

## ACTIVIDAD ENZIMATICA TISULAR EN EL NIÑO CON DESNUTRICION AVANZADA<sup>1, 2</sup>

DRES. SILVESTRE FRENK,<sup>3</sup> JACK METCOFF<sup>4</sup> y TAKASHI YOSHIDA<sup>4</sup>

LA MEDICIÓN de la actividad enzimática en sangre, jugos digestivos y tejidos de sujetos humanos desnutridos, ha tenido variados propósitos, entre los que destacan la caracterización clínica de estados carenciales, la definición de parámetros que expliquen alteraciones bioquímicas conocidas y el conocimiento de mecanismos patogénicos.

Las determinaciones enzimáticas en el *plasma sanguíneo* de niños con desnutrición proteico-calórica grave, son a la fecha muy numerosas. Sin embargo, estas mediciones son difíciles de interpretar. Aun haciendo a un lado las variaciones debidas a fluctuaciones en el contenido acuoso del suero, los hallazgos de niveles altos pueden indicar, bien daño celular con salida de enzimas, bien concentraciones altas de enzimas celulares, en relación a la síntesis de proteínas estructurales, a la vez que aumento en la permeabilidad de las

membranas. Estos y otros factores explican que, en el terreno de la Nutriología humana, no haya sido posible hasta ahora obtener una visión clara de las relaciones existentes entre actividades enzimáticas sanguíneas y estado nutricional de los pacientes.<sup>1</sup>

Con referencia a los tejidos, se tropieza con la dificultad de que la medición de una sola enzima, aislada *in vitro*, es altamente artificial. En la célula viva, actúan numerosas variables determinadas por interrelaciones de sustratos diversos, cofactores, inhibidores y bloqueadores. Además de que ninguna enzima actúa por completo independientemente de otras, en todo estudio de actividades enzimáticas y en particular cuando se trata de reacciones sintéticas acopladas a la producción de energía, es menester conservar alguna integridad estructural. Por todo esto, cuando determinada situación patológica se asocia a cambios en actividad enzimática, ello no necesariamente indica disminución en la cantidad de la enzima, sino que pudiera deberse a modificaciones en relaciones estructurales.<sup>2, 3</sup>

Como se observa en la Tabla 1, hasta 1960 las escasas determinaciones de actividad enzimática en *tejidos* de huma-

<sup>1</sup> Trabajo presentado en la sesión ordinaria del 22 de noviembre de 1967.

<sup>2</sup> Apoyado, en parte, por Fondos de Investigación donados por el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos de Norteamérica, Núms. AM 01520-05 a 07, AM 1326-C5 y 07434-01 a 03.

<sup>3</sup> Académico numerario, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social.

<sup>4</sup> Departamento de Pediatría. Hospital Michael Reese, Chicago, Ill.

TABLA I  
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN TEJIDOS DE NIÑOS DESNUTRIDOS  
(Modificado de Metcoff<sup>3</sup>)

HALLAZGOS:		
<i>Disminución</i>	<i>Ningún cambio</i>	<i>Aumento</i>
<i>En hígado:</i>		
Colinesterasa <sup>1, 4, 5</sup>	Transaminasa <sup>4</sup>	Dehidrogenasa málica <sup>4</sup>
Dehidrogenasa glutámica <sup>4</sup>	Citocromo-oxidasa <sup>4</sup>	Transaminasa <sup>5</sup>
Succinoxidasa <sup>4</sup>	DPN-citocromo-reductasa <sup>4</sup>	Fosfatasa alcalina <sup>7</sup>
Xantino-oxidasa <sup>5</sup>	Dehidrogenasa láctica <sup>4</sup>	Catalasa <sup>7</sup>
D-Aminoácido-oxidasa <sup>5</sup>	Dehidrogenasa málica <sup>5</sup>	
Transaminasa glutámico-pirúvica <sup>6</sup>	DPNH-dehidrogenasa <sup>5</sup>	
Dehidrogenasa málica <sup>6</sup>	Glicolato-oxidasa <sup>5</sup>	
Dehidrogenasa isocítrica <sup>6</sup>		
<i>En mucosa intestinal:</i>		
Lactasa <sup>8, 9, 10</sup>	Maltasa <sup>10</sup>	
	Sacarasa <sup>10</sup>	
<i>En músculo esquelético:<sup>11</sup></i>		
Piruvato cinasa	Dehidrogenasa láctica	
Dehidrogenasa málica		
Dehidrogenasa isocítrica		
Dehidrogenasa glutámica		
<i>En leucocitos:<sup>12</sup></i>		
Piruvato cinasa	Dehidrogenasa láctica	
	Dehidrogenasa málica	

