

Hospital de Niños  
Manuel Arriarán.

Cátedra de Química Fisiológica  
Escuela de Medicina — U. de Chile.  
Prof. E. Cruz-Coke.

## ESTUDIOS EN EL LACTANTE DISTROFICO

### II. Determinación post-mortem de los lípidos hepáticos\*

Por los Dres. HERMANN NIEMEYER\*\*  
y SEGISMUNDO ITURRA T.

#### Introducción.

Dentro de un estudio general, que se realiza en el Hospital Arriarán, de los múltiples problemas que afectan al niño distrófico —y que está siendo objeto de comunicaciones parciales<sup>80</sup>—, nos ha interesado en forma especial tratar de conocer algunos aspectos del comportamiento del hígado en nuestros enfermos.

Al tratar de buscar algunos indicios sobre la etio-patogenia de los trastornos nutritivos agudos del lactante, especialmente de la toxicosis, en la anatomía patológica, siempre se ha encontrado con la falta de alteraciones específicas de estos cuadros clínicos. El único hallazgo es la presencia de la degeneración grasosa del hígado.

En el "Tratado Enciclopédico de Enfermedades de la Infancia", Röminger<sup>80</sup> expresa que "hay desaparición de lípidos en el hígado y porción cortical de las suprarrenales. Por la rápida desaparición del glicógeno, especialmente relacionado con las grandes pérdidas de agua, se llega, incluso, con la alimentación exclusiva de hidrato de carbono, a grados considerables de degeneración adiposa del hígado. Se ha de considerar como signo de alteración intensa del metabo-

\* Este trabajo sirvió como tesis de prueba al señor S. I. T. para optar al título de Médico-Cirujano de la Universidad de Chile.

\*\* Ayudante de la Cátedra de Química Fisiológica.

lismo del hígado, de la hemoglobina y del hierro, la hemosiderosis en casi todos los órganos, sobre todo en la mucosa intestinal, bazo e hígado".

Para Finkelstein "resulta característica la degeneración grasa del hígado"<sup>28</sup>.

Más explícito es Freudenberg, quien asegura que "si el curso es prolongado, pueden observarse ligeras lesiones inflamatorias y degenerativas en el epitelio intestinal. Es excepcional el hallazgo de lesiones de enteritis genuina fibrino purulenta ulcerosa. En los casos graves típicos es característica la degeneración adiposa del hígado. También se observan lesiones degenerativas del epitelio renal"<sup>29</sup>.

Resulta difícil dilucidar si esta alteración constituye un factor etiológico de los procesos que comentamos, o es la resultante final de una alteración metabólica que afecte el organismo en conjunto. En los tratados de pediatría y anatomía patológica<sup>28 31</sup> que hemos tenido a nuestro alcance, no hemos logrado encontrar mayor precisión respecto al hígado graso en niños fallecidos con toxicosis. Por ejemplo, no se indican trabajos en que se haya investigado la clase de lípidos que se encuentran en el hígado.

Creíamos que sería de interés hacer el estudio químico de estos hígados grasos, ya que en animales de experiencia se ha logrado producir degeneración grasa de diferentes tipos —triglicéridos o ésteres de colesteroína—, que obedecen a causas diferentes. Además, se han establecido ciertas relaciones entre esteatosis hepática y metabolismo de los fosfolípidos. De modo que el dosificar las distintas fracciones de lípidos de los hígados de niños fallecidos de toxicosis, podría informarnos, por lo menos, parcialmente, de la alteración metabólica que lo ha originado.

**Adiposis hepática experimental.** — De diversas maneras se ha obtenido en animales de experimentación el desarrollo de hígados grasos. Se pueden clasificar en 5 grupos principales:

- 1º Ausencia de lipocaico, producida por la extirpación pancreática y mantenimiento de los animales con insulina. Este grupo también comprende la degeneración grasosa por fístula pancreática o por ligadura de los conductos pancreáticos.
- 2º Intoxicación por fósforo, tetracloruro de carbono, floridzina, cloroformo, alcohol, etc.

- 3º Factores endocrinos: inyección de extracto anterior de hipófisis, inyección de sustancias estrógenas.
- 4º Infecciones variadas: fiebre amarilla, difteria.
- 5º Factores dietéticos: este grupo es el que más ha absorbido la atención de los investigadores y se cuentan por decenas los trabajos publicados con las muchas condiciones necesarias para producir la alteración hepática.

En numerosas ocasiones, diferencias pequeñas en los detalles experimentales, determinan contradicciones que dificultan extraordinariamente la comprensión exacta del problema. Lo fundamental es provocar un acentuado desequilibrio dietético, tanto en los elementos básicos —glúcidos, lípidos y prótidos— como en los factores accesorios, especialmente las vitaminas del complejo B.

Las alteraciones dietéticas que con más frecuencia se usan para producir hígados grasos, son:

- 1º Ayuno.
- 2º Dieta hipergrasa.
- 3º Dieta rica en colesterol.
- 4º Dieta casi exclusivamente hidrocarbonada.
- 5º Ausencia de colina con el resto de la dieta más o menos equilibrada.
- 6º Desequilibrios parciales de vitaminas o de ciertas amino-ácidos.

Para que se desarrolle hígado graso se necesita que vaya asociada otra condición experimental, cual es la ausencia de algunos principios lipotrópicos, es decir, de sustancias que tiendan a impedir el hígado graso, como la metionina, el inositol y la colina. Además, debe lograr mantenerse al animal en un estado de salud compatible con su crecimiento normal.

El lípido depositado anormalmente en el hígado es generalmente un triglicérido, pero también puede haber un exagerado depósito de ésteres de colesteroína, lo que depende de la causa etiológica.

En el cuadro N° 1 se resumen las diferentes etiologías del hígado graso, junto con el tipo de lípidos presente y el factor lipotrópico adecuado para la reversibilidad del proceso.

Sea cual fuera la causa que ha originado el hígado graso, los mecanismos de su formación se pueden reducir a tres:

CUADRO Nº 1

	Lípidos de Depósito	Factores alipotrópicos	Factores lipotrópicos	Autores	
	T R I G L I C E R I D O S	Dieta rica en grasa y pobre en proteínas.		Colina, metionina, betaina, trietilcolina Vitamina K.	6
Dieta deficiente en colina.					
Dieta rica en tiamina.			Colina, inositol más complejo B.	46	54
Dieta rica en hidratos de carbono (glucosa, sacarosa).			Colina, triptofano	8	27 45
Exceso de hormona anterior de hipófisis.			Lipocaico	9	12 30 68
Ayuno.			Colina (+) Lipocaico	8	10
Deficiencia de ácidos grasos esenciales.			Acido linoleico		32
Carencia de Riboflavina.					90
Deficiencia de ácido pantoténico.			Acido pantoténico		93
Exceso de estrógenos.					72
Carencia de Piridoxina.			Carencia de ácido pantoténico		102
Carencia de Vitamina K.			Colina, Vitamina K.	63	64
Infecciones.			Colina	17	67 94
Intoxicaciones por fósforo tetracloruro de carbono, alcohol.			Colina (+)	11	67
ESTERES DE COLESTEROL		Exceso de Biotina.		Lipocaico, inositol	15
	Ausencia de Lipocaico.		Lipocaico, metionina, colina	22	26 45 77
	Dieta rica en colesterol.		Lipocaico, inositol, colina (+)		82

- 1º Alteración de la movilización de los lípidos del hígado.
- 2º Falta de combustión de los lípidos en el hígado.
- 3º Exagerada neoformación de lípidos a partir de otros sustratos.

Este problema ha logrado aclararse en parte con la ayuda de los átomos radioactivos. En el caso del hígado graso por exceso de lípidos en la alimentación y por déficit de colina, parece que lo importante es la deficiente movilización desde el hígado al resto de los tejidos, principalmente tejido adiposo.

En los hígados grasos producidos por inanición<sup>40</sup> y por inyección de extracto anterior de hipófisis<sup>30 46</sup>, y parece que en los hígados grasos humanos corrientes en infecciones crónicas<sup>44</sup>, el trastorno principal residiría en un transporte exagerado desde los depósitos hacia el hígado. En cambio, la adiposis hepática producida por dieta rica en hidratos de carbono sería determinada fundamentalmente por una excesiva transformación en lípidos<sup>48</sup>. La importancia que pudiera tener una alteración en el proceso de combustión de los ácidos grasos en el hígado mismo, no se ha logrado precisar, y en realidad no se ha insistido lo suficiente en este aspecto.

**Metabolismo lípido y papel del hígado.** — El hígado parece ser el órgano indispensable en diversas etapas del metabolismo de los lípidos. En efecto, tanto las grasas absorbidas a nivel del intestino como las grasas que se entregan a la circulación desde los depósitos, son primeramente elaboradas en el hígado antes de pasar a otros órganos de la economía para su combustión completa. La afirmación de que las grasas absorbidas del intestino pasen primeramente al hígado está en contradicción con la teoría generalmente aceptada sobre la absorción intestinal de los lípidos y está sostenida por las cuidadosas investigaciones de Frazer y colaboradores<sup>47</sup>.

