

DEFICIENCIA DE TIAMINA EN LA INFANCIA*

Oxidación de la Glucosa 2-C¹⁴ en Eritrocitos de Lactantes Aparentemente Eutróficos y Distróficos como Método de Diagnóstico

HÉCTOR L. NAUPARI VILLANUEVA

La tiamina es un factor nutricional necesario para todas las especies vegetales y animales. Puede ser sintetizada por los vegetales superiores, pero en grado limitado en la obscuridad, y la producen muchas bacterias, levaduras y mohos. En cambio, en los tejidos animales no se sintetiza en cantidades importantes.

En términos generales, la fuente más importante de esta vitamina en cuanto al hombre y otros animales es la alimentación. Si bien algunos rumiantes pueden satisfacer sus necesidades gracias a la síntesis por la flora intestinal, en el hombre no se ha dilucidado la importancia de este mecanismo.

La tiamina se encuentra en casi todos los tejidos, pero en concentraciones más elevadas en hígado y corazón, y en segundo término, en encéfalo y músculo. El tejido nervioso a diferencia de otros, es incapaz de retener tiamina en reserva, hecho que contribuye fácilmente a su vulnerabilidad durante la carencia, pues también se requiere tiamina para la sín-

tesis de acetilcolina, sustancia que interviene en la función nerviosa.

El pirofosfato de tiamina (difosfotiamina; TPP; DPT) es la forma activa de esta vitamina (7), que funciona como coenzima en la reacción de la transcetolasa (16-17), en la descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico y en el ciclo de Krebs en la descarboxilación del ácido α -cetoglutarico. Se ha demostrado que la carencia de tiamina aumenta la concentración de ácido pirúvico en sangre, hecho que se utiliza para el diagnóstico en estados carenciales, pero su valor es limitado en sujetos jóvenes y difícil de realizar en niños por la actividad muscular incontrolable.

Los métodos químicos y biológicos no son totalmente satisfactorios para el diagnóstico temprano de la deficiencia de tiamina.

El método de gran sensibilidad es el que consiste en la medición del rendimiento de C¹⁴O₂ cuando la glucosa 2-C¹⁴ es incubada con eritrocitos maduros, pues estas células degradan la glucosa por la vía de Embden Meyerhof y la vía de la pentosa fosfato (1), desde que en éstas el ciclo de Krebs es inoperante porque carecen de mitocondrias (4).

* Resumen de la tesis presentada por el autor para optar el grado de Bachiller en Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 1969.

El metabolismo de la glucosa a través de la vía de la pentosa-fosfato determina la rápida formación de CO_2 a partir del C-1, en cambio el C-2 puede aparecer como CO_2 solamente si se opera la serie completa de las reacciones en que el C-2 de la glucosa original se ha transformado en C-1 de la glucosa resistetizada.

Cabe remarcar que la oxidación del C-2 de la glucosa a CO_2 , en la vía de las pentosas, requiere del fenómeno de la reentrada. La deficiencia de tiamina afectará la reacción de la transcetolasa y por ende la oxidación del C-2. El estudio de la velocidad de oxidación de la glucosa 2-C^{14} a C^{14}O_2 en eritrocitos que son células que carecen de ciclo de Krebs, como ya indicamos anteriormente, constituye en la actualidad el procedimiento más sensible para el diagnóstico de deficiencias de tiamina.

En el presente trabajo hemos investigado la deficiencia de tiamina en lactantes distróficos mediante el estudio de la velocidad de oxidación de la glucosa 2-C^{14} a C^{14}O_2 en eritrocitos en comparación de los resultados obtenidos en lactantes aparentemente eutróficos, simila-

res estudios se hicieron en algunos distróficos después de tratados con tiamina.

MATERIAL Y METODOS

En nuestro estudio hemos utilizado sangre de lactantes (infantes cuyas edades fluctuaban entre un mes y dos años), éstos fueron clasificados, de acuerdo con valoraciones de nutrición establecidas internacionalmente (14), (15), (30), (31), en aparentemente eutróficos y distróficos; el primer grupo estuvo formado por veinte lactantes y el segundo por 54. Estos últimos a su vez se subclasificaron (30) en distróficos de 1er. grado (14 casos), 2do. grado (20 casos) y de 3er. grado (20 casos). Todos fueron seleccionados del Servicio de Hidratación y Consultorios Externos del Hospital del Niño de Lima, después de una completa recuperación de los procesos agudos que padecían.