NOTA: La aparición de la misma enzima en varias columnas, indica desacuerdo entre los autores.

nos desnutridos, habían sido realizadas principalmente en homogenados de hígado; se había encontrado que los sistemas cuyas actividades estaban más gravemente afectadas eran de aquellos cuya función normal y sobre todo, su relación con la fisiopatología de la desnutrición proteico-calórica, eran mal conocidas. Tal es el caso de pseudocolinesterasa, D-aminoácido oxidasa y xantinoxidasa. En cambio, enzimas como la citocromoreductasa, elemento esencial en la cadena respiratoria, se encontraron bien preservadas, por más que

esta enzima es una flavoproteína, y que muchos de los niños en que fue medida tenían manifestaciones clínicas atribuidas a arriboflavinosis.<sup>4, 5</sup>

Otros estudios, más sofisticados, mostraron que en el hígado del niño desnutrido la respiración y las funciones de fosforilación oxidativa son normales, a juzgar por la captación de oxígeno del malato, aunque pudo demostrarse discreta reducción de la incorporación de fosfatos a los fosfátidos.<sup>13</sup> Esto último se interpretó en el sentido de que existía daño funcional creciente, a me-

dida que era mayor la complejidad de cada sistema. Diferencia más notoria entre hígados normales o desnutridos aparecen si el homogenado se mantiene por varias horas a 0°C, o si se le incubaba a 37°C; en esas condiciones, la respiración y la fosforilación se afectan en forma mucho más pronunciada en el hígado desnutrido que en el normal. Ya que estas funciones dependen de la integridad de las mitocondrias, los citados hallazgos se han atribuido a una disminución de la estabilidad de estas organelas en hígados desnutridos.<sup>13</sup> En favor de tal inestabilidad de las mitocondrias, están también las observaciones de autores chilenos, quienes encontraron marcada distorsión de su arquitectura en la mucosa intestinal de niños con desnutrición avanzada.<sup>14</sup> Por otro lado, los trabajos del grupo brasileño de Cat<sup>15</sup> demostraron que sarcosomas extraídos del miocardio, clínica y anatomopatológicamente afectado, de un niño muerto de kwashiorkor, conservaban respiración y fosforilación oxidativa normales.

Otros intentos de caracterización bioquímica de la desnutrición proteicocalórica, realizados empleando glucosa y metabolitos marcados con carbono radiactivo, han revelado que la producción de bióxido de carbono a partir de acetato, glucosa y piruvato, es menor en los pacientes que en testigos.<sup>16</sup> De los datos aportados por este trabajo, se concluye que la diferencia metabólica entre pacientes desnutridos y sujetos normales es cuantitativa más que cualitativa.

Uno de los objetivos de estudios en-

zimáticos en órganos y sus secreciones es conocer las lesiones bioquímicas básicas de ciertos signos clínicos o alteraciones patológicas. Tal es el caso de las mediciones de actividad enzimática en jugo duodenal, o de las determinaciones de disacaridasas intestinales.<sup>8, 9, 10</sup> Por su índole especial, estas actividades enzimáticas no serán motivo de mayor comentario en esta comunicación.

Significación diferente tienen las actividades enzimáticas relacionadas con los patrones de composición corporal propios de niños con desnutrición avanzada. En un trabajo anterior presentado a esta Corporación, se hizo notar que el cuadro bioquímico que comúnmente se observa en el músculo estriado de pacientes hospitalizados por o con desnutrición proteicocalórica grave descompensada, puede caracterizarse por aumento patológico en la hidratación y en las concentraciones intracelulares de sodio y fosfatos inorgánicos, y por reducción en las de potasio, magnesio y fosfatos orgánicos.<sup>17</sup> También se ha observado en el músculo de estos pacientes una disminución en la concentración intracelular de fosfoenolpiruvato, piruvato, citrato, alfa-cetoglutarato y oxaloacetato. Los antecedentes, el cuadro clínico, comprendiendo tipo de desnutrición, presencia, índole y magnitud de infecciones y de desequilibrio electrolítico y la evolución de los pacientes, constituyen variables que dificultan considerablemente la interpretación de la información obtenida de estudios transversales. No obstante, pudieron obtenerse correlaciones estadísticamente válidas entre la mayoría de los datos

