra de líquido amniótico centrifugado, se utilizó 1 cc., cuyos aminoácidos fueron fijados por resina tratada, liberándolos posteriormente mediante el uso de HCl al 5%, evaporación, adición de agua destilada y disolución del residuo final en 5 cc. de alcohol isopropílico al 10%, quedando los aminoácidos libres para los ensayos cromatográficos posteriores.

C. Cromatografía en capa fina

Para la determinación cualitativa de los aminoácidos libres separados en la columna, se utilizó el método cromatográfico bidimensional en capa fina según fanderath (1966).

D. Cuantificación de los aminoácidos

Los aminoácidos fueron evaluados cuantitativamente frente a sus respectivos standards, en un Densitómetro Photovolt 520, de acuerdo a su densidad óptica, al ser separados mediante cromatografía unidimensional (ascendente) en pliegos de papel Woltman N° 1.

E. Procedimiento

El procesamiento de las muestras se realizó en el Instituto de Bromatología y Nutrición de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

De las 50 muestras de líquido amniótico, 10 de ellas fueron procesadas en forma individual, las 40 restantes se hicieron en pools constituidos por 10 y 20 muestras respectivamente.

Los pools se obtuvieron con la extracción de 2 ml. de líquido amniótico de cada una de las muestras, las cuales fueron colocadas en un recipiente apar-

te y estéril, del cual se tomaron 2 ml. siendo procesados como si tratara de una sola muestra, tanto para la separación de los aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico en columna, como para sus determinaciones cualitativas y cuantitativas en capa fina y en papel respectivamente.

Las 10 muestras trabajadas individualmente fueron numeradas consecutivamente del 1 al 10. Al primer pool de 10, se le denominó con la letra "A", al segundo, también de 10 con la letra "B" y al tercero de 20 muestras, con la letra "C".

Luego de procesadas las 10 muestras individuales se pudo comprobar la enorme variación en cuanto a la cantidad de un aminoácido determinado en cada una de las muestras, no existiendo un molde cuantitativo aparente, ni aumento proporcional en la concentración de estos aminoácidos libres específicos, lo cual coincide con los resultados de otros investigadores (29), (18).

Esto nos hizo considerar la conveniencia de la realización de pools con las otras muestras, obteniendo de esta manera un índice promedio que pudiera utilizarse como base de comparación.

En lo referente a los aminoácidos, leucina e isoleucina debido a la dificultad de su cuantificación con el solvente empleado para los demás aminoácidos, se utilizó uno especial que consta de: Etil-metil-Ketona, Piridina, agua y ácido acético glacial en las proporciones de 70: 15: 15: 2v/v, siguiéndose posteriormente las mismas etapas que se usaron para la determinación de los otros aminoácidos. Los standards de estos dos aminoácidos fueron aplicados

separadamente y determinados en igual forma en cada una de las muestras.

RESULTADOS

La figura N° 1 muestra un cromatograma bidimensional en capa fina, señalando los 19 aminoácidos libres presentes en el líquido amniótico que nos fue posible detectar.