**Absorción intestinal de los lípidos.** — Según la teoría clásica (Verzar y Mc Dougall), las grasas neutras serían emulsionadas en el intestino, hidrolizadas completamente por la lipasa, de modo que se descompusieran en glicerol y ácidos grasos. Estos últimos formarían complejos solubles con las sales biliares y así pasarían al interior de las células del epitelio intestinal, donde se fosforilarían bajo la influencia estimuladora de la corteza suprarrenal, para resintetizarse a triglicérido. Estas grasas neutras nuevamente formadas, pa-

sarían casi exclusivamente a los linfáticos y de ahí a la circulación general, sin pasar por el hígado.

Se ha demostrado que la emulsión de las grasas no se debe sólo a la existencia de las sales biliares y a la formación de jabones, pues las primeras dan emulsiones groseras de poca estabilidad y los segundos no actúan al pH 6.5 que existe en el intestino<sup>92</sup>. Se ha demostrado que el único sistema emulsificante que produce partículas no mayores que 0,5 micrones de diámetro y con una estabilidad de, por lo menos, 3 horas, es la triple combinación de ácidos grasos-biliares-monoglicéridos<sup>51</sup>, cuya efectividad se mantiene a pH entre 6,0 y 8,5. Es posible que otras sustancias, tales como fosfolípidos y colesterol, puedan ejercer alguna influencia en las superficies de interfase, pero no son fundamentales.

En el lumen intestinal se encuentra un fermento capaz de hidrolizar las grasas —lipasa— y proviene principalmente del páncreas. Su importancia en la absorción de las grasas también ha sido discutida. Mientras antes se aceptaba que se producía la hidrólisis completa como etapa preliminar para la absorción de los ácidos grasos, ahora se han aportado pruebas suficientes para concluir que la hidrólisis se efectúa sólo en una restringida porción de las grasas y que el proceso termina prácticamente con la formación de di y monoglicéridos y ácidos grasos libres<sup>48 50 51 52 78</sup>. Por lo tanto, hay que imaginar que la absorción a nivel del epitelio intestinal se hace no sólo de los ácidos grasos, sino que también de las grasas no hidrolizadas. Se ha demostrado<sup>3 39</sup> que la superficie distal de las células epiteliales posee un sistema de canales perpendiculares que permitirían el pasaje de partículas de un diámetro máximo de 0,5 micron; como el sistema emulsificante del intestino proporciona agrupaciones moleculares de grasas de estas dimensiones, es posible concebir que pueda verificarse una absorción directa en esta forma. Wotton y Zwemer<sup>104</sup> parecen haber efectuado la demostración directa del fenómeno. El pasaje a través de las células intestinales de material no saponificable, como las parafinas, que se realiza si ellas van emulsificadas hasta el grado de división que logran las grasas, es una prueba indirecta bastante significativa<sup>92</sup>. Las fuerzas físico-químicas requeridas para el pasaje de las partículas al interior de las células todavía son oscuras, pero parece que es importante la difusión de electrólitos, por el hecho de que las partículas de grasas van con carga eléctrica negativa<sup>31 34</sup> y la diferencia en la difusibilidad de los iones podría cargar eléctri-

camente la membrana celular<sup>74</sup>. Comprueba el valor que tienen los electrolitos en la absorción de las grasas, el hecho de que la supra-renalectomía, que representa un acentuado desequilibrio en el metabolismo electrolítico, ocasiona una disminución considerable en la absorción de grasas<sup>100 101</sup> neutras (triglicéridos). Este disturbio es mejorado cuando se suministra cloruro de sodio<sup>4 5 20 21</sup>, lo que representa una prueba junto con otras<sup>28 64 66</sup> de que la influencia de la corteza suprarrenal no se ejerce por una disminución de la fosforilación, como había imaginado Verzar.

Frazer<sup>47</sup> calcula que alrededor del 60 %, por lo menos, de las grasas que entran a las células intestinales, lo hacen en forma de estas partículas finamente dispersadas de grasas no hidrolizadas.

Del hecho fundamental recién señalado se desprende que no es necesario imaginar una resíntesis en el interior de las células intestinales para explicar la existencia de grasas neutras en los vasos quilíferos. El proceso es posible que exista, pero que tenga sólo una importancia secundaria que dependerá de la cantidad de ácidos grasos y monoglicéridos que entran en las células. Es indudable que en las células se forman fosfolípidos, lo que se ha demostrado con técnicas de histoquímica y con átomos marcados. Aunque no sirven de intermediarios en la síntesis de triglicéridos, como sostenía Verzar, su función se comprende, porque es una forma más fácil de transportar grasas.

Respecto a la absorción de fosfolípidos del intestino, poco se ha investigado directamente. Parece que se produce primero una hidrólisis que permite la absorción separada del fósforo y del glicérido restante.

El colesterol necesita para absorberse de la presencia de sales biliares y es indispensable que se estén absorbiendo simultáneamente ácidos grasos o triglicéridos<sup>37</sup>.

**Movilización de lípidos.** — En cuanto al destino inmediato de las grasas absorbidas, también se ha discutido. La teoría clásica suponía que los triglicéridos sintetizados en las células intestinales, pasaban al sistema linfático íntegramente y de allí a la circulación general y a los depósitos. Frazer<sup>47 100</sup> ha logrado demostrar que esto no es tan absoluto y que cuando se absorben ácidos grasos desde el intestino, éstos pasan a la red capilar del sistema portal y tienden a depositarse en el hígado; en estas condiciones no se observa la hiperlipemia consecutiva a la absorción de triglicéridos.

El transporte de grasas desde el intestino al hígado y de allí a los depósitos, se realizaría con la colaboración de los fosfolípidos, que permitirían la emulsión estable de las grasas. En efecto, los fosfolípidos constituyen una fina película que envuelve las partículas de grasas que circulan en el torrente circulatorio, que de otra manera precipitarían por la acción de las proteínas plasmáticas, el cloruro de sodio y el pH de la sangre. Está demostrado que los fosfolípidos del plasma provienen del hígado y aun se ha logrado la síntesis de fosfolípidos en cortes aislados de tejido hepático<sup>39</sup> <sup>40</sup>. Estos fosfolípidos plasmáticos serían removidos de la circulación principalmente por el hígado, lo que ha podido determinarse con fosfolípidos marcados en animales con exclusión hepática<sup>36</sup>.

En el transporte desde los depósitos al hígado no se ha precisado que intervengan los fosfolípidos, pero se lo supone así. Estos transportes están condicionados por muchas circunstancias, no todas bien definidas. El grado de alimentación es fundamental, así en un animal en ayunas se produce la movilización desde los depósitos y en uno bien alimentado hacia ellos<sup>17</sup>. Parece que intervienen factores endocrinos, especialmente hipófisis, y nerviosos en la regulación de estos transportes, pero las grasas que se movilizan no son exactamente las mismas de la dieta, sino que experimentan en el hígado modificaciones en el largo de la cadena y en el grado de saturación, que hacen que cada animal tienda a tener una composición de su tejido adiposo característico de la especie<sup>17</sup> <sup>37</sup>. Cuando en un animal de experiencia se inyecta extracto anterior de hipófisis, se observa un depósito anormal de grasa en el hígado, que con la ayuda de átomos marcados, se ha demostrado que proviene del tejido celular subcutáneo.

La movilización de grasa desde el hígado hacia los tejidos de depósito parece estar ligada a la presencia de colina. La colina es una base nitrogenada portadora de grupos metilos lábiles, que entra en la constitución de algunos fosfolípidos<sup>24</sup>. La deficiencia de colina en la dieta se acompaña de degeneración grasosa del hígado, y su aporte a la dieta ha demostrado ser un factor lipotrópico de primera importancia. Se ha tratado de conocer el mecanismo de su acción en correspondencia con el metabolismo de los fosfolípidos.

En 1944, Boxer y Stetten<sup>19</sup>, con la ayuda de colina isotópica, estudiaron la velocidad con que es reemplazada la



colina de los fosfátidos (turnover) en ratas jóvenes alimentadas con dieta normal y con dieta alipotrópica. Mientras se alimentaban con colina, la vida media de la colina de los fosfátidos era alrededor de 6 días y los reemplazos diarios en los fosfátidos de 3,9 mg. por rata. Cuando no se administraba colina, y mientras las ratas desarrollaban severos hígados grasos, la vida media de la colina aumentaba a 18 días y los reemplazos diarios disminuían a 1,3 mg. Como la cantidad total de colina presente en los fosfátidos permaneció constante, los autores imaginaron que el desarrollo del hígado graso está íntimamente ligado con la velocidad con que la colina integró y desintegró los fosfolípidos (turnover). Este punto de vista está de acuerdo con los hallazgos de Chaikoff y col.<sup>85 86</sup>, quienes también demostraron que la administración de colina a ratas acelera el turnover de los fosfolípidos, medido esta vez con fósforo radioactivo.

