

## FUNCIÓN Y MECANISMO DE LA LEPTINA EN LOS RUMIANTES FUNCTION AND MECHANISM OF LEPTIN IN RUMINANTS

<sup>4</sup>Esperanza Herrera Torres, Manuel Murillo Ortiz

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Juárez del Estado de Durango.

### RESUMEN

El objetivo de esta esta revisión es conocer los mecanismos de acción de la leptina en los rumiantes, ya que es una hormona que permite determinar de manera adecuada el estado nutricional del ganado. La leptina es una proteína plasmática formada por 167 aminoácidos y se sintetiza en el tejido adiposo; ésta proporciona información acerca de las reservas de grasa del animal, actúa como un regulador eferente del apetito, de la expedición de energía y de la función reproductiva. Además, la leptina se correlaciona positivamente con el incremento de la masa corporal y afecta la función y la presencia de otras hormonas como son la insulina y la hormona de crecimiento. Estos compuestos, en conjunto, reflejan el suministro adecuado de nutrientes con relación al empleo de los mismos; de tal manera que la determinación de la concentración de la leptina, permitiría determinar el estado nutricional del ganado en forma precisa.

**Palabras clave:** leptina, hormona, rumiantes.

### ABSTRACT

The objective of this research is to understand the mechanisms of leptin action in ruminants, since it is a hormone that allows determining properly the nutritional status of cattle. Leptin is a plasma protein formed by 167 amino acids and it is synthesized in adipose tissue; it provides information about the animal's reserves of fat, acts as an efferent regulator of appetite, energy output, and the reproductive function. In addition leptin was positively correlated with the increase in body mass and affects the function and presence of other hormones such as insulin and growth hormone. These compounds collectively, reflect the adequate supply of nutrients with respect to their utilization; so, determining the concentration of leptin would determine the nutritional status of livestock accurately.

**Keywords:** leptin, hormone, ruminants.

---

<sup>4</sup>Esperanza Herrera Torres. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Juárez del Estado de Durango. Carretera al Mezquital km 11. Durango, Dgo. México. [heto99@yahoo.com.mx](mailto:heto99@yahoo.com.mx).

Recibido: 05/02/2012 Aceptado: 20/04/2012

## INTRODUCCIÓN

En los rumiantes, la eficiencia alimenticia está relacionada con factores nutricionales, ambientales, genéticos y con el estado fisiológico del animal. El animal que experimenta algún déficit nutricional, se moviliza para buscar alimentos que satisfagan sus necesidades y los consume hasta saciarse; de tal manera que el estado nutricional de un animal puede afectar la función de diversos sistemas, incluyendo la capacidad del animal para reproducirse, crecer y resistir infecciones (Araujo-Febres, 2005). El conocimiento de factores y mecanismos que regulan a corto plazo, (cantidad consumida) y a largo plazo, (grasa corporal); el apetito y el consumo de los alimentos, (Reynolds y Benson, 2004) es importante para diseñar programas de suplementación alimenticia para rumiantes en pastoreo (Thomas *et al.*, 2002).

El consumo de alimentos está controlado por mecanismos fisiológicos, que conducen al animal a iniciar y finalizar el consumo en un momento dado; éste es un aspecto multifactorial controlado por el hipotálamo (Keisler *et al.*, 1999) y debe corresponder al estado fisiológico en el que el animal se encuentre. Una estrategia para determinar el estado nutricional del ganado de forma precisa, es mediante la determinación de concentraciones de metabolitos séricos y hormonas. Estos compuestos representan un índice adecuado del suministro de nutrientes con relación al empleo de los mismos (Lentz *et al.*, 2005).

Una de las hormonas que ayuda a establecer el estado nutricional en los rumiantes es la leptina; esta hormona es una proteína producida por el tejido adiposo, la cual regula el consumo del alimento, e interviene en el metabolismo energético (Lentz *et al.*, 2005); afecta la actividad inmune y la presencia de otras hormonas (Ahima *et al.*, 1996); por lo que el objetivo de esta revisión, es conocer los mecanismos de acción de la leptina en los rumiantes.