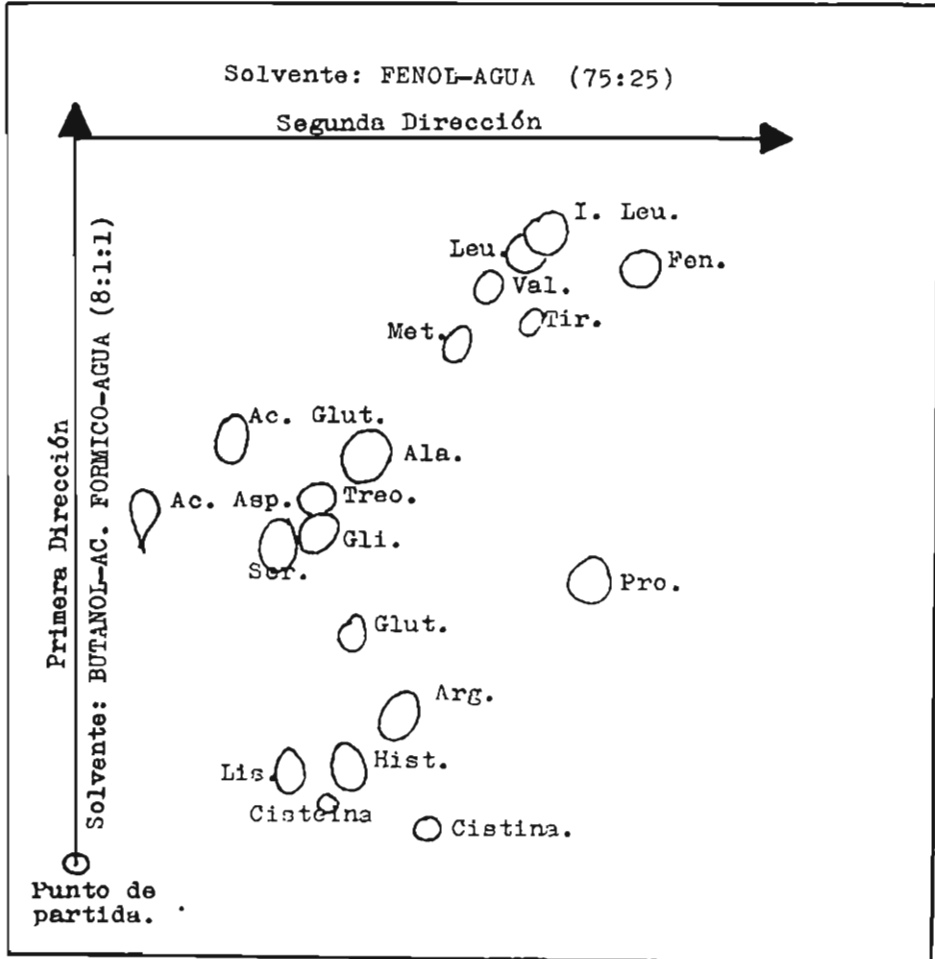
La figura N° 2, representa un cromatograma en el cual se ha usado la técnica unidimensional (ascendente) en papel Whatman N° 1, que ilustra acerca de la forma como se hicieron las determinaciones cuantitativas con ayuda del densitómetro.

La Tabla N° 1, presenta los valores cuantitativos de cada uno de los aminoácidos encontrados en las 10 muestras individuales, su promedio y rangos; pudiendo observarse las variaciones tan marcadas que existen entre los valores de cada muestra respecto del mismo aminoácido y como esta variación se hace algo más discreta al considerar los valores del promedio de las 10 muestras individuales y cada pool, lo que puede apreciarse más claramente en la Tabla N° 2. Se puede observar así mismo que los valores que alcanzaron los niveles más altos corresponden a los siguientes aminoácidos: Alanina, Serina, Treonina y Lisina.

Por otro lado, aquellos que presentaron las cantidades más pequeñas son: Tirosina, Acido Aspártico y Arginina. Además en algunas de las muestras no fue posible determinar ciertos aminoácidos, debido a que no presentaron un rango de 0.09 o mayor al ser medidos al densitómetro.