obtenidos<sup>11</sup> que, aunque no deben ser interpretadas como evidencia inequívoca de alteraciones en eventos metabólicos, sí son compatibles con tal posibilidad. Así, los análisis de matrices de correlación múltiple revelaron que cuando se emplean variaciones simultáneas en fosfoenolpiruvato, piruvato, alfa-cetoglutarato y oxaloacetato como variable independiente, pueden ser predichas las concentraciones celulares alteradas de sodio, potasio y agua. Los metabolitos mencionados representan sustratos selectos o productos de los ciclos glicolítico y metabólico común, en tanto que los iones estudiados han sido identificados como cofactores, activadores o inhibidores de la síntesis o utilización de dichos metabolitos, dentro de secuencias metabólicas productoras de energía. A la vez, las propias concentraciones iónicas en el medio intracelular son normalmente mantenidas por el metabolismo energético de la célula.<sup>18</sup> En efecto, la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato, dependiente de adenosindifosfato (ADP) y productora de energía metabólica a través de la formación de una molécula de ATP, requiere  $Mg^{++}$  como cofactor, es activada por concentraciones fisiológicas de  $K^+$  e inhibida por concentraciones elevadas de  $Na^+$ ;<sup>19</sup> factores todos ellos que, como se señala, se hallan francamente alterados en el músculo de niños desnutridos.

La piruvatocinasa, enzima de baja actividad, que gobierna en un solo sentido este paso crítico en el ciclo glicolítico, ha sido objeto de profundo interés en tiempos recientes en cuanto a su relación con factores nutricionales

y hormonales. Así Krebs ha comprobado que el ayuno disminuye la actividad de la enzima, en tanto que la realimentación con carbohidratos la induce.<sup>20</sup> Acorde con lo anterior, se encuentra reducción de la actividad de esta enzima en el hígado de ratas aloxanizadas, en tanto que la insulina induce nueva síntesis, que por lo demás puede ser prevenida mediante actinomicina D, inhibidor de la síntesis de ácido ribonucleico.<sup>21</sup> Se ha sugerido que junto con la glucocinasa y la fosfofructocinasa, la piruvatocinasa ocupe la misma unidad funcional genética (genoma).<sup>22</sup>

Esta enzima parece intervenir en la regulación de la glicólisis y la gluconeogénesis en respuesta a condiciones nutricionales variadas, al ocupar una posición clave entre las vías metabólicas que conducen selectivamente al almacenamiento de glucógeno o a la acumulación de grasa en el hígado.<sup>20</sup>

Conforme al criterio utilizado en el estudio conjunto cuyos datos se comentan, en alícuotas de la misma muestra se midieron intermediarios metabólicos y las enzimas con ellos relacionadas.<sup>11</sup> Las actividades de piruvatocinasa, dehidrogenasa málica y dehidrogenasa isocítrica se encontraron notablemente reducidas en el músculo estriado. Con variaciones individuales considerables, sujetos desnutridos presentaron actividad de  $12.0 \pm 3.7$  contra  $32.5 \pm 6.2$  mM/min/100 g sólidos desgrasados en los testigos; en cuanto a la dehidrogenasa málica, los valores encontrados en desnutridos y testigos fueron de  $29 \pm 5.5$  y de  $42.2 \pm 2.8$ , y para la dehidrogenasa isocítrica, de  $4.3 \pm 1.0$  y  $13.1 \pm 2.4$  mM/min/100 g sólidos

sin grasa, respectivamente. Únicamente la dehidrogenasa láctica acusó valores normales en los desnutridos ( $20.2 \pm 5.4$  contra  $18.1 \pm 3.3$  mM/min/100 g sólidos sin grasa).<sup>11</sup>

Habitualmente, las actividades enzimáticas son determinadas en sistemas óptimos *in vitro*. Dada la alteración de sustratos y cofactores que caracteriza al músculo de desnutridos, se consideró interesante estudiar la actividad enzimática en un medio semejante, hasta donde se puede reproducir, al líquido intracelular del músculo de donde provenía la enzima medida. Las anomalías de composición intracelular que caracterizan al niño desnutrido son tales, que explican que la piruvato-cinasa sea, de todas las enzimas estudiadas, la más afectada. Conforme a lo anterior, se practicaron estudios de cinética de esta enzima, a concentraciones crecientes de fosfoenolpiruvato, en cuatro sistemas iónicos donde las concentraciones de  $K^+$  y  $Na^+$  variaron de niveles fisiológicos a anormales, tales como los observados en la desnutrición proteicoalórica, como sigue:

Sistemas	Na	mM/L	K
a	16.8		147
b	50.2		147
c	16.8		63
d	50.2		63

Para los cálculos se utilizó la diferencia entre la densidad óptica a 340 mU al inicio y 60 segundos después de comenzada la reacción, determinándose

velocidad inicial (v) en micromolas/minuto/gramos de sólidos secos sin grasa. Después de promediar las velocidades iniciales, se calcularon la velocidad máxima (V) y la constante de Michaelis (Km) para cada uno de los sistemas señalados, de acuerdo con la fórmula de Lineweaver y Burk:  $1/v = (Km/V \cdot (1/s) + 1/V$ .<sup>23</sup> Se analizaron casi siempre homogenizados de músculo de un testigo y de un desnutrido, en forma paralela.

Este experimento fue llevado a cabo en tres niños con desnutrición avanzada y tres testigos no desnutridos. Los resultados muestran que para cada concentración de fosfoenolpiruvato y en cada sistema de iones, la velocidad inicial de la reacción fue menor en desnutridos que en los testigos. La velocidad máxima de la reacción, estuvo considerablemente disminuida en los niños desnutridos; según el sistema empleado, los promedios de los casos estudiados fueron, en los desnutridos, de 5.35 a 7.78 y de 32.20 a 37.48  $\mu$ M/g sólidos sin grasa/60 segundos a 37°C, en los testigos.

Independientemente de estos valores, la progresión del sistema iónico de lo próximo a lo más anormal, dio lugar a una pequeña pero progresiva reducción de la velocidad máxima, cosa que no ocurrió en los testigos. Km disminuyó ligeramente en los desnutridos, y se elevó en los testigos pero se mantuvo cerca del valor de  $7.5 \times 10^{-5}$  M obtenido experimentalmente con enzima purificada.<sup>24</sup>

Cuando se estudió la enzima procedente de músculos normales en un medio en que se mantenía constante la

concentración de  $K^+$  a niveles fisiológicos (147) o francamente anormales (63), la elevación del sodio, de concentraciones normales a patológicamente elevadas, originó inhibición de tipo mixto. En cambio, con la enzima de sujetos desnutridos, ensayada en las mismas condiciones, la inhibición por niveles altos de  $N^+$  fue no competitiva.

Por otro lado, si la representación gráfica se hace con respecto a constancia de  $Na^+$ , a niveles normales o anormalmente altos, la reducción de  $K^+$  dio lugar, en los testigos, a un patrón de inhibición incompetitiva o "acoplamiento", sugiriendo que los requerimientos de la enzima por  $K^+$  difieren de los normales.<sup>24</sup> Todo lo anterior parece indicar que además de ser cuantitativamente deficiente, la síntesis de piruvatoquinasa es también cualitativamente defectuosa en niños desnutridos, y que quizá existe en ellos una alteración fundamental en la estructura o en el arreglo intramolecular de la enzima.<sup>11</sup>

De comprobarse que a través de arreglos estructurales, la enzima, sintetizada en un medio depauperado en fosfoenolpiruvato y potasio, cancelara los efectos de bajas concentraciones de este ion,<sup>24</sup> estaríamos en presencia de un mecanismo adaptativo más de los muchos que caracterizan al niño y al adulto que sobreviven con desnutrición proteicoalébrica grave. Por lo demás, es interesante señalar que se han descrito alteraciones en la estructura molecular de la propia piruvatoquinasa en eritrocitos de pacientes con anemia hemolítica

por deficiencia congénita de esta enzima.<sup>25</sup>

Mediciones similares han sido realizadas en leucocitos de la sangre periférica. Este tejido tiene como ventaja que sus elementos celulares pueden ser aislados fácilmente, sin daños irreversibles. Poseen sistemas metabólicos completos, semejantes a los del músculo, aunque la glicolisis, que se considera esencial para la captación de partículas, es más activa que el ciclo metabólico común;<sup>26-27</sup> no se ha podido demostrar en los leucocitos el efecto Pasteur-Meyerhof. Por lo demás, en el plano patológico se ha observado disminución en la actividad fagocitaria y en el contenido de fosfatasa alcalina (valorada por tinción histoquímica) en leucocitos de niños guatemaltecos con desnutrición proteicoalébrica.<sup>28</sup>