Patterson y Mc Henry<sup>84 85 86 87</sup>, en una serie de trabajos han demostrado también que el turnover de los fosfolípidos, tanto del hígado como del riñón de ratas jóvenes, está considerablemente disminuido y, además, han logrado demostrar otros hechos significativos. La concentración de fosfolípidos y de colina en riñones e hígados de animales deficientes en colina, se encuentra marcadamente reducida en relación a los animales alimentados con colina. Estas modificaciones se acompañan en el hígado de acumulación de lípidos (grasas neutras) y en los riñones de las degeneraciones hemorrágicas descritas por Griffith y Wade<sup>88</sup>. Estas degeneraciones renales se producen sólo si los animales carentes de colina en su dieta cumplen una condición, que es la de tener alrededor de 30 días de edad. Patterson y Mc Henry han encontrado que el turnover de los fosfolípidos de ratas normales es mucho mayor en esta edad de la vida, lo que significa que se necesita en este momento un mayor aporte de colina en la dieta para poder satisfacerlo. Por esta razón, las ratas más jóvenes son más susceptibles a la carencia de colina, reflejado en una mayor sensibilidad a la degeneración grasosa del hígado y en la posibilidad de experimentar las alteraciones renales ya enunciadas.

Fishman y Artom<sup>40 41 42 43 44</sup> han estudiado la composición de los fosfolípidos del hígado de ratas jóvenes y púberes en relación con modificaciones dietéticas que determinan degeneración grasosa del hígado.

En dietas carentes de colina, los animales jóvenes alimentados con escasa o alta proporción de grasa, desarrollaron hígados grasosos que se acompañaron de una **disminución importante de los fosfolípidos**<sup>66</sup>, especialmente de los que contienen colina. La adición de colina restablece a sus niveles normales el valor de los lípidos hepáticos; en animales jóvenes la recuperación es rápida y completa.

La escuela de Chaikoff<sup>33 34</sup> estudió el **turnover de los fosfolípidos del plasma** en perros sometidos a dietas normales y alipotrópicas. Se suministraba una dosis única de cloruro de colina (300 mg. por Kg. de peso), simultáneamente con la administración parenteral de fosfato de sodio con fósforo radioactivo. Se observó que la incorporación de este fósforo marcado a los fosfolípidos del plasma tenía un ascenso en las primeras 24 horas después de la inyección, y que estos aumentos eran mayores en perros alimentados con colina que en perros alimentados sin colina; más tarde lograron precisar que las modificaciones del plasma eran secundarias a fenómenos que ocurrían en el hígado. En efecto, la incorporación de fósforo radioactivo en los fosfolípidos con colina del hígado, se incrementaba muy precozmente y sólo cuando empezaba a disminuir se hacían más evidentes las modificaciones en el plasma. En cambio, en los fosfolípidos sin colina del hígado, la velocidad de incorporación del fósforo radioactivo estaba disminuída con respecto a los perros controles alimentados con la misma dieta alipotrópica, pero a los cuales no se les daba colina. Hay que hacer notar que el 95 % de los fosfolípidos<sup>67</sup> del plasma contienen colina y que ellos son producidos y removidos por el hígado.

Chaikoff y colaboradores también han demostrado que el desarrollo de hígado graso determinado por la pancreatectomía<sup>26</sup> o por la privación de secreción externa pancreática de perros se acompaña de disminución de la concentración de colina del plasma y este descenso puede ser prevenido o corregido por la administración diaria de un principio del páncreas muy purificado<sup>25 24</sup> o de jugo pancreático en cantidad hasta de 5 cc. diarios<sup>81</sup>.

Parece que la menor velocidad en el turnover va a significar una disminución en la posibilidad de que el lípido se movilice fuera de un tejido, como ocurre en el hígado.

Durante el crecimiento, en que se están formando nuevas células, es decir, en que se están necesitando aportes anormales de materia prima, se hace muy manifiesta una sensibi-

lidad a la carencia de colina. Esto es comprensible si se considera que las membranas celulares están constituidas fundamentalmente por fosfolípidos. En animales en crecimiento, carencias de colina relativamente menores que en animales adultos, determinan más precozmente degeneración grasosa del hígado, y además, las alteraciones anátomo-patológicas en los riñones que sólo se observan en épocas tempranas de la vida.

En relación con la influencia del crecimiento en las necesidades de colina hay otros hechos que son importantes. Se sabe ya con seguridad que la metionina es un factor lipotrópico valioso y que es eficaz en movilizar las grasas del hígado aun en ausencia de colina. Pero en animales en crecimiento normal hay que exagerar las cantidades de metionina en la dieta, para que su acción sea útil<sup>65 83 88</sup>. Las relaciones que existen entre colina y metionina, han sido precisadas por DuVigneau y colaboradores<sup>24 45</sup>, que han introducido la noción de grupos metilos lábiles que se manifiestan de gran importancia en química biológica. Ciertas sustancias metiladas del organismo serían capaces de entregar, en determinadas condiciones, sus grupos metilos a otras moléculas receptoras; en ocasiones, el fenómeno sería reversible. Las cuatro sustancias metiladas fundamentales del organismo son: colina, metionina, betaína y creatina. La colina puede sintetizarse en el organismo a partir de la betaína o de la etanolaminá, siempre que exista metionina que vaya a metilarla. En otras condiciones, la colina puede ceder sus metilos a la homocisteína, que se transforma en metionina. Durante el crecimiento se requiere mayor cantidad de metionina para constituir las proteínas proteoplasmáticas<sup>82</sup>. De modo que puede imaginarse la relativa carencia de colina en el animal en crecimiento, ya sea porque se sintetiza menos a partir de la etanolamina o porque se desintegre más para sintetizar la metionina. Algunas condiciones experimentales que impiden la aparición de un hígado graso, como ser: la carencia de algunas sales minerales<sup>60</sup>, el exceso de ácido nicotínico<sup>59</sup>, la carencia de tiamina<sup>18</sup>, limitación de ingestión calórica<sup>78</sup>, parecen poder explicarse simplemente, porque detienen el crecimiento normal. A la inversa, la acción anti-lipotrópica de sustancias como la cistina, parece tener su explicación en el hecho de que este amino-ácido azufrado estimula el crecimiento<sup>13 14 62 65</sup>.

**Metabolismo intermediario de los ácidos grasos.** — Una característica metabólica muy importante del hígado la constituye el hecho de que la célula hepática utiliza en los procesos

oxidativos casi exclusivamente materiales grasos y no aminoácidos ni glucosa<sup>58</sup>. De modo que la energía de oxidación necesaria para los procesos de resíntesis debe provenir fundamentalmente de este tipo de sustrato, con lo que se pone en evidencia la singular importancia que adquiere el metabolismo graso en el hígado.

Es en este órgano donde principalmente se produce la oxidación de los ácidos grasos que conduce a la formación de los cuerpos cetónicos, como ácido beta-oxibutírico, diacético y acetona. Pero estas sustancias no son combustionadas en el hígado hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , sino que pasan a otros tejidos, principalmente músculos, para su oxidación completa con posible intervención del ciclo cítrico de Krebs<sup>67</sup>.

La formación de cuerpos cetónicos representa entonces una etapa normal en el metabolismo intermediario de las grasas<sup>67</sup>.

El mecanismo de formación de los cuerpos cetónicos están más o menos explicado, suponiendo una oxidación del ácido graso con formación de ácido acético, que luego se condensaría para formar cuerpos cetónicos con cuatro átomos de carbono.

Respecto al punto en que la cadena grasa se rompe para entregar ácido acético, no está bien aclarado si se trata exclusivamente o en forma combinada de una beta oxidación, de una omega oxidación, o de una oxidación múltiple y alterada.

Los trabajos de Lehninger<sup>68</sup> parecen indicar la necesidad de que el ácido graso sufra una fosforilación como etapa previa a la oxidación.

Se pensó que la colina podría intervenir también directamente en la combustión de la grasa, pero las experiencias in vitro, que parecían demostrar esta hipótesis, han sido interpretadas de otro modo y aún se ha demostrado que hay más bien una disminución en la combustión de ácidos grasos en cortes de tejidos<sup>45</sup>.

Nuestro tema de trabajo consistió en tratar de conocer más profundamente el hígado graso de lactantes fallecidos por toxicosis, con la esperanza de encontrar indicios que nos revelaran algo de su patogenia. Elegimos otro grupo de niños fallecidos por otras causas para ver si podían establecerse algunas diferencias que fueran significativas. Los resultados nos demostraron que los diferentes lípidos hepáticos

guardan entre sí una dependencia que sigue una cierta ley que es común para todos los tipos de hígados examinados.

#### Material y método.

Se hizo la determinación de los lípidos hepáticos en 50 lactantes de 1 mes a 21 meses de edad, de los cuales 27 fallecieron mientras hacían una toxicosis y los restantes por causas diversas. La mayor parte de las determinaciones fueron hechas en el Laboratorio Central del Hospital Manuel Arriarán.