FIGURA Nº 1

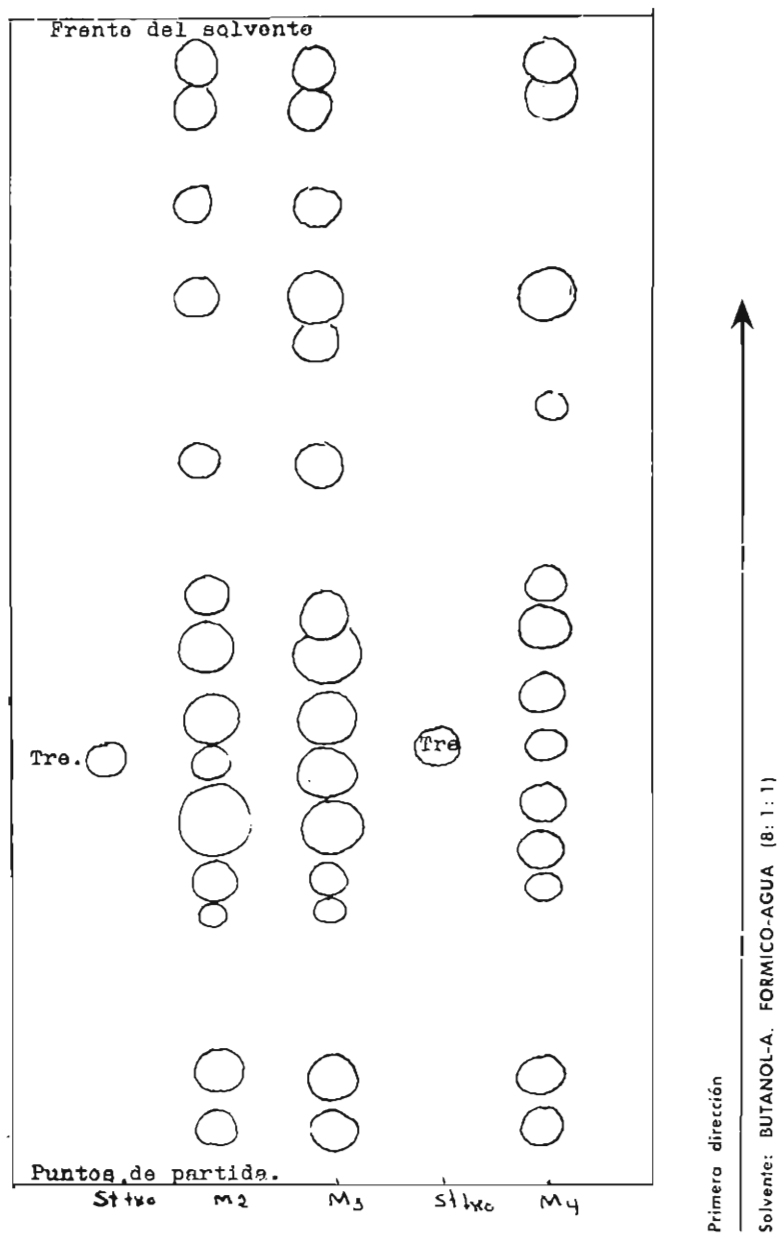
CROMATOPLACA BIDIMENSIONAL QUE MUESTRA LOS 19 AMINOACIDOS ENCONTRADOS



REVELADOR: Ninhidrina en etanol al 2.5%.

FIGURA N° 2

CROMATOGRAMA EN PAPEL, UNIDIMENSIONAL PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE AMINOACIDOS



REACTIVO REVELADOR: Ninhidrina en etanol (2.5 mg%)