## LEPTINA

La leptina, es una proteína plasmática formada por 167 aminoácidos, con un peso molecular de 16 KD y que se transcribe a partir del gen **ob**. El nombre de leptina deriva del griego **leptos** (delgado) (Zhang *et al.*, 1994). La leptina es sintetizada y secretada por el tejido adiposo (Delavaud *et al.*, 2002); se relaciona con el control hipotalámico de la homeostasis del cuerpo, como una señal aferente acerca de las reservas de grasa del cuerpo y como un regulador eferente del apetito y de la expedición de energía. Algunos estudios indican que la leptina está implicada en la regulación metabólica a través de su acción; tanto en el eje hipotálamo-pituitario-adrenalina, como en la función reproductiva (Keisler *et al.*, 1999).

Desde el descubrimiento de la leptina, se han realizado numerosos estudios a nivel biológico genético; aunque inicialmente se ha descrito como un factor de señal, que

desde los adipositos, induce una respuesta para controlar la ganancia de peso y el gasto energético; otros estudios demuestran que también puede tener un papel importante como señal en el sistema neuroendócrino y en la reproducción (Lentz et al., 2005).

Considine *et al.*, (1995) analizaron la expresión del gen de leptina en el tejido subcutáneo abdominal en humanos, y encontraron una correlación positiva entre leptina e índice de masa corporal; esto es uno de los principales índices que permiten conocer el estado nutricional de los rumiantes. Se ha sugerido que la cantidad liberada por cada adiposito, dependerá más del flujo de nutrientes que penetran y salen de esta célula, que del tamaño de la misma (Houseknecht y portocarrero, 1998). La leptina se libera a la circulación sanguínea unida a proteínas que regulan su metabolismo, la biodisponibilidad y la respuesta de los tejidos a la hormona. Existe una unión de leptina a macromoléculas, y es una unión específica y reversible y es la manera en que ésta puede transportarse por el torrente sanguíneo (Lentz *et al.*, 2005).

### RECEPTORES DE LEPTINA

Se han encontrado dos formas de receptores de la leptina, uno largo (OB-R1) y otro corto (OB-Rs). La forma larga se ha encontrado en varias regiones del cerebro y la forma corta en los demás tejidos (adiposos, placenta, gástrico, etc.). El OB-R1 se expresa en el hipotálamo (arcuato, lateral, ventromedial, y núcleo dorsomedial) de forma aumentada, y es la responsable de la transducción de la señal por su dominio intracelular; mientras que la OB-Rs, es la responsable del transporte de la leptina a través de los plexos coroideos. La estructura de la OB-R es homóloga al receptor gp130, receptor que traduce la señal y que forma parte de la familia de las citocininas interleukina 6; pero que actúan con mecanismos diferentes (Hossner, 1988). Se ha propuesto que algunas de las formas de los receptores, están involucradas en el transporte de la leptina en la sangre y su cruce; a través de la barrera de la sangre-cerebro (Houseknecht *et al.*, 1998).

### REGULACIÓN DEL GEN DE LA LEPTINA

Las alteraciones coordinadas en la expresión del gen de la leptina con los cambios del estado metabólico, sugieren un control hormonal y metabólico de la expresión de la leptina; un primer candidato para la regulación es la insulina; la cual juega un papel crónico (horas) en la regulación de los niveles de leptina. La hiperinsulinemia incrementa los niveles de leptina (Houseknecht *et al.*, 1998). Los glucocorticoides son también potentes reguladores de la expresión de la leptina. La administración *in vivo* y la incubación *in vitro* de los adipositos con varios glucocorticoides, causan una alza en la regulación de la expresión de la leptina.

La expresión de la leptina y la secreción de los adipositos, están reguladas por una estimulación adrenérgica, como lo indican estudios que han usado  $\beta_3$ -antagonistas adrenérgicos, expuestos en frío, o el dibutilil c-AMP (dbcAMP(L1)) (Houseknecht *et al.*, 1998). La leptina actúa también como regulador de la secreción de la hormona de crecimiento (Carro *et al.*, 1997); sin embargo, la incubación crónica de adipositos aislados con la hormona de crecimiento temprana o IGF-I, no tiene efecto en la expresión y secreción de leptina (Hardie *et al.*, 1996).