La muestra de hígado se tomaba lo más pronto posible después de comprobado el deceso. El tiempo mínimo fué de 30 minutos. Treinta muestras fueron tomadas en las tres primeras horas. Se tomaba un trozo de hígado del lóbulo izquierdo.

Se pesaba un gramo en balanza de precisión al mg. y se trituraba en un mortero con 5 g. de arena, según las indicaciones de Bloor<sup>16</sup>.

En la determinación de los lípidos se seguía el procedimiento que en síntesis señalamos.

A) El tejido triturado se extraía con alcohol redestilado en caliente y luego se enteraba el volumen hasta 100 cc. con alcohol y se filtraba.

En esta forma se extraían por completo los lípidos tisulares (Bloor).

B) Para la dosificación de los lípidos totales se tomaban 50 cc. del filtrado y se dejaban evaporar en un depósito perfectamente calibrado y colocado al baño maría y más tarde en una estufa a 37° hasta peso constante. Este método, que es muy sencillo, tiene la desventaja de ser poco sensible y de determinar en forma no específica todas las sustancias alcohol-solubles, sean grasas o hidrocarburos, pigmentos o vitaminas, lo que puede hacer aparecer algo elevados los resultados. De todos modos, esta situación no modifica en absoluto las conclusiones que se obtienen.

C) Para dosificar los fosfolípidos se tomaban 10 cc. del filtrado, los que se evaporaban hasta sequedad. El residuo se disolvía en éter de petróleo y luego se centrifugaba. El solvente se concentraba hasta 2 cc. y luego se le agregaba 7 cc. de acetona y 3 gotas de solución saturada de cloruro de magnesio en alcohol, con lo que precipitaban los fosfolípidos, que se separaban por centrifugación. El precipitado se lavaba con acetona y luego se disolvía en 5 cc. de éter húmedo.

Esta solución de fosfolípidos se trasladaba a vasos cónicos, donde se evaporaba, para luego ser sometida al proceso de oxidación. Para la oxidación se agregaban 5 cc. de reactivo de plata (bicromato de plata en ácido sulfúrico) y 3 cc. de solución normal de bicromato de potasio. Esta mezcla se colocaba en un baño con agua a 87°-88° durante 1 hora. Al final de este período se agregaban 75 cc. de agua destilada y después de enfriar se titulaba el exceso de bicromato de potasio con tiosulfato 0,1 N en presencia de 10 cc. de yoduro de potasio al 10 % y almidón. Simultáneamente se hacía una titulación en blanco, de manera que la diferencia entre ésta y la titulación de la muestra representaba la cantidad de solución de bicromato 0,1 N empleada en la oxidación del material graso de la muestra. Los cálculos se hacen tomando en cuenta que para oxidar 1 mg. de fosfolípidos se necesitan 3,00 cc. de bicromato de potasio 0,1 N.

D) Para la titulación del colesterol total se tomaban 10 cc. de filtrado que se colocaban en un tubo ancho, se evaporaba al baño maría hasta desecación completa y luego se colocaba a la estufa hasta el otro día. Al tubo se le agregaban 10 cc. de cloroformo, 2 cc. de anhídrido acético y 0,1 cc. de ácido sulfúrico puro para análisis.

Se agitaba fuertemente, se dejaba  $\frac{1}{2}$  hora a la oscuridad; el color verde se leía en el fotocolorímetro clínico de Leitz con filtro rojo. Para aprovechar la tabla de etalonaje hecha para la sangre, los resultados obtenidos en la tabla se multiplicaban por 0,04.

A continuación redactamos un caso:

#### OBSERVACION N° 85973:

Niño de 5 meses que fallece a las 21.30 horas con el diagnóstico de: distrofia, dispepsia, raquitismo. A las 22 horas se hace una laparotomía y se extrae un trozo de hígado. Se pesa 1 g. y se hace la extracción alcohólica. Al día siguiente se inicia la titulación.

##### 1° Lípidos totales:

Peso del vaso solo: 30 g.

Peso del vaso con lípidos correspondientes a 50 cc. de extracto: 30,049 g.

La diferencia de 49 mg. corresponde a los lípidos totales de 0,5 g. de tejido. Los resultados se expresan en mg. de lípidos por 100 mg. de tejido, o sea, 9,8 mg. %.

##### 2° Fosfolípidos:

Se toman 10 cc. de extracto, que corresponden a 100 mg. de tejido. La titulación del blanco fué de 36,7 cc. de 0,1 N. tiosulfato. La titulación

de la muestra fué de 20,3 cc. de 0,1 N, tiosulfato. La diferencia de 6,4 cc. de tiosulfato son equivalentes a 6,4 de bicromato 0,1 N.

Como 3 cc. de bicromato 0,1 N, oxidan 1 mg. de fosfolípidos, en 100 mg. de tejido, habrá 6,4 : 3. o sea, 2,13 mg. de fosfolípidos.

### 3° Colesterol:

Se toman 10 cc. de extracto, que corresponden a 100 mg. de tejido. El color verde desarrollado equivale al valor 9 de la tabla, o sea, 0,36 mg. de colesterol en 100 mg. de tejido.

## Resultados y comentarios.

En el cuadro N° 2 se han colocado los resultados obtenidos, agrupando nuestro material en dos grupos: 1°) Los correspondientes a niños fallecidos con toxicosis, asociada o no a causa infecciosa precisa, y 2°) Los fallecidos por diferentes procesos patológicos, que incluyen afecciones agudas, como bronconeumonía, y crónicas, como tuberculosis generalizada y caquexia por desnutrición; también se incluyen afecciones misceláneas, que comprenden síndromas policarenciales, ataques convulsivos, etc.

En el cuadro se consignan la edad de los niños y el tiempo de evolución del proceso que lo condujo a la muerte, apreciado por los datos de la anamnesis y la estada hospitalaria.

Los valores de los diferentes tipos de lípidos —totales, fosfolípidos y colesterol total—, son muy variables y con fluctuaciones semejantes en los diferentes grupos de niños, salvo en aquél de fallecidos por enfermedades caquetizantes, en que se nota un franco predominio de cifras relativamente menores de lípidos. En este grupo el promedio de lípidos totales es de 9,1 % con fluctuación de 7,3 a 10,5; en cambio, en los restantes los promedios fluctúan entre 12 y 15 % más o menos y con fluctuación entre 8 y 18, aproximadamente.

En nuestro material no encontramos hígados de aspecto normal, que pudieran servirnos de base para todas nuestras comparaciones y tampoco hemos encontrado en la literatura datos precisos sobre dosificación de lípidos hepáticos en lactantes; sólo se menciona una determinación hecha en un feto<sup>17</sup>. Es comprensible la falta de datos al respecto, por cuanto es extraordinariamente rara la muerte por accidente en esta edad de la vida.

Mientras se hacían nuestras experiencias no llegó al Instituto Médico Legal ningún lactante que pudiera servirnos para completar nuestras propias observaciones.

CUADRO Nº 2

	Diagnós- tico	Edad meses	Evol. días	Lípidos totales %	Fosfoli- pidos %	Fosfolip. Lip. tot. x 100	Coles- terol %
1.—  CON TOXICOSIS	a)	9	5	9,2	2,60	28	0,36
	Bronco- neumonía	3	2	10,4	2,30	22	0,36
		12	21	11,1	3,46	31	0,80
		9	13	13,1	3,96	31	0,48
		21	15	17,6	4,13	23	1,04
		14	6	18,4	4,66	25	0,92
	b)	1	19	8,4	0,70	8,3	0,20
	Entero- colitis	6	11	12,5	4,36	35	0,64
		5	14	13,9	3,96	29	0,48
	c)	14	11	9,8	1,90	19	0,48
	Otras in- fecciones	15	10	15,6	3,86	25	0,80
		18	4	16,9	4,42	26	0,64
		5	15	18,7	4,30	23	0,64
	d)	12	20	7,6	1,06	14	0,08
	Sin infec- ciones agre- gadas	3	4	9,6	1,63	17	0,36
		1	3	10,0	2,30	23	0,48
		9	14	10,1	2,33	23	0,08
		16	3	10,3	2,63	25	0,48
		15	5	10,3	3,20	31	0,48
		3	15	10,4	2,86	28	0,36
3		5	11,5	3,93	34	0,64	
4		3	12,2	1,76	15	0,48	
8		5	12,6	3,43	27	0,48	
2		4	15,4	4,73	31	0,80	
12		8	15,6	3,60	23	0,80	
7		20	15,8	4,13	26	0,80	
13		8	19,5	4,60	24	0,92	
2.—  SIN TOXICOSIS	a)	21	5	9,1	2,40	26	0,36
	Bronco- neumonía	12	3	11,4	2,10	18	0,48
		11	x	11,8	1,50	30	0,36
		2	4	11,9	3,96	34	0,48
		3	16	11,9	2,30	19	0,64
		15	8	12,8	3,26	26	0,64
		1	2	17,6	4,30	24	0,80
	b)	2,5	75	7,3	0,86	12	0,36
	Enferme- dades caquec- tizantes	3,5	75	7,4	1,73	23	0,20
		16	x	8,5	0,86	10	0,36
		6	66	8,7	0,70	8	0,20
		4	60	8,8	0,96	11	0,08
		12	66	8,9	1,30	15	0,20
		12	60	9,1	1,30	14	0,26
		17	7	9,5	2,73	28	0,36
		5	50	10,1	3,76	37	0,48
		13	x	10,4	3,40	33	0,48
		2	11	10,5	3,00	29	0,48
		e)	5	3	9,8	2,10	21
	Miscelá- nea	11	15	12,6	1,96	16	0,20
20		1	14,0	3,76	27	0,64	
18		7	16,9	3,76	22	0,64	
12		8	18,0	4,30	24	1,04	



Al relacionar los valores de colesterol con los de lípidos totales, puede observarse que hay un aumento proporcional, que sigue más o menos la línea recta salvo en los valores bajos de colesterol, en que el error de método fué muy grande.