TABLA N° 1

VALOR CUANTITATIVO, RANGOS Y PROMEDIO DE LOS 19 AMINOACIDOS EN LAS 10 MUESTRAS INDIVIDUALES, EXPRESADOS EN ug/bowl

Aminoácidos	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	Rangos	Prom.
Alanina	.80	.65	.40	.25	.30	.32	.28	.32	.40	.51	.25 .80	.42
Arginina	.28	.40	.15	.25	.18	.27	.14	.12	.17	.20	.12 .40	.21
Ac. Aspártico	.30	.12	ND	.11	ND	.15	.14	.32	ND	.13	ND .30	.18
Ac. Glutámico	.60	.56	.28	.30	.28	.20	.28	.31	.30	.15	.15 .60	.32
Cisteína	.28	.11	.18	.21	.15	.23	.14	.30	.10	.27	.10 .30	.19
Cistina	.58	.60	.20	.62	.24	.30	.20	.30	.40	.21	.20 .60	.36
Fenilalanina	.40	.43	.15	.38	.26	.27	.14	.28	.26	ND	ND .43	.28
Glicina	.70	.45	.30	.28	.41	.50	.21	.25	.28	.31	.21 .70	.36
Glutamina	.32	.70	.41	.51	.25	.19	.22	.40	.30	.42	.19 .70	.37
Histidina	.42	.40	.34	.40	.48	.28	.10	.24	.20	.30	.10 .42	.31
Isoleucina	.32	.45	.38	.42	.15	.12	.12	.14	.18	.20	.12 .45	.24
Leucina	.38	.40	.41	.40	ND	.15	ND	.12	ND	ND	ND .40	.31
Lisina	.56	.28	.70	.68	.20	.30	.22	.25	.44	ND	ND .70	.40
Metionina	.28	.32	.19	.21	.17	.18	.16	.22	.21	.18	.17 .32	.21
Prolina	.28	.35	.27	.51	.25	.32	.60	.16	.28	.15	.15 .60	.31
Serina	.76	.70	.64	.76	.36	.64	.34	.50	.60	.32	.32 .76	.56
Tirosina	ND	.15	ND	.10	ND	ND	.11	.09	ND	.10	ND .15	.10
Treonina	.64	.74	.60	.54	.44	.32	.25	.45	.40	.30	.25 .74	.46
Valina	.15	.30	.12	.21	.35	.15	.17	.20	.11	.12	.11 .35	.19

ND: Cantidad no determinable.

TABLA N° 2

VALORES PROMEDIO FINALES DE LOS 19 AMINOACIDOS EN LAS 50 MUESTRAS, OBTENIDO DE LOS POOLS Y EL PROMEDIO DE LAS 10 MUESTRAS INDIVIDUALES

Aminoácidos	Pool A-10	Pool B-10	Pool C-20	Prom. 10 M.	Prom. Final
Alanina	0.53	0.48	0.43	0.42	0.46
Arginina	0.15	0.10	0.11	0.21	0.13
Ac. Aspártico	0.11	0.12	0.10	0.18	0.12
Ac. Glutámico	0.36	0.29	0.31	0.32	0.30
Cisteína	0.21	0.17	0.18	0.19	0.18
Cistina	0.36	0.38	0.34	0.36	0.36
Fenilalanina	0.24	0.18	0.22	0.28	0.22
Glicina	0.29	0.31	0.32	0.36	0.32
Glutamina	0.29	0.32	0.30	0.37	0.31
Histidina	0.28	0.23	0.20	0.31	0.24
Isoleucina	0.21	0.22	0.18	0.24	0.20
Leucina	0.25	0.29	0.23	0.31	0.26
Lisina	0.36	0.42	0.38	0.40	0.38
Metionina	0.16	0.20	0.18	0.21	0.18
Prolina	0.17	0.20	0.19	0.31	0.21
Serina	0.50	0.46	0.40	0.56	0.44
Tirosina	0.11	0.10	0.10	0.11	0.10
Treonina	0.46	0.42	0.40	0.46	0.43
Valina	0.19	0.17	0.20	0.19	0.18

La Gráfica N° 1, presenta los valores promedio finales de cada uno de los aminoácidos.

Cabe también mencionar que los aminoácidos que mostraron las más amplias variaciones fueron: Alanina y Glutamina y las menores: Metionina y Tirosina como puede apreciarse en la Tabla N° 1.

La Tabla N° 3, representa la abundancia comparativa de aminoácidos en el líquido amniótico de un estimado de 4 trabajos semicuantitativos.

COMENTARIO

Las informaciones más útiles acerca de los diversos fenómenos que pueden afectar al feto desde la gestación temprana hasta el comienzo del trabajo de

parto, se logran actualmente gracias a los estudios bioquímicos, farmacológicos, citogenéticos, citomorfológicos e inmunológicos que pueden realizarse en el líquido amniótico, dichos estudios en lo que a la determinación cualitativa y cuantitativa de los aminoácidos libres se refiere, pueden realizarse en cualquier laboratorio de regular montaje sin necesidad del "Amino Analizer", instrumento automatizado de columna, muy costoso, siempre que se tenga cuidado en minimizar los errores subjetivos y de manipulación.