### LEPTINA COMO REGULADOR DEL CONSUMO

Los mecanismos por los cuales se regula el consumo de los alimentos, no están bien definidos. Un grupo de péptidos que se encuentran en el tracto gastrointestinal, son utilizados para suprimir el consumo; uno de ellos es la colecistoquinina (CCK), que es secretada en el duodeno, tras la ingesta de los alimentos; a la cual se le atribuye el control del consumo ejercido a corto plazo, a través de los receptores. Otro péptido relacionado con el consumo es la leptina circulante, la cual provoca una sensación de saciedad, pero a largo plazo. La secreción de leptina gástrica es estimulada por un aumento en la CCK, estimulada por la alimentación; esto acredita la existencia de una relación sinérgica entre la leptina y la CCK, dando como resultado un control del consumo a corto plazo (Sansinacea *et al.*, 2001). Estos mismos autores encontraron que un nivel medio de leptina, durante 60 días de alimentación, no varía entre animales que ganan 0.27; 0.31 y 0.80 kg/animal/día.

Algunos estudios en rumiantes han demostrado que la CCK suprime el consumo; así como también el consumo de los nutrientes causan una alteración en la concentración de leptina en plasma en el ganado, (Ciccioli *et al.*, 2003), la secreción de leptina estimula la hormona leutinizante en vacas de carne desnutridas (Zieba *et al.*, 2003). Lentz *et al.*, 2005; encontraron que la concentración de leptina en el plasma de vacas de carne es un indicador del consumo de nutrientes, pero que no está altamente correlacionada con la condición corporal.

En rumiantes bien alimentados, la administración central de leptina reduce el consumo de alimentos (Morrison *et al.*, 2001); la leptina también regula el nivel de consumo de energía en las vacas; estos resultados fueron obtenidos utilizando el kit comercial RIA (Chilliard *et al.*, 1998), y una reducción en la concentración de leptina mRNA en el tejido adiposo subcutáneo, después de las 48 h de alimentación en ganado adulto (Tsuchiya *et al.*, 1998). De manera similar, se ha encontrado que una restricción en el consumo, reduce tanto la leptina mRNA en el tejido adiposo y los niveles de leptina en plasma en vaquillas (Amstalden *et al.*, 2000). Los receptores de leptina mRNA, fueron detectados en dos de los cuatro compartimentos gástricos. La ausencia de expresión de la leptina en el rumen, retículo, omaso y abomaso; parece estar relacionada con la flora ruminal.

En los ruminantes lactantes el mRNA de leptina y sus receptores, están presentes en el sistema gástrico, y entonces la leptina puede ejercer control sobre el consumo. La regulación con el término medio (día por día) de la leptina con niveles de alimentación, no son modulados por la concentración de glucosa e insulina; aunque con el término corto (hora por hora), la respuesta de la leptina al consumo podría ser mediada por la glucosa y/o cuerpos cetónicos (Lentz, *et al.*, 2005). Además se ha observado que tras 24 horas de ayuno, la leptina libre disminuye. De aquí surge la hipótesis de que la leptina libre es la forma biológicamente activa, y de esta forma se reduce el efecto de inhibición del apetito (Araujo-Febres., 2005).

El neuropéptido Y (NPY) es un potente estimulador del consumo, inhibiendo la termogénesis e incrementado las concentraciones de insulina y glucocorticoides en el plasma (Houseknecht y Portocarreo, 1998). La leptina actúa a nivel central inhibiendo los efectos del NPY, aparentemente por la inhibición de su síntesis en el núcleo arcuato del hipotálamo (Houseknecht *et al.*, 1998), pero estos efectos no están bien definidos porque otros neuropéptidos hipotalámicos, están involucrados en la regulación del consumo (Sansinanea, 2001). El aumento en el consumo de alimentos al final de la gestación y durante la lactación, está asociado a un balance negativo de energía; esto verifica la reducción del tejido adiposo y la disminución de la expresión de los receptores de mRNA de leptina, así como una reducción de la concentración de leptina en plasma (Sorensen *et al.*, 2002).