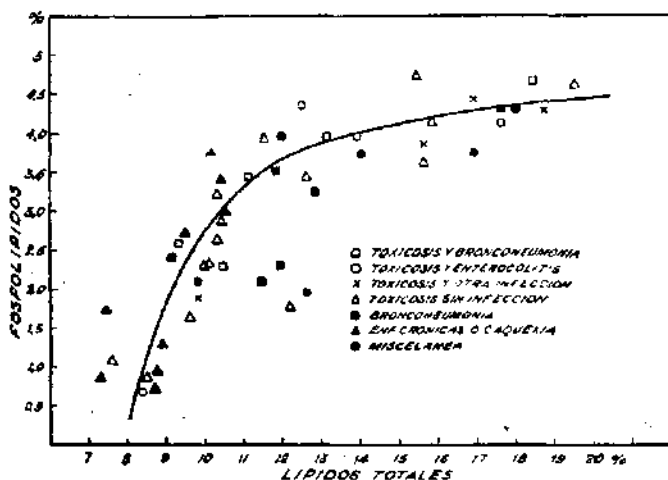
Resulta interesante comparar las variaciones en contenidos de fosfolípidos y de lípidos totales de los hígados del total de los niños.

En los gráficos N.os 1 y 3 se han colocado en el eje de las abscisas, el contenido de lípidos totales y en el eje de las ordenadas el contenido en fosfolípidos, expresados en gramos por ciento.

Los puntos que señalan la relación entre lípidos totales y fosfolípidos, se agrupan todos siguiendo con bastante precisión una curva hiperboloide. A medida que tiende a aumentar el contenido en lípidos totales del hígado, hay también una tendencia al incremento de los fosfolípidos, que en un comienzo es muy rápido, pero luego se va haciendo relativamente menor con tendencia a alcanzar un límite alrededor de los 4,5 %.

GRAFICO N° 1

Relación entre la causa de la muerte y los valores de lípidos totales y fosfolípidos de hígados de lactantes distróficos.



En el gráfico N° 1 los puntos de relación entre lípidos totales y fosfolípidos están representados por diferentes figuras, que corresponden a los diversos grupos, según el diagnóstico. Como era de esperarlo del análisis del cuadro N° 2, sólo los valores referentes a los niños fallecidos por enfermedades caquetizantes tienden a agruparse y lo hacen en la parte inferior de la curva de correlación.

Al estudiar la anatomía patológica de nuestros niños, pudimos apreciar que era absolutamente irregular, en el sentido que no había ninguna característica especial para determinado grupo de niños, de modo que se podía encontrar una intensa degeneración grasosa tanto en un paciente muerto de toxicosis con bronconeumonía, como en uno fallecido por enterocolitis o por ataque convulsivo. Aun la frecuencia con que se presentaba uno u otro cuadro anatómico del hígado en las diferentes enfermedades era muy semejante. El tiempo de evolución del proceso y la edad del niño no demostraron influencia apreciable. Se exceptuaba a estas reglas, sin embargo, el mismo grupo 2 b, en que predominaba la atrofia fusca.

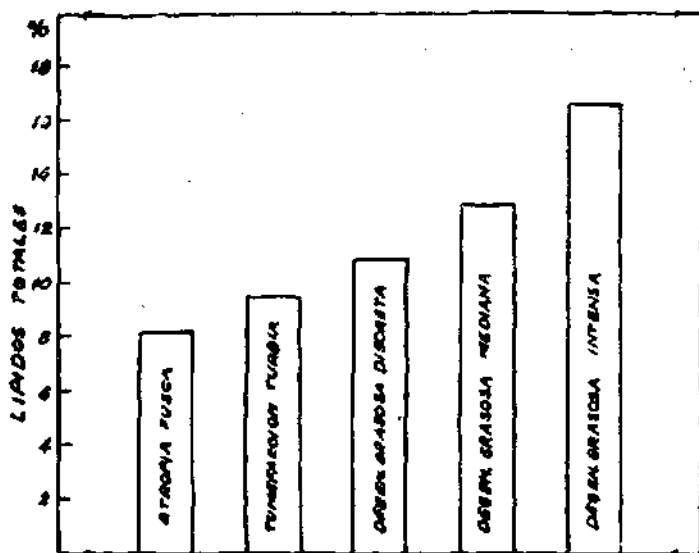
Quisimos por esto investigar qué relación existiría entre nuestros análisis químicos del hígado y los estudios anatómo-patológicos.

Con el fin de establecer esta comparación, se agruparon las observaciones anatómo-patológicas en 5 grupos. En el primero se incluyen los hígados con atrofia fusca; en el segundo grupo los hígados con tumefacción turbia; en el tercero, cuarto y quinto grupos, se consideran los casos con degeneración grasosa calcificados por simple apreciación del examen anatómo-patológico en escasa, regular o intensa degeneración grasa\*. Para hacer la distinción, se tomó en cuenta tanto el informe macroscópico como el microscópico. De los 50 casos estudiados, 47 tuvieron examen macroscópico, de los cuales 27 se complementaron con examen histológico.

En el gráfico N° 2 se compara el valor de los lípidos totales con las diferentes alteraciones anatómo-patológicas. El valor mínimo se encuentra en la atrofia fusca (8,1 %), le sigue la tumefacción turbia con 9,5 % y por último las degeneraciones grasosas con valores de 10,9 a 16,7 %, según el grado.

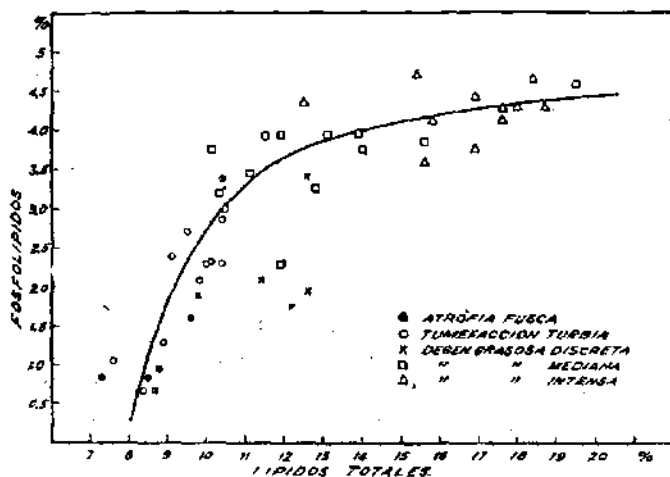
(\*) Debemos agradecer a los Dres. J. Espinoza y J. Altamirano, la realización de los exámenes anatómo-patológicos.

GRÁFICO N° 2  
 Valor de los lípidos totales en relación con el cuadro  
 anátomo-patológico.



En el gráfico N° 3 los puntos de relación entre lípidos totales y fosfolípidos se representan por figuras diferentes, que se refieren a los 5 grupos anátomo-patológicos.

GRÁFICO N° 3  
 Relación entre el informe anátomo-patológico y la dosificación  
 de lípidos en hígados de lactantes distróficos.



Los casos de tumefacción turbia y de atrofia fusca se encuentran agrupados en nuestra curva en la porción inicial de ella, que se caracteriza por un bajo contenido en fosfolípidos con tendencia a un incremento muy acelerado y por un contenido en lípidos totales algo mayor que lo normal y con un incremento proporcionalmente menor que el de los fosfolípidos correspondientes.

Los diferentes grados de infiltración grasosa, que califica el anátomo-patológico en discreta, mediana o intensa, corresponden desde el punto de vista químico a un aumento gradual de los lípidos totales, que se continúan sin transición con los valores de lípidos encontrados en la tumefacción turbia y en la atrofia fusca; a medida que la degeneración grasosa se hace más intensa hay un aumento relativamente menor de los fosfolípidos.