Cada uno de ellos tenía pruebas de laboratorio que permitió hallar los valores medios para cada grupo, como se puede apreciar en el cuadro siguiente.

Datos de laboratorio en 54 lactantes

Pruebas de laboratorio	Valores normales	Eutróficos	Distróficos		
			1er. Gr.	2do. Gr.	3er. Gr.
Hemoglobina	15 gr. %	13.1	11.2	10.4	9.5
Hematocrito	45 %	43	40	39	37
Prot. totales	5.1-7.0 gr. %	6.05	6.00	5.85	4.96
Albúminas	4.0-4.5 gr. %	3.87	3.15	3.46	2.98
Globulinas	1.25-2.5 gr. %	1.98	1.93	1.86	1.78
Recuento de reticulocitos	1 %	0.1	0.4	0.5	0.7

Las muestras de sangre se tomaron de la vena yugular superficial e inmediatamente transferidos a tubos de centrifuga que contenían heparina como anticoa-

durante 10 minutos en Centrifuga Refrigerada Internacional PR-2, a 4°C. El plasma sobrenadante y los leucocitos fueron eliminados mediante una pipeta Pasteur.

Tabla N° 1. Resultados obtenidos en lactantes aparentemente eutróficos

Los valores que se indican expresan el porcentaje de cuentas por minuto de glucosa 2-C¹⁴ inicialmente presente en el frasco de incubación, que se ha incorporado al C¹⁴O₂ por 100 mgrs. de peso seco de eritrocitos.

N° de casos	Edad meses	Rendimiento de C ¹⁴ O ₂
1	12	2.88
2	5	3.28
3	6	3.43
4	4	2.91
5	6	2.06
6	4	2.94
7	9	4.25
8	8	3.46
9	1	3.08
10	10	2.79
11	3	3.29
12	6	4.11
13	7	5.01
14	18	2.74
15	13	2.71
16	22	3.48
17	7	2.87
18	4	3.27
19	15	2.98
20	21	2.61

ANALISIS ESTADISTICO

N° de casos	Media ± error standard	Coefficiente variación	Valores extremos
20	3.2075 ± 0.142	19.90	2.06 — 5.01

gulante y se mantuvieron en refrigeración a 4°C.

Como la técnica requiere eritrocitos libres de plasma y leucocitos, la sangre heparinizada se centrifugó a 2,000 r.p.m.

Los eritrocitos fueron lavados por tres veces con solución de Ringer Fosfato (19). Después de cada lavado se centrifugó a 2,000 r.p.m. durante 10 minutos siempre bajo refrigeración. Luego de la última

centrifugación, los eritrocitos fueron suspendidos en cuatro volúmenes de Ringer Fosfato.

Los procedimientos de laboratorio se realizaron en el Instituto de Bioquímica y Nutrición.

Para el estudio del metabolismo de la glucosa 2-C^{14} en los eritrocitos se utilizaron frascos de Warburg con dos ramas

completó a 2 ml. con Ringer Fosfato. En la copa central se puso 0.15 ml. de NaOH al 20%. Después de 10 minutos de equilibrio a 38°C se procedió a verter la glucosa al compartimiento principal, luego se procedió a incubar durante 2 horas, utilizando aire como fase gaseosa. Al cabo de este período se detuvo la reacción mediante la adición del ácido sulfúrico,

Tabla Nº 2. Resultados obtenidos en lactantes distróficos de primer grado

Los valores consignados se expresan igual que en la Tabla Nº 1.