Los hallazgos informados en el presente trabajo difieren de los encontrados por otros autores tanto en lo referente a los aminoácidos hallados, así como en lo concerniente a los valores más altos y bajos, concordando en la mar-

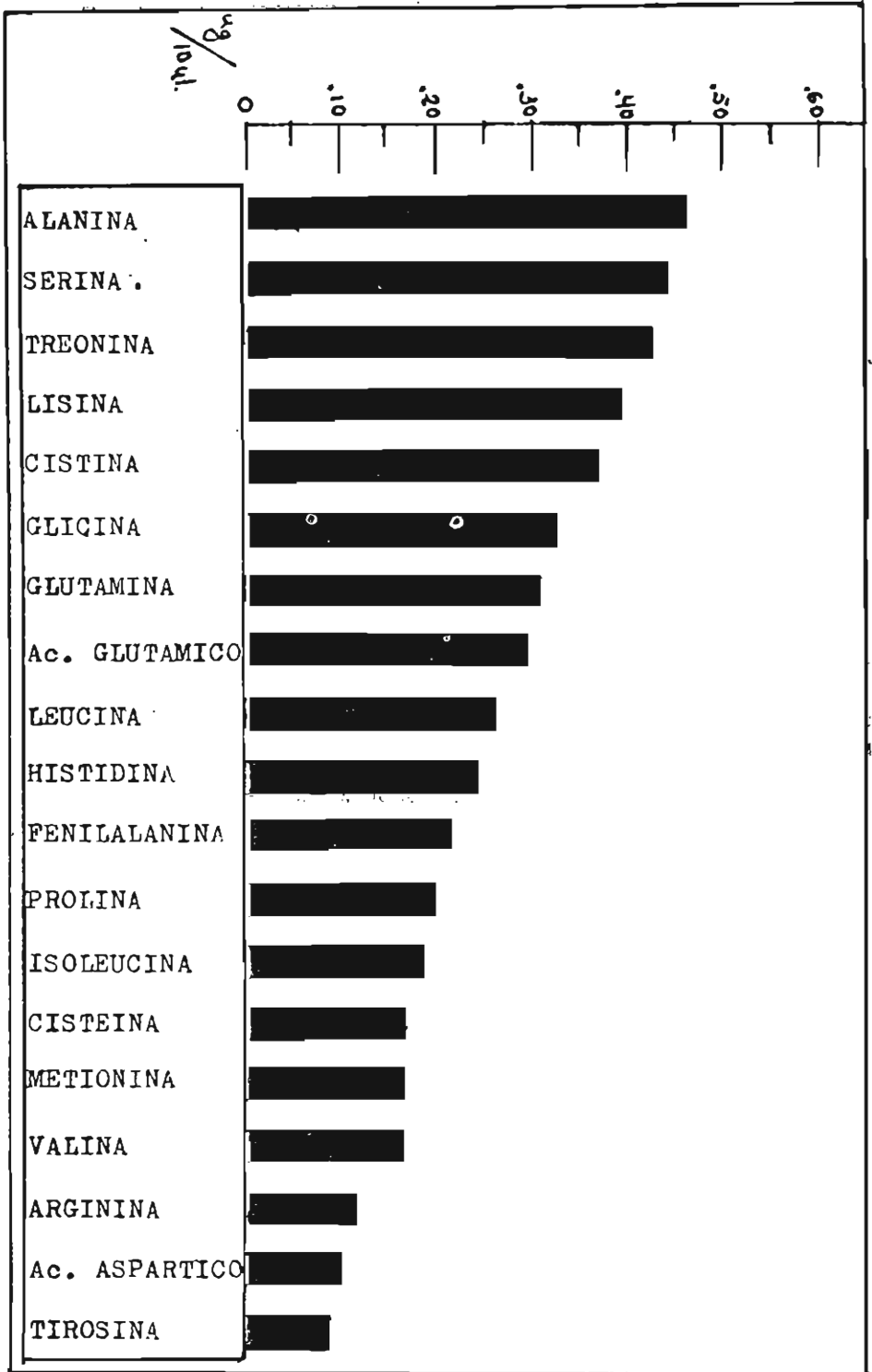
TABLA N° 3

ABUNDANCIA COMPARATIVA, SEMICUANTITATIVA DE LOS AMINOACIDOS EN EL LIQUIDO AMNIOTICO

Aminoácidos	Abundancia comparativa (*)
Alanina	+++
Arginina	+
Ac. Aspártico	++
Ac. Glutámico	+++
Cisteína	±
Cistina	+
Fenilalanina	+
Glicina	+++
Glutamina	++
Histidina	+++
Isoleucina	+
Leucina	++
Lisina	+++
Metionina	+
Prolina	++
Serina	++
Tirosina	+
Treonina	++
Valina	++

(*) Estimado de 4 trabajos.

GRAFICA Nº 1
VALORES PROMEDIO FINALES DE LOS 19 AMINOACIDOS EN LAS 50 MUESTRAS



cada variación para un solo aminoácido en las diferentes muestras.

Wirtschafter (29) y Palliez y col. (18) estudiando líquido amniótico de gestantes a término, encontraron 16 y 19 aminoácidos respectivamente, algunos de los cuales no fueron encontrados por nosotros y viceversa. Levy y Montag (18) en cambio, en 16 gestantes a término, encontraron 23 aminoácidos libres, 4 más de los reportados por nosotros: la taurina, citrulina, ornitina y ácido-A-aminobutírico.

Desde el punto de vista cuantitativo hay variación en la literatura en cuanto al tipo de aminoácidos que se encontraron en mayores concentraciones (29), (18). Levy y Montag (18) determinaron entre los títulos más altos a la glutamina, seguida por la alanina y la glicina; y entre los títulos de más bajo valor al ácido-A-aminobutírico, citrulina y metionina. En nuestra serie las mayores concentraciones correspondieron a la alanina, serina, treonina y ácido glutámico y las menores a la tirosina, ácido aspártico y arginina.