### **FUNCIÓN DE LA LEPTINA COMO REGULADOR DEL BALANCE DE LA ENERGÍA**

La expresión de la leptina en animales bien alimentados se refleja en la cantidad de grasa y tamaño del adiposito. Se considera a la leptina, como la causante de enviar la señal al hipotálamo; y éste a su vez a una red neural que es la responsable de mantener la homeostasis y el equilibrio en el gasto de energía del organismo (Sansinanea, 2001). La leptina, estimula la producción de la glucosa hepática y esto aumenta la actividad de la glucosa 6-fosfato. También se ha visto que esta hormona probablemente limite la formación de triglicéridos hepáticos, lo cual facilita la entrada de ácidos grasos a la mitocondria y sus  $\beta$ -óxidos; estos efectos siempre dependerán de la condición energética del organismo (Sansinanea, 2001).

En la alimentación, el estado estable (cero balance de energía), la expresión y secreción de leptina se refleja en la grasa corporal en roedores y humanos (Considine *et al.*, 1996); además, las concentraciones de leptina en plasma están positivamente correlacionadas con la cantidad de grasa en el ganado (Delavaud *et al.*, 2002). Esta correlación con la grasa se altera con los cambios en el balance de energía. Lentz *et al.*, 2005, encontraron una correlación positiva entre la concentración de leptina en el plasma de vacas con la condición corporal, la cual es una medida crítica de la grasa del

cuerpo en los bovinos. De acuerdo con lo anterior se encontró que la concentración de leptina en plasma de vacas Holstein durante el parto y en lactación temprana, es más elevado en vacas con mayor condición corporal (Meikle *et al.*, 2004). En corderos la producción de calor puede estar regulada por la secreción de prolactina y leptina durante el nacimiento (Stephenson *et al.*, 2001). La administración de leptina en corderos recién nacidos aumenta la temperatura rectal y aumenta la velocidad de desaparición del tejido adiposo marrón (Mostyn *et al.*, 2001).

### **MECANISMOS DE LA LEPTINA**

La leptina es sintetizada y secretada por los adipositos blancos dentro de la sangre, y son transportados al cerebro vía sistema saturado; donde esto causa la liberación o inhibición de factores que resultan en una reducción en el consumo de alimentos, incrementado la expedición de energía y la actividad física del animal (Houseknetch *et al.*, 1998).

La leptina no solo actúa a nivel central, sino también a nivel periferal. Los receptores de leptina que se encuentran fuera del sistema nervioso central, son de forma corta; y la presencia de estos receptores de leptina, explica su relación con otras hormonas como la insulina. La leptina ha sido implicada en la resistencia a la insulina por su acción de atenuarla; La cual afecta directamente el metabolismo y función de los tejidos periferales. El tratamiento con leptina de adipositos, reduce la estimulación de insulina del metabolismo de carbohidratos y lípidos; así como también la estimulación de insulina de la síntesis de proteínas. En ratones el tratamiento de leptina en músculo, causa un incremento en la oxidación de ácidos grasos sin causar cambios en el metabolismo de los carbohidratos. La exposición de leptina en los islotes pancreáticos, causa una reducción en la secreción de insulina (Houseknetch *et al.*, 1998).

### **INVESTIGACIONES RECIENTES SOBRE EL EFECTO Y CONCENTRACIÓN DE LEPTINA EN RUMIANTES**

Lentz *et al.* (2005), encontraron que la concentración de leptina en plasma después de 68 días de administrar una dieta alta en energía, la concentración de leptina aumentó ( $P < 0.05$ ), y con la restricción del alimento también ( $P < 0.01$ ), comparada con los otros tratamientos que incluyen diferentes cantidades de suplemento proteico. Además, la concentración de leptina en plasma no es afectada por el ayuno o por la interacción restricción de alimento X tratamiento, pero si hubo efectos entre tratamientos. Ellos mismos reportan que hubo interacción entre el tratamiento y el acceso al alimento en la concentración de leptina ( $P < 0.001$ ) en el plasma a los 109 d de tratamiento.



La concentración de leptina en plasma en el mismo experimento, se correlaciona positivamente con la condición corporal. El mismo efecto encontraron Delavaud *et al.*, (2002) en vacas que se encontraban en el último tercio de la lactación.