La distribución de los valores de lípidos que se agrupan en forma continua, sin transición brusca, a lo largo de la curva de correlación que hemos descrito, constituye un argumento para suponer que la alteración del metabolismo de los lípidos que se encuentra en los diferentes tipos de degeneración celular que describen los anátomo-patólogos, representa un proceso común en diferentes etapas, sin que existan argumentos suficientes para indicar cuál es el sentido en que se verifican las diferentes etapas en el tiempo, o sea, si el comienzo de las alteraciones está en uno u otro extremo de la curva, o si está en un punto intermedio, de donde puede seguir una evolución en un sentido o en el otro.

Debemos nuevamente lamentar la ausencia de ensayos en hígados completamente normales desde el punto de vista histológico y funcional, ya que nuestra curva de determinaciones de lípidos inicia sus valores con desviaciones importantes en cuanto al contenido de grasas totales y de fosfolípidos respecto a los valores normales señalados en la literatura, tanto en animales como en seres humanos. En efecto, en la mayor parte de los animales y en seres humanos, las cifras normales de lípidos totales fluctúan alrededor de 4 a 5 % y la de fosfolípidos entre 2 y 3 %<sup>17 61</sup>.

No se puede dar una explicación bien fundamentada sobre la forma curiosa cómo varían los fosfolípidos respecto al contenido en lípidos totales, pero conociendo la importancia que tienen aquéllos en la movilización de las grasas, se puede imaginar como que su aumento en las degeneraciones gra-



Es sugestiva la circunstancia que las alteraciones hepáticas encontradas en niños fallecidos por procesos mórbidos diferentes, en cuanto a calidad de ellos y tiempo de evolución, tengan de común el mismo tipo de relación entre lípidos y fosfolípidos.

Ni desde el punto de vista histológico ni desde el punto de vista químico pueden establecerse condiciones características de alguna enfermedad, ya que se encuentran todos los grados de transición para cada enfermedad entre la tumefacción turbia y atrofia fusca por un lado y la intensa degeneración grasa por otro.

Hace pensar que siempre se tratara de una alteración del metabolismo graso del mismo tipo, puesto de manifiesto en distintos periodos de su evolución.

Esto que no pasa de ser una hipótesis de trabajo, puede llegar a tener una importancia práctica terapéutica.

Se sabe que la esteatosis hepática determina un trastorno en el resto de las funciones hepáticas, como se revela por las diferentes pruebas clínicas que estudian el funcionalismo hepático<sup>70 71</sup>.

Puede imaginarse que si se llegara a corregir, por lo menos, en parte la esteatosis hepática, lograríamos también mejorar las otras funciones que tendrían importancia en el metabolismo general del organismo.

Gillman y Gillman<sup>55 56</sup> han logrado por la administración de estómago de cerdo desecado (Ventriculin), corregir en forma espectacular la infiltración grasa del hígado que se observa en los niños afectos de síndrome pelagroide y han observado una mejoría histológica del hígado.

Si se relacionan estos hallazgos con la hipótesis que enunciamos anteriormente, podemos imaginar que sería útil suministrar el extracto de mucosa gástrica en todos los casos de enfermedades graves, con el objeto de poder aprovechar su poder lipotrópico y estudiar si produce algún beneficio clínico.

La importancia que tienen los fosfolípidos en la movilización de las grasas y la relación que ellos tienen con la colina, como ya lo señalamos en la introducción, sugiere el empleo de colina, también como agente lipotrópico, en todos los casos de enfermedades graves.

La colina, que tiende a aumentar la concentración de fosfolípidos en los tejidos, a la vez que acelerará su turnover, ejerce por este doble mecanismo su acción movilizadora de

grasa. No sería extraño entonces que el suministro de colina a pacientes con grave alteración de su metabolismo lipídico, logre modificar la relación de lípidos con fosfolípidos, normalizando el transporte de grasa y que eso traiga un beneficio a la célula hepática y al total del organismo, que se encontraría así en mejores condiciones de resistir el proceso mórbido que lo aqueja.

Actualmente, el Dr. J. Meneghello<sup>79</sup> y la señorita Coronel realizan un estudio en niños que padecen de síndrome poli-carencial, semejante al síndrome pelagroideo de Gillman, en que emplean como terapéutica al cloruro de colina, con lo que hasta ahora han obtenido resultados poco categóricos.

Ya se han hecho otros ensayos tendientes a aprovechar el poder lipotrópico de la colina en casos de cirrosis hepática y otras enfermedades del hígado que se acompaña de infiltración grasa. Los buenos resultados parecen depender del tiempo de evolución del proceso (Russokoff y Blumberg, Broun y Matter<sup>82</sup>).

Danis y Anderson<sup>82</sup> han observado efectos beneficiosos en tres casos de ictericia grave neo-natorum, que se asociaban con hígado graso, con el empleo de cloruro de colina. Witts<sup>108</sup> ha hecho últimamente un resumen del empleo de diferentes dietas y factores alipotrópicos en diversas hepatopatías en forma muy documentada.

#### Resumen.

- 1° Se practicó la determinación post-mortem de lípidos hepáticos en 50 lactantes distróficos. En 47 de ellos se acompañó de estudio macroscópico anátomo-patológico y en 27 de examen histológico.
- 2° Los 50 lactantes estudiados se pueden dividir en 2 grupos: uno con toxicosis (27 casos), con o sin infecciones agregadas, y otro, sin toxicosis (23 casos), en que el fallecimiento se debió a enfermedades agudas o crónicas.
- 3° Se describe la curva de correlación que existe entre los lípidos totales y los fosfolípidos hepáticos. A medida que aumenta la cantidad de lípidos totales, se observa un incremento de los fosfolípidos, que no es directamente proporcional. Al comienzo de la curva los pequeños aumentos de lípidos totales se acompañan de grandes variaciones de fosfolípidos, pero estos últimos tienden a

- estabilizarse en un valor máximo mientras continúa acentuándose el incremento de lípidos totales.
- 4º El colesterol sigue un aumento directamente proporcional al de los lípidos totales.
- 5º Las cifras de lípidos y fosfolípidos se agrupan con bastante regularidad junto a la curva de correlación descrita, sin que se observe agrupación especial en ninguna de las enfermedades agudas.
- En las enfermedades crónicas y en los casos de caquexia, tienden a agruparse en la porción inicial de la curva.
- 6º Hay acuerdo entre los exámenes químicos y los anátomo-patológicos, de modo que a mayor degeneración grasa corresponde un aumento de los porcentajes de lípidos. En la atrofia fusca se encuentran los valores mínimos de lípidos y en la tumefacción turbia los valores intermedios.
- 7º El porcentaje que los fosfolípidos representan del total de los lípidos, experimenta un ascenso máximo en las degeneraciones grasas discretas y tiende a disminuir a medida que se intensifica la degeneración. Se interpreta este fenómeno como un mecanismo compensador, que tiene por objeto movilizar las grasas del hígado.

#### Summary

Post mortem lipid determinations were made in 50 cases of undernourished infants. Twenty seven cases had suffered dehydration (toxicosis) with or without secondary infections and twenty three cases died on account of different chronic and acute diseases.

A description is given about total lipids and phospholipids correlations. When total lipids increased, an increment of phospholipids that is not directly proportional is observed. At first a small increment of total lipids are followed by big variations in phospholipids, but this last one has a tendency to establish itself at a maximum level while total lipids continued increasing.

Cholesterol follows a directly proportional increase with total lipids.

Lipids and phospholipids rate are grouped very frequently close to the correlation curve described, without observing any especial group in any one of the acute diseases.



In chronic diseases or in cachexy they try to group in the first part of the curve.

A correlation is found between chemical and pathological examinations, so that with a great fat degeneration an increase of lipids rate is found.

The percentage that phospholipids represent in total lipids has a maximum level in mild fat degeneration and tends to decrease as soon as the degeneration increases. This phenomenon is explained as a compensator mechanism that tries to mobilize the liver fats.

### Bibliografía.

- 1.—ASCHOFF, L. — Tratado de Anatomía Patológica. Edit. "Labor". Barcelona (1934).
- 2.—ARTOM, C. — Some data on the distribution of individual phospholipids in rat tissues and in human plasma. *J. Biol. Chem.* 157; 595 (1945).
- 3.—BAKER, J. R. — *Quart. J. Micr. Sci.* 84; 73 (1942). Cit. por Frazer A. C. *Physiol. Rev.* 26; 103 (1946).
- 4.—BARNES, R. H. & MILLER, E. S. — The adrenals and fat absorption. *J. Biol. Chem.* 140; 241 (1941).
- 5.—BAVETTA, L. A.; HALLMAN, J. H.; DEVEL, J. & GREELEY, P. — The effect of adrenalectomy on fat absorption. *Am. J. Physiol.* 134; 619 (1941).
- 6.—BEST, C. H.; HERSHEY, J. M. & HUNTSMAN, M. E. — The effect of lecithine on fat deposition in the liver of the normal rat. *J. Physiol.* 75; 76 (1932).
- 7.—BEST, C. H.; HERSHEY, J. M. & HUNTSMAN, M. E. — The effects of the components of lecithine upon deposition of fat in the liver. *J. Physiol.* 75; 405 (1932).
- 8.—BEST, C. H. & HUNTSMAN, M. E. — The effect of the choline on the liver fat of rats in various states of nutrition. *J. Physiol.* 83; 255 (1934).
- 9.—BEST, C. H. & CAMPBELL, J. — The effect of anterior pituitary extracts on the liver fat of various animals. *J. Physiol.* 92; 91 (1936).
- 10.—BEST, C. H. & RIDOUT, J. H. — Undernutrition and liver fat. *J. Physiol.* 94; 47 (1938-39).
- 11.—BEST, C. H.; MAC-LEAN, D. L. & RIDOUT, J. H. — Choline and liver fat in phosphorus poisoning. *J. Physiol.* 83; 275 (1935).
- 12.—BEST, C. H. & CAMPBELL, J. — Anterior pituitary extract and liver fat. *J. Physiol.* 86; 191 (1936).