En relación a la importancia de los aminoácidos libres del líquido amniótico en la nutrición fetal, Levy y Montag (18) refieren que los aminoácidos hallados en el líquido amniótico, son los mismos que los encontrados en la sangre materna, concluyendo en sus comparaciones cuantitativas, que los aminoácidos del líquido amniótico son derivados de por lo menos 3 fuentes: sangre materna, sangre fetal y orina fetal, agregando como otras fuentes a la membrana amniótica, vermex caseosa y piel fetal. Wirtschafter (29) concluye que la concentración de amino-

ácidos libres en el suero del cordón umbilical humano en el momento del parto es, en todos los casos examinados, mayor que en el suero materno y líquido amniótico. Por otro lado, si según Curet (6), la disponibilidad de aminoácidos por el feto tiene gran importancia para la nutrición y crecimiento del mismo, ya que en la mayor parte de los mamíferos el peso fetal o de la camada es modificado de manera notable por la desnutrición materna, es dable suponer que en gestantes con dietas deficitarias y mal balanceadas, como las pertenecientes al grupo estudiado por nosotros en el Perú, los niveles de aminoácidos libres en el líquido amniótico en comparación con los hallados por otros autores en gestantes por lo común con alimentación bien balanceada, serían de valor menor. Sin embargo, ni aún para los aminoácidos esenciales no nos ha sido posible confirmar categóricamente este postulado, dadas las diferencias en los valores para un mismo aminoácido. Curet (6) explica que el efecto de la desnutrición materna en los primates incluido el ser humano, es menos intenso, dependiendo del crecimiento comparativamente lento del feto, y el peso más bajo en relación a la madre.

Winick (28) a su vez informa que únicamente la duración de la desnutrición y la gravedad de la misma durante el período incipiente crítico, retardan el crecimiento placentario y fetal.