El incremento en el consumo de los alimentos, está asociado con el incremento de la condición corporal y el incremento en las concentraciones de leptina en plasma. En vacas a las que se les administró una dieta baja en energía y poco suplemento proteico, una restricción de 18 horas; puede causarles una reducción en la concentración de leptina. En vaquillas que pastorearon durante el invierno, se observaron reducciones en la ganancia de peso, esto asociado a una reducción en la concentración de leptina en plasma (Hersom *et al.*, 2004).

Por otra parte, estudios sobre la concentración de leptina circulante, encontraron que la concentración de leptina plasmática en ovejas gestantes alimentadas a nivel de mantenimiento, alcanzaban un máximo a mitad de la gestación; disminuyendo progresivamente hasta el final de la gestación e inicio de la lactación (Ehredardt *et al.*, 2001).

Por su parte, Valderrábano *et al.*, (2003), encontraron que la grasa almacenada por las ovejas al inicio de la gestación, está involucrada con la expresión de la respuesta inmune. Las diferencias en la respuesta que dieron comienzo en las primeras fases de la infección aparecieron asociadas a los niveles de leptina sérica; lo que sugiere que la leptina puede actuar como nexo de unión entre el estado nutricional y los mecanismos inmunes, involucrados en la respuesta ante la infección de nemátodos

## CONCLUSIÓN

En el área de la nutrición de rumiantes, es necesario el conocimiento completo de los mecanismos que regulan y coordinan el consumo de alimentos y el metabolismo energético en los alimentos. Estudios que se han realizado acerca del papel de la leptina, tanto en roedores, humanos, cerdos y rumiantes; indican que la leptina juega un papel importante en la regulación del consumo, en la expedición de la energía y del empleo de los nutrientes de los tejidos bajo condiciones fisiológicas y patológicas específicas. Es necesario que se realicen estudios más extensos, que permitan determinar el papel de la leptina en la determinación del estado nutricional y la productividad del ganado.

**LITERATURA CITADA**

- AGNEW RE, Yan T. 2000. The impact research on energy feeding systems for dairy cattle. *Livest. Prod. Sci.* 66:197-215.
- AMSTALDEN M, García MR, Williams SW, Stanko RL, Nizielski SE, Morrison CD, Keisler H, Williams GL. 2000. Leptine gen expression, circulating leptin, and luteinizing hormone pulsatility are acutely responsive to short-term fasting in prepubertal heifers: relationships to circulation insulin and insulin-like growth factor I. *Biol. Reproduction.* 63:127-133.
- ARAUJO-FEBRES O. 2005. Factores que afectan el consumo voluntario en bovinos a pastoreo en condiciones tropicales. IX Seminario de pastos y forrajes. Facultad de Agronomía. Zulia.
- CARRO E, Senaris R, Considine RV, Casanueva FF, Dieguez C. 1997. Regulation of in vivo growth hormone secretion by leptin. *Endocrinology.* 138:2203-2206.
- CHILLIARD F, Bocquier F, Delavaud C, Guerre-Millo M, Bonnet M, Martin P, Faulconnier Y, Ferlay A. 1998. Leptin in ruminants: Effects of species, breed, adiposity, photoperiod,  $\beta$ -agonists and nutritional status. In: *proc 1998 Cornell nutr. Conf. For Feed Manufacturers, Cornell University, Ithaca, NY.* pp 65-74.
- CONSIDINE RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephen TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marocco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF. 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 334:292-295.
- DANIEL JA, Whitelock BK, Baker JA, Steel B, Morrison DD, Keisler DH, Sartin JL. 2002. Effect of body fat mass and nutritional status on 24 hour leptin profiles in ewes. *J. Anim. Sci.* 80:1083-1089.
- DELAVAUD C, Ferlay A, Faulconnier Y, Boquier F, Kann G, Chilliard Y. 2002. Plasma leptin concentration in adult cattle: Effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. *J. Anim. Sci.* 80:1317-1328.
- EHRHARDT RA, Slepatis RM, Siegal-Willett J, Van Amburgh ME, Bell AW, Boisclair YR. 2000. Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. *J. Endocrinol.* 166:519-528.
- HARDIE LJ, Guilhot N, Trayhurn P. 1996. Regulation leptin production in cultured mature white adipocytes. *Horm. Metab. Res.* 28:685-689.