- 13.—BEVERIDGE, J. M. R. & LUCAS COLIN, C. — The effect of the nature and level of protein and amino-acids intake upon the accumulation of fat in the liver. *J. Biol. Chem.* 154; 9 (1944).
- 14.—BEVERIDGE, J. M. R. & LUCAS COLIN, C. — The effect of dietary proteins and amino-acids in liver fat. *J. Biol. Chem.* 160; 505 (1945).
- 15.—BEVERIDGE, J. M. R. & LUCAS COLIN, C. — Effect of dietary fat on the lipotropic action of inositol. *J. Biol. Chem.* 157; 311 (1945).
- 16.—BLOOR, W. R. — The oxidative determination of phospholipid in blood in tissues. *J. Biol. Chem.* 82; 273 (1929).
- 17.—BLOOR, W. R. — *Biochemistry of the fatty acids*. Reinhold Publishing Corporation, New York (1943).
- 18.—BOXER, G. E. & STETTEN, D. — The role of thiamine in the synthesis of fatty acids from carbohydrate precursors. *J. Biol. Chem.* 153; 607 (1944).
- 19.—BOXER, G. E. & STETTEN, D. — The effect of dietary choline upon the rate of turnover of phosphatide choline. *J. Biol. Chem.* 153; 617 (1944).
- 20.—CLARK, W. G. & WICK, A. N. — Effect of adrenalectomy on fat absorption measured by excretion in the stool. *Proc. Soc. Exper. Biol.* 42; 336 (1929).
- 21.—CLARK, W. G. & MAC KAY, E. — Influence of adrenalectomy upon the rate of glucoso. absorption from the intestine. *Am. J. Physiol.* 137; 104 (1942).
- 22.—CLARK, D. & ELLERT, M. L. — Lipotropic action of lipocaic. *Am. J. Physiol.* 144; 620 (1945).
- 23.—CROIZET, E. — *Curso de Anatomía Patológica* (1945).
- 24.—CRUZ-COKE, E. — *Curso de Química Fisiológica* (1945).
- 25.—CHAIKOFF, I. L.; ENTENMAN, C. & MONTGOMERY, L. — The mechanism of action of the antifatty liver factor of the pancreas. I. Its relation to plasma choline. *J. Biol. Chem.* 160; 387 (1945).
- 26.—CHAIKOFF, I. L.; ENTERMAN, C. & MONTGOMERY, L. — The mechanism of action of the antifatty liver factor of the pancreas. II. Free methionine prevents fatty livers in completely depancreatized dogs maintained with insulin and fed a lean meat diet. *J. Biol. Chem.* 160; 480 (1945).
- 27.—CHANNON, H. J.; MILLS, G. T. & FLATT, A. P. — The action of Aminoacids and proteins in liver fat deposition. *Biochem. J.* 37; 483 (1943).

- 28.—CHERRY, I. S. & GRANDALL, L. A. — The specificity of pancreatic lipase; its appearance in the blood after pancreatic injury. *Am. J. Physiol.* 100; 265 (1932).
- 29.—DEGKWITZ, R. — Tratado de Pediatría. Edit. "Labor". Barcelona, 1935.
- 30.—EDITORIAL. — Deposition of Lipids the liver. *J. A. M. A.* 110: 2084 (1933).
- 31.—ELKES, J. J. & FRAZER, A. C. — The relationship of phospholipin to the absorption of unhydrolysed fat from the intestine.
- 32.—ENGEL, W. R. — The relation of B Vitamins and dietary fat to the trophic action of choline. *J. Nutrition* 24; 175 (1942).
- 33.—ENTENMAN, C. & CHAIKOFF, I. L. — On the determination of choline in the liver and plasma of the dog. *J. Biol. Chem.* 160: 377 (1945).
- 34.—ENTENMAN, C. & CHAIKOFF, I. L. — The preparation of fractions from pancreas that prevent fatty livers in depancreatized dog maintained with insulin. *J. Biol. Chem.* 155; 573 (1944).
- 35.—ENTENMAN, C.; CHAIKOFF, I. L. & FRIEDLANDER, H. D. — The influence of ingested choline upon choline containing phospholipids of the liver as measured by radioactive phosphorus. *J. Biol. Chem.* 162; 111 (1946).
- 36.—ENTENMAN, C.; CHAIKOFF, I. L. & ZILVERSMITH, D. B. — Removal of plasma phospholipids as a function of the liver: the effect of exclusion of the turnover rate of plasma phospholipids as measured with radioactive phosphorus. *J. Biol. Chem.* 166; 15 (1946).
- 37.—FAIRBAIN, D. — Free fatty acids in animals tissues. *J. Biol. Chem.* 157; 645 (1945).
- 38.—FINKELSTEIN, H. — Tratado de las enfermedades del niño de pecho. Edit. "Labor". Barcelona (1929).
- 39.—FISHLER, C. M.; ENTENMAN, C.; MONTGOMERY, M. L. & CHAIKOFF, I. L. — The formation of phospholipids by the hepatomized dog as measured with radioactive phosphorus. I. The site of formation of plasma phospholipids. *J. Biol. Chem.* 150; 47 (1943).
- 40.—FISHMAN, W. H. & ARTOM, C. — The relation of the diet to the composition of tissue phospholipids. I. The normal lipids of the rat, with a note on the analytical procedures. *J. Biol. Chem.* 148; 405 (1943).
- 41.—FISHMAN, W. H. & ARTOM, C. — II. Changes in tissue phospholipids induced by experimental diets. *J. Biol. Chem.* 148; 243 (1943).
- 42.—FISHMAN, W. H. & ARTOM, C. J. — III. Effect of supplemented experimental diets on tissue phospholipids in rats of two age group. *J. Biol. Chem.* 148; 243 (1943).

- 42.—FISHMAN, W. H. & ARTOM, C. — IV. The action of choline precursors in weaning a rats. *J. Biol. Chem.* 154; 109 (1944).
- 44.—FISHMAN, W. H. & ARTOM, C. — V. The action of choline, vitamins, amino acids and their combinations in two-month old rats. *J. Biol. Chem.* 154; 117 (1944).
- 45.—FOGLIA, G. VIRGILIO. — Importancia de la colina en la nutrición. *Medicina.* 2: 530 (1942). Buenos Aires.
- 46.—FORBES, J. C. — Lipotropic action of Inositol. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 54: 99 (1943).
- 47.—FRAZER, A. C. — The absorption of triglyceride fat from the intestine. *Physiological Reviews.* 26: 103 (1945).
- 48.—FRAZER, A. C. — Lipolysis and fat absorption, *J. Physiol.* 102: 329 (1943).
- 49.—FRAZER, A. C. — Differentiat on in the absorption of live oil land olei acid in the rat. *J. Physiol.* 102: 306 (1942).
- 50.—FRAZER, A. C. & SAMONS, H. C. — The formation of Mono and Diglycerides during the hydrolysis of Triglyceride by Pancreatic Lipase. *Biochem J.* 39; 122 (1945).
- 51.—FRAZER, A. C.; SCHULMAN, J. H. & STEWART, H. C. — *J. Physiol.* 103; 306 (1944).
- 52.—FRAZER, A. C. & WALSH, V. G. — An apparatus for the production of finely dispersed emulsions, and the rate of digestion of fat by lipase in relation to the surface area. *J. Physiol.* 78; 467 (1943).
- 53.—FRIEDLANDER, H. D.; CHAIKOFF, I. L. & ENTENMAN, C. — The effect of ingested choline on the turnover of plasma phospholipids. *J. Biol. Chem.* 158; 121 (1945).
- 54.—GAVIN, G.; PATTERSON, J. M. & MC HENRY, W. E. — Comparison of the lipotropic effect of choline, inositol and lipocaic in rats. *J. Biol. Chem.* 148; 275 (1943).
- 55.—GILLMAN, I. & GILLMAN, J. — Hepatic Damage in infantile Pellagra. *J. A. M. A.* 129; 12 (1945)
- 56.—GILLMAN, J. & GILLMAN, J. — *Archives of Internal Medicine.* 76; 64 (1945).
- 57.—GILLMAN, T. & GILLMAN, J. — Structure of the liver in Pellagra. *I. A. M. A.* 128; 46 (1945).
- 58.—GRIPPEITH, H. & W. MULFORD, I. D. — Choline Metabolism. I. *Nutrition.* 21; 633 (1941).
- 59.—HANDLER, P. & BERNHELM, F. — The effect of choline deficiency on the fat content of regenerate liver. *J. Biol. Chem.* 148; 649 (1943).
- 60.—HANDLER, P. — The effect of simultaneous mineral and choline deficiencies on liver fat. *J. Biol. Chem.* 149; 291 (1943).
- 61.—HALLIDAY, N. — Lipid, carbohydrate and moisture content of the liver in Diabetes mellitus. *J. of laboratory and Clinical Med.* 25; 926 (1946).