A todo lo anteriormente expuesto debemos agregar el problema del trastorno primario de la función placentaria. Curet (6) al respecto refiere que es muy probable que la fuente principal de proteínas fetales sean los aminoáci-

dos libres maternos y que son transportados en forma activa a través de la placenta, contra una gradiente de concentración. El mecanismo de transporte agrega Curet entrañaría 3 etapas que al parecer según lo conocido, podrían depender de un adecuado balance entre el estrógeno y la progesterona, dados los efectos de estas hormonas sobre la concentración materna y captación uterina de aminoácidos.

Kerr y Kennan (16) trabajando en la mona Rhesus a diferentes edades gestacionales encontraron una disminución secuencial y progresiva de los valores de los 19 aminoácidos que les fue posible determinar, con excepción de la taurina, sugiriendo que cuando el líquido amniótico es deglutido por el feto, el descenso de la concentración de los aminoácidos pudiera depender de la absorción de los mismos por el intestino fetal.

En confirmación del anterior postulado Manzanilla y colaboradores (28), detectaron albúmina marcada con ^{131}I en la sangre, tiroides y orina de 2 neonatos a cuyas madres se inyectó dicha sustancia en la cavidad amniótica 20 hrs. antes del parto, abriendo camino a cierto tipo de terapéutica intraamniótica antenatal.

Somos conscientes de la necesidad de estudios simultáneos en suero materno y fetal para ahondar en el mecanismo de transferencia placentaria de los aminoácidos y el rol e implicancias de las determinaciones del líquido amniótico en la nutrición fetal.

CONCLUSIONES

La determinación de aminoácidos libres en líquido amniótico humano de 50

gestantes entre las 31 y 41 semanas gestacionales, obtenido por punción amniótica transvaginal en el momento del parto y utilizando la técnica de cromatografía de intercambio iónico, permitió obtener las siguientes conclusiones:

1. Se identificaron 19 aminoácidos libres.
2. Se observaron marcadas variaciones entre los valores de cada muestra respecto al mismo aminoácido, lo cual concuerda con la literatura.
3. Los valores que alcanzaron el nivel más alto correspondieron a los siguientes aminoácidos: Alanina, serina, treonina y lisina. Los niveles más bajos fueron encontrados en los aminoácidos siguientes: Tirosina, ácido aspártico y arginina.
4. La técnica y hallazgos descritos, abren camino para identificación antenatal de ciertos trastornos metabólicos y su tratamiento en nuestro medio.
5. Se necesita estudios simultáneos en suero fetal y materno para confirmar los hallazgos de la literatura en relación al mecanismo de transferencia placentaria de los aminoácidos y sus implicancias en la nutrición fetal.