- HERSOM J, Wettemann RP, Krehbiel CR, Horn GW, Keisler DH. 2004. Effect of live weight gain of steers during winter grazing: III. Blood metabolites and hormones during feedlot finishing. *J. Anim. Sci.* 82:2059-2068.
- HOSSNER KL. 1998. Cellular, molecular and physiological aspects of leptin potential applications in animal production. *Canadian J. Of Anim. Scien.* 78:463-472.
- HOUSEKNETCH KL, Clifton A, Matteri RL, Spurlock ME. 1998. The biology of Leptin: A Review. *J. Anim. Sci.* 76:1405-1420.
- HOUSEKNETCH KL, Portocarrero CP. 1998. Leptin and its receptors: regulators of whole body energy homeostasis. *Domestic animal endocrinology.* 15(6):457-475.
- KEISLER DH, Daniel JA, Morrison CD. 1999. Leptin's role in nutritional status and reproductive function. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)* 54:425.
- LENTZ CA, Wettemann RP, White FJ, Rubio I, Ciccioli NH, Spicer LJ, Keisler DH, Payton ME. 2005. Influence of nutrient and body fat on concentrations of insulin-like growth factor-I, insulin, thyroxine, and leptin in plasma of gestating beef cows. *J. Anim. Sci.* 83:586-596.
- MEIKLE A, Kulcsar M, Chilliard Y, Febel H, Delavaud C, Cavestany D, Chilibroste P. 2004. Effect of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction.* 127:727-737.
- MORRISON CD, Daniel JA, Holmberg BJ, Dijiane J, Raver N, Gertler A, Keisler DH. 2001. Central infusion of leptin into well-fed and undernourished ewe lambs: Effects on feed intake and serum concentrations of growth hormone and luteinizing hormone. *J. Endocrinol.* 168.
- MOSTYN A, Keisler DH, Weeb R. 2001. The role of leptin in the transition from fetus to neonate. *The proceedings of the nutrition society.* 60(2):187-194.
- REYNOLDS CK, Benson JA. 2004. Gut peptides and feed intake regulations in lactating dairy cows. *J. Anim. Sci. (suppl 1).*
- SANSINACEA AS, Cerone SI, Zonco I. 2001. Serum leptin levels in cattle with different nutritional conditions. *Nutrition Research* 21:1045-1052.
- SORENSEN A, Adam CL, Findlay P. 2002. Leptin secretion and hypothalamic neuropeptide and receptor gene expression in sheep. *American J. Physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology.* 2(4):1227-1235.

- STEPHENSON T, Budge T, Mosty H. 2001. fetal and neonatal adipose maturation: a primary site of cytokine and cytokine-receptor action. *Biochemical Society transaction*. 29(2):80-85.
- THOMAS MG, Enns RM, Hallford DM, Keisler DH, Obeidat BS, Morrison CD, Hernández JA, Bryabt WD, Flores R, López R, Narro L. 2002. Relationships of metabolic hormones and serum glucose to growth and reproductive development in performance tested angus, brangus, and bramhan bulls. *J. Ani. Sci.* 80:757-767.
- TSUCHIYA T, Nagao Y, Ozawa A, Matsumoto M, Sugahara K, Kubo T, Kato H. 1998. decrease of the obese gene expresión in bovine subcutaneous adipose tissue by fasting. *Biosci. Biotechnology. Biochem.* 62:2068-2069.
- VALDERRÁBANO JC, Gómez-Rincon J. Uriarte J. Relación entre la concentración de leptina plasmática y la respuesta inmune frente a *hoemanchus contortus* en el periparto ovino. Centro de investigación y Tecnología agroalimentaria. Gob. De Aragón, Zaragoza.
- ZHANG Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature (Lond)* 372:425.
- ZIEBA AD, Amstalden M, Maciel MN, Keisler DH, Raver N, Gertler A, Williams GL. 2003. Divergent effects of leptin on leteinizing hormone and insuline secretion are dose dependent. *Exp. Biol. Med.* 228:325-330.