- 62.—HARRISON, H. C. & LONG, C. N. — The regeneration of liver protein in the rat. *J. Biol. Chem.* 161; 545 (1945).
- 63.—HONORATO, R. & CARVAJAL, L. — Estudio experimental sobre el metabolismo de las grasas del hígado. *Rev. Med. de Chile.* 70; 444 (1942).
- 64.—HONORATO, R. & MOLINA, H. — Colina y Vitamina K. *Rev. Med. de Chile.* 70; 715 (1942).
- 65.—HORNING, M. G. & ECKSTEIN, H. C. — The influence of supplementary casein, cystine, and methionine on liver, lipid content of adult rats. *J. Biol. Chem.* 155; 49 (1944).
- 66.—HORNING, M. G. & ECKSTEIN, H. C. — Influence of choline and methionine on phospholipide activity and total lipid content of livers of young white rats. *J. Biol. Chem.* 166; 711 (1946).
- 67.—HOUSSAY, BERNARDO. — *Fisiología Humana*. Edit. "El Ateneo". Buenos Aires (1945).
- 68.—JULIAN, O. C.; CLARK, D. E. VAN PTOHASKA, J. VAN; VERMEULEN, C. & DRAGSTEDT, L. — The antagonistic effect of lipocain and the anterior pituitary on fat metabolism. *Am. J. Physiol.* 138; 264 (1943).
- 69.—LEHNINGER, A. L. — A quantitative study of the products of fatty acid oxidation in liver suspensions. *J. Biol. Chem.* 164; 291 (1946).
- 70.—LI T. W.; FREEMAN, S.; HOUGH, V. H. & GUNN, F. D. — The increased susceptibility of protein-deficient dogs to benzene poisoning. *A. J. Physiol.* 45; 166 (1945).
- 71.—LI T. W. & FREEMAN, S. — Effect of protein deficiency and cholesterol feeding on the liver of dogs. *Am. J. Physiol.* 145; 646 (1946).
- 72.—MAC BRYDE, C. M.; CASTRODALE, D.; HELWIG, E. B. & BIERBAUM, O. — Hepatic changes produced by estrone, estradiol, and diethylstilbestrol. *J. A. M. A.* 118; 1278 (1942).
- 73.—MAC FARLAND, M. L. & MAC HENRY, E. W. — The dietary production of fatty livers resistant to the action of choline. *J. Biol. Chem.* 159; 605 (1945).
- 74.—MAC FARLANE, M. G. & KNICHT, B. C. G. — The Biochemistry of Bacterial Toxins. *Biochem. J.* 35; 885 (1941).
- 75.—MAC LACHLAND, P. L.; CARPENTER, H.; BLOOR, W. R.; WELCH, E. A.; TRAU, F. L. & TAYLOR, J. D. — Lipids on the fasting mouse. *J. Biol. Chem.* 143; 473 (1942).
- 76.—MAC HENRY, E. W. & PATTERSON, J. M. — Lipotropic factors. *Physiological Review.* 24; 128 (1944).
- 77.—MC LEAN, D. L. & BEST, C. H. — Choline and liver fat. *Brit. J. Exp. Path.* 15; 193 (1934).

- 78.—MELLANBY, J. — The digestion and Absorption of fat. *J. Physiol.* 64; 5 P. (1927).
- 79.—MENEGHELLO, J. — Comunicación personal.
- 80.—MENGHELLO, J.; ROSSELOT, J. & UNDURRAGA, O. — Estudios en el lactante distrófico. Penicilina en la lúcs congénita. *Rev. Chil. de Pediat.* 17; 733 (1946).
- 81.—MONTGOMERY, M. L.; ENTENMAN, C. & CHAIKOFF, I. L. — Pancreatic juice is a rich source of the anti-fatty-liver factor. *Am. J. Physiol.* 148; 293 (1947).
- 82.—MOSQUERA, A. OSCAR. — Esteatosis hepática: Los factores lipotrópicos. *Archivos Argentinos Pediatría.* 25; 357 (1946).
- 83.—NIEMEYER, H. — Contribución al estudio del Metabolismo de la célula hepática. Tesis de Prueba (1942). Santiago-Chile.
- 84.—OCHOA, S. & ROSSITER, R. J. — Adrenal Cortex and phosphorylation. of vitamin B1. *J. Physiol.* 97; 1P (1940).
- 85.—PATTERSON, J. M. & MC HENRY, E. W. — I. Choline and the prevention of hemorrhagic kidneys in the rat. *J. Biol. Chem.* 145; 207 (1942).
- 86.—PATTERSON, J. M.; KEEVIL, N. B. & MC HENRY, E. W. — Choline and the prevention of hemorrhagic kidneys in the rat. II. Phospholipid turnover determined with radioactive phosphorus. *J. Biol. Chem.* 153; 489 (1944).
- 87.—PATTERSON, J. M. & MC HENRY, E. W. — Choline and the prevention of hemorrhagic kidneys in the rat. III. Amounts of water, nitrogen, total lipid, and choline in livers and kidneys. *J. Biol. Chem.* 156; 265 (1944).
- 88.—PERLMAN, I & CHAIKOFF, I. L. — Radioactive phosphorus as an indicator of phospholipid metabolism. *J. Biol. Chem.* 127; 211 (1939).
- 89.—FFAUNDLER, M. & SCHLOSSMANN, A. — Tratado Enciclopédico de Enfermedades de la Infancia. Edit. F. Seix. Barcelona (1933).
- 90.—FOTTER, R. L.; AXELROD, A. E. & ELVEHJEM, C. A. — The riboflavin requirement of the fog. *J. Nutrition.* 24; 449 (1942).
- 91.—RIEBERT, H. & STERNBERG, C. — Tratado de Patología General y Anatomía Patológica. Edit. "Labor". Argentina (1939).
- 92.—ROBINSON, C. S. — The hydrogenion concentration of the contents of the small intestine. *J. Biol. Chem.* 108; 403 (1945).
- 93.—SCHAEFER, A. E.; MC KIBBIN, J. M. & ELVEHJEM, C. H. — Pantothenic and deficiency studies in dog. *J. Biol. Chem.* 143; 321 (1942).
- 94.—SCHEFF, G. & HORNER, E. — Das Verhalten der Leberlipide bei experimentellen infektionen. *Biochem Z.* 248; 181 (1932).
- 95.—STETTEN, D. W. & SALCEDO, J. — The Source of the Extra Liver fat in various types of fatty Liver. *J. Biol. Chem.* 156; 27 (1944).

- 96.—STILLMAN, N.; ENTENMAN, C.; ANDERSON, E. & CHAIKOFF, I. L. — Phosphorylation of fat in absence of adrenal glands as measured with radio active phosphorus. *Endocrinol.* 31; 481 (1942).
- 97.—TAUROG, ALVIN; ENTEMAN, G. & CHAIKOFF, I. L. — The choline containing and non choline containing phospholipids of plasma. *J. Biol. Chem.* 156; 385 (1944).
- 98.—TREADWELL, C. R.; TIEDWELL, H. C. & GAST, J. H. — The relation ship of methionine to fatty liver production and grhwth. *J. Biol. Chem.* 156; 237 (1944).
- 99.—VAN PROHASKA, J.; DRAGSTEDT, L. R. & HARMS, H. P. — *Am J. Physiol.* 117; 166 (1936).
- 100.—VERZAR, F. & LASZT, L. — Die Hemmung der Fettersorption nach Extirpation der Nebennieren. *Biochem Z.* 276; 11 (1935).
- 101.—WILLSTÄTTER, R. & MEMMEN, P. — Über die Wirkung der Pankreaslipase auf vers chiedene substrate. *Hoppe-Sylers Ztschr.* 133; 229 (1924).
- 102.—WINTROBE, M. M. and cols. — Pyridoxine Deficiency in Swine Buli. *Johns Hopkins Hosp.* 72; 1 (1943).
- 103.—WITTS, L. J. — Dieteric factors in Liver Disease. *British Medical Journal.* Enero 1; 45 (1947).
- 104.—WOTTON, R. M. & ZWEMER, R. L. — Studies on direc and visible ingestion of fat by differentiated body cells of the cat. *The Anatomical Record.* 75; 493 (1939).