La medición de intermediarios metabólicos en leucocitos aislados de la sangre periférica en niños mexicanos,<sup>29</sup> mostró reducción significativa en el contenido de oxaloacetato, piruvato y lactato; en contraste con lo observado en el músculo esquelético, el contenido de fosfoenolpiruvato, alfa-cetoglutarato y malato fue normal. El análisis de adeninonucleótidos mostró reducción en el contenido de adenosintrifosfato (ATP), y en la relación  $(ATP \times AMP / ADP^2)$ , lo que quizá refleje una disminución de la actividad del sistema de la adenilatoquinasa en estas células.<sup>30</sup> Las pequeñas concentraciones de piruvato, lactato y oxaloacetato encontradas en los leucocitos son compatibles con la existencia de inhibición en la glicolisis. El papel que en estas células juega la

glicolisis, tanto anaerobia como aerobia, concede a su último paso mayor importancia relativa en la generación de ATP, por lo que su deficiencia en los leucocitos procedentes de desnutrido es también aquí compatible con la inhibición de la piruvatoquinasa. Efectivamente, se ha podido demostrar reducción marcada de esta enzima, en tanto que la dehidrogenasa láctica, al igual que en el músculo, y la dehidrogenasa málica, como hallazgo este discrepante, son normales.<sup>12</sup> La disminución en la actividad de la piruvatoquinasa, asociada a alteración considerable en el patrón de desarrollo de ATP leucocitario, propio del primer año de la vida, sugiere una aberración en el metabolismo energético de los leucocitos, semejante a la que se observa en el músculo de estos mismos pacientes. Esta información quizá permita, en el futuro, comprender mejor la índole de la pobre defensa contra la infección que parece caracterizar a los niños gravemente desnutridos. Debe mencionarse que en cuatro pacientes con desnutrición de primero y segundo grados, internados en un servicio de urgencias por enfermedad diarreica grave, el contenido leucocitario en intermediarios metabólicos, adeninonucleótidos y enzimas fue normal,<sup>29</sup> lo que sugiere la existencia de mecanismos de adaptación, quizá selectivos, durante las etapas iniciales de la desnutrición avanzada.

Investigaciones ulteriores aclararán, quizá, si lo encontrado en relación con la piruvatoquinasa es compartido por otras enzimas; si es exclusivo de la edad pediátrica; si las hipótesis concernientes

al metabolismo energético en desnutridos, derivadas de los hallazgos aquí comunicados y publicados en otros sitios,<sup>3, 11, 17</sup> son válidas; y si todo ello constituye una aberración metabólica propia del desnutrido descompensado u ocurre igualmente en otras situaciones de gravedad clínica.

#### REFERENCIAS

1. Waterlow, J. C.: *Protein nutrition and enzyme changes in man*. Fed. Proc. 18: 1143, 1959.
2. Waterlow, J. C.; Cravioto, J., y Stephen, J. M. L.: *Protein malnutrition in man*. Adv. in Prot. Chem. 15: 131, 1960.
3. Metcalf, J.: *Biochemical effects of protein-calorie malnutrition in man*. Ann. Rev. Med. 18: 377, 1967.
4. Waterlow, J. C. y Patrick, S. J.: *Enzyme activity in fatty livers in human infants*. Ann. N. Y. Acad. Sc. 57: 750, 1954.
5. Burch, H. B.; Arroyave, G.; Schwartz, R.; Padilla, A. M.; Béhar, M.; Viteri, F. y Scrimshaw, N.: *Biochemical changes in liver associated with kwashiorkor*. J. Clin. Invest. 36: 1579, 1957.
6. McLean, A. E. M.: *Enzyme activity in the liver and serum of malnourished children in Jamaica*. Clin. Sci. 30: 129, 1966.
7. Mukherjee, K. L. y Sarkar, N. K.: *Brit. J. Nutr.* 12: 1, 1958.
8. Bowie, M.; Brinkman, G. L. y Hansen, J. D. L.: *Diarrhea in protein-calorie malnutrition*. Lancet II: 550, 1963.
9. Malcolm, D. B. y Hansen, J. D. L.: *Acquired disaccharidase intolerance in malnutrition*. J. Pediat. 66: 1083, 1965.
10. Cuéllar, A.; Alejandro de Villarreal, I.; Benítez, S.; Luengas, J. y Frenk, S.: *Actividades de disacaridasas intestinales en niños desnutridos*. Por publicar.
11. Metcalf, J.; Frenk, S.; Yoshida, T.; Torres-Pinedo, R.; Kaiser, E. y Hansen, J. D. L.: *Cell composition and metabolism in kwashiorkor (severe protein-calorie malnutrition in children)*. Medicine 45: 365, 1966.
12. Yoshida, T.; Metcalf, J. y Frenk, S.: *Reduced pyruvic kinase activity in leukocytes of infants with protein-calorie malnutrition*. Am. J. Clin. Nut. 21: 162, 1968.
13. Waterlow, J. C. y Stephen, J. M. L.:

- Further observations on enzymes in the human liver in malnutrition. Oxidative phosphorylation and phosphatide synthesis.* Proc. World Cong. of Gastroenterol. Washington, Williams & Wilkins, 1958, p. 691.
14. Mönckeberg, F.; Beas, F.; Horwitz, I.; Debancens, A. y González, M.: *Oxygen consumption in infant malnutrition.* Pediatrics 33: 554, 1964.
  15. Cat, I.; Campello, A. P.; Voss, D. O.; Braga, H. y Bacila, M.: *Respiration rates and oxidative phosphorylation of heart sarcosomes in kwashiorkor.* Lancet II: 415, 1963.
  16. Gillman, J.; Gillman, T.; Scragg, J.; Savage, N.; Gilbert, C.; Trout, G. E. y Levy, P.: *Some aspects of the metabolism of Kwashiorkor and of normal infants as determined by the utilisation of 1-14C sodium acetate, 2-14C pyruvate and uniformly-labelled 14C glucose.* S. Afr. J. med. Sci. 26: 31, 1961.
  17. Frenk, S.: *Algunas secuencias metabólicas relacionadas con la composición hidromineral en la desnutrición avanzada del niño.* Gac. Méd. Méx. 94: 1101, 1964.
  18. Skou, J. C.: *Enzymatic basis for active transport of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> across cell membrane.* Phys. Rev. 45: 596, 1965.
  19. Kachmar, J. F. y Boyer, P. D.: *Kinetic analyses of enzyme reactions. II. The potassium activation and calcium inhibition of pyruvic phosphoferase.* J. Biol. Chem. 200: 669, 1953.
  20. Krebs, H. A. y Eggleston, L. V.: *The role of pyruvate kinase in the regulation of gluconeogenesis.* Biochem. J. 94: 30, 1965.
  21. Weber, G.; Stamm, N. B. y Fisher, E. A.: *Insulin: Inducer of pyruvate kinase.* Science 149: 65, 1965.
  22. Weber, G.; Sigbal, R. L.; Stamm, N. B. y Srivastave, S. K.: *Hormonal induction and suppression of liver enzyme biosynthesis.* Fed. Proc. 24: 745, 1965.
  23. Dixon, M. y Webb, E. C.: *Enzymes.* 2ª edición. Londres, Longmans, Green & Co., 1964, p. 69.
  24. Reynard, A. M.; Hass, L. I.; Jacobsen, D. D. y Boyer, P. D.: *The correlation of reaction kinetics and substrate binding with the mechanism of pyruvate kinase.* J. Biol. Chem. 236: 2277, 1961.
  25. Boivin, J. y Galand, C.: *Constante de Michaelis anormale pour le phosphoenolpyruvate au cours d'un déficit en pyruvate-kinase erythrocytaire.* Revist. Franc. Etud. Clin. et Biol. 12: 372, 1967.
  26. Frei, J.; Borel, C.; Horvath, G.; Gullity, B. y Vanotti, A.: *Enzymatic studies in the different types of normal and leukemic human white cells.* Blood 18: 317, 1961.
  27. Karnovsky, M. L.: *Metabolic shifts in leucocytes during the phagocytic event.* En: *Biological activity of the leukocyte.* Ciba Found. Study Group N° 10. Ed. Wolstenholme, G.E.W. y O'Connor, M. Londres, J. A. Churchill Ltd, 1961, p. 60.
  28. Tejada, C.; Argueta, V.; Sánchez, M. y Albertazzi, J.: *Phagocytic and alkaline phosphatase activity of leukocytes in kwashiorkor.* J. Pediat. 64: 753, 1964.
  29. Yoshida, T.; Metcoff, J.; Frenk, S. y De la Peña, C.: *Intermediary metabolites and adenine nucleotides in leukocytes of children with protein-calorie malnutrition.* Nature 214: 525, 1967.
  30. Atkinson, M. R.; Burton, R. M. y Morton, R. K.: *Equilibrium constants of phosphoryl transfer from adenosine triphosphate to galactose in the presence of galactokinase.* Biochem. J. 78: 813, 1961.