Mi sincero agradecimiento al Instituto de Bromatología y Nutrición de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en las personas del Doctor Carlos A. Payva C. y de la Doctora Virginia Garro C. por la ayuda prestada en la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Asencio, S., Pelegrina, I.: Amniocentesis Transabdominal, Boletín de la Asoc. Médica de Puerto Rico. 60: 6, 1968.
- 2) Bernstine, R.: Fisiología del Aparato Urinario Fetal. Clínicas Obstétricas y Ginecológicas. Sept. 652, 1970.
- 3) Bonsnes, R.: Composición del Líquido Amniótico. Clínicas Obstétricas y Ginecológicas. Junio 440, 1966.
- 4) Chromatography, E. Merck AG. Darmstadt Germany. 47-51, 1964.
- 5) Crystle D., Rigsby, W.: Amniocentesis: Experiencia y Complicaciones. American Journal of Obstetrics & Gynecology. 106: 310, 1970.
- 6) Curet, L.: Aspectos Fisiológicos del Transporte de Aminoácidos a través de la placenta. Clínicas obstétricas y ginecológicas. Set. 586, 1970.
- 7) Dancis, J., Money W., Springer, D. y Montimer L.: Transporte de Aminoácidos por la Placenta. American Journal of Obstetrics & Gynecology. 110: 432.
- 8) Dowex: Ion Exchange. The Dow Chemical Company, 1964.
- 9) Fort, A.: Intrusión prenatal en el Amnio. American Journal of Obstetrics & Gynecology. 110: 432, 1971.
- 10) Galask, R. y Snyder, I.: Factores Antimicrobianos en el líquido amniótico. American Journal of Obstetrics & Gynecology. 106: 59, 1970.
- 11) Garro Cáceres V.: Nuevo sistema de solvente para cromatografía de Aminoácidos y partición cuantitativa de: L-Metionina y L-Valina. Tesis Doctoral en Farmacia y Bioquímica, U.N.M.S.M. 1971.
- 12) Gluck, L.: Diagnóstico del síndrome de insuficiencia respiratoria por amniocentesis. American Journal of Obst. & Gynec. 109: 440, 1971.
- 13) Howorth, S., Millic, A., y Adamsons K.: Indices bioquímicos del estado fetal. Clínicas Obstétricas y Ginecológicas. 105: 216, 1969.
- 14) Horowitz, R.: Glicoproteínas y otros protidos séricos maternos. American Journal of Obst. & Gynec. 105: 216, 1969.
- 15) Journal of Chromatography. Vol. 11, Nº 1, Mayo 1963.
- 16) Kerr, G. y Kennan, A.: Aminoácidos libres en líquido amniótico durante la gestación del mono Rhesus. American Journal Obst. & Gynecolog. 105: 363, 1969.
- 17) Lesinski, J. Jayszak, S., Benin K. y Jonczarski, I.: Concentración de aminoácidos libres en líquido blastocístico de conejo. American Journal of Obst. & Gynecolog. 99: 280, 1967.
- 18) Levy, H. L. y Montag, P. P.: Aminoácidos libres en líquido amniótico estudio cuantitativo por intercambio iónico. Pediat. Research. 3: 113, marzo 1969.
- 19) Lorincz, A. y Kuttner R.: Estudio comparativo de los aminoácidos libres en tejidos reproductivos femeninos. Amer. Journal of Obst. & Gynec. 101: 462, 1968.
- 20) Lorincz A., Kuttner R.: Aminoácidos libres en el útero gestante. American Journal of Obst. & Gynecol. 105: 925, 1969.
- 21) Nelson G.: Patrones de fosfolípidos en líquido amniótico de gestantes normales y anormales. American Journal of Obst. & Gynecol. 105: 1072, 1959.
- 22) Parmley T. y Miller E.: Madurez fetal y análisis del líquido amniótico. American Journal of Obst. & Gynecol. 105: 354, 1969.
- 23) Pataki, G.: Técnicas cromatográficas en capa fina para aminoácidos y péptidos. Ann. Arbor. London. 2ª Edic. Págs. 169-81, 1969.
- 24) Pearse, W. y Sornson, H.: Aminoácidos libres en placenta humana normal y anormal. American Journal of Obst. & Gynec. 105: 696, 1969.
- 25) Plentl, A.: Formación y circulación del líquido amniótico. Clínicas Obstét. y Ginecológ. Junio 427, 1966.
- 26) Schulman H.: Líquido amniótico. Clínicas Obstét. y Ginecológ. Sept. 543, 1970.
- 27) Wheaton, R. M. y Seanster A. H.: A basic reference on ion exchange. Enciclopedia of chemical technology. 2ª Edic. Vol. 11, pág. 871-899, 1966.
- 28) Winick M.: Desnutrición fetal. Clínicas obstétricas y ginecológicas Sept. 526, 1970.
- 29) Wirt Schafter Z. T.: Aminoácidos libres en líquido amniótico humano suero fetal y materno. American Journal of Obst. & Gynec. 76: 1219, 1958.
- 30) Woolf, L. J., Ounsted, C., Lee D., Humphrey, M., Cheshire N. M. y Steed, G. R.: Atypical phenilketonuria in sisters with normal offspring. Lancet ii: 464, 1961.