Nº de casos	Edad meses	Rendimiento de C^{14}O_2
1	6	1.42
2	4	1.56
3	7	2.39
4	16	2.74
5	12	2.75
6	4	2.77
7	7	2.61
8	7	2.63
9	12	1.87
10	4	2.28
11	15	2.08
12	13	1.74
13	18	1.48
14	20	1.43

ANALISIS ESTADISTICO

Nº de casos	Media \pm error standard	Coficiente variación	Valores extremos
14	2.1205 \pm 0.138	24.09	1.42 — 2.77

laterales. En una de ellas se introdujo 0.3 ml. de glucosa 2-C^{14} ($30\mu\text{M}$) conteniendo 71,490 cuentas totales por minuto y en la otra 0.25 ml. de H_2SO_4 5N. En el compartimiento principal se puso 1 ml. de eritrocitos suspendidos en Ringer Fosfato, 0.5 ml. de una solución de azul de metileno al 0.4%. El volumen total se

el cual además desprende todo el CO_2 disuelto en el medio líquido, se continuó la agitación a la misma temperatura durante 30 minutos para la absorción total del CO_2 desprendido.

Retirados los frascos (tapados) se agregó 0.5 ml. de Carbonato de Sodio ($200\mu\text{M}$) a la copa central, para diluir

el $C^{14}O_3Na_2$ formado; trabajando siempre con aire libre de CO_2 ; luego el contenido y los lavados respectivos de la copa fueron transferidos a un tubo de centrífuga. Para transformarlo en Carbonato de Bario se agregó 2ml. de una sol. N

planchetas y determinar la radioactividad.

La glucosa radioactiva fue degradada a $C^{14}O_2$ por el método de la combustión húmeda de Van Slyke y Folch (5) y transformado en $BaC^{14}O_3$, para conocer

Tabla N° 3. Resultados obtenidos en lactantes distróficos de segundo grado

Los valores consignados se expresan igual que en la Tabla N° 1.

N° de casos	Edad meses	Rendimiento de $C^{14}O_2$
1	10	1.78
2	13	2.41
3	4	2.09
4	6	2.38
5	3	2.48
6	9	2.36
7	5	2.44
8	3	1.12
9	6	1.82
10	7	1.37
11	1	2.57
12	20	1.29
13	23	1.78
14	9	1.81
15	18	1.39
16	19	1.71
17	8	1.73
18	14	1.45
19	5	1.18
20	7	1.39

ANALISIS ESTADISTICO

N° de casos	Media \pm error standard	Coefficiente variación	Valores extremos
20	1.82075 \pm 0.1031	25.50	1.12 — 2.57

de $Ba(OH)_2$ y $BaCl_2$ (13). El precipitado formado se separó por centrifugación lavándose 3 veces con agua destilada libre de CO_2 y dos veces con alcohol metílico, luego se secó en estufa a 110 C. por doce horas para ser transferido a

las cuentas por minuto de la glucosa puesta al frasco.

La radioactividad del $C^{14}O_3Ba$ se determinó en un detector con flujo de gas y las cuentas por minuto fueron corregidas a grosor cero mediante una curva de ab-

sorción preparada en el Instituto de Bioquímica y Nutrición (20). Se calcularon las cuentas totales producidas y el porcentaje que esta cantidad representaba con relación a las cuentas por minuto de la glucosa 2-C^{14} presente en el frasco de

RESULTADOS

En las tablas 1, 2, 3 y 4 se presentan los resultados individuales de la incorporación de C^{14} de la glucosa al C^{14}O_2 referidas en porcentaje de las cuentas ini-

Tabla N° 4. Resultados obtenidos en lactantes distróficos de tercer grado

Los valores consignados se expresan igual que en la Tabla N° 1.

N° de casos	Edad meses	Rendimiento de C^{14}O_2
1	11	1.33
2	11	1.28
3	7	1.57
4	8	2.09
5	12	2.23
6	9	0.95
7	3	1.10
8	11	0.92
9	10	0.97
10	14	1.14
11	3	1.09
12	12	0.85
13	6	0.73
14	8	0.86
15	7	1.37
16	15	1.86
17	5	1.52
18	17	1.16
19	11	1.01
20	10	1.03

ANALISIS ESTADISTICO

N° de casos	Media \pm error standard	Coficiente variación	Valores extremos
20	1.2503 \pm 0.090	32.20	0.73 — 2.23

incubación por 100 mgs. de peso seco de eritrocitos.

La glucosa 2-C^{14} fue obtenida de la Nuclear Instruments and Chemical Corporation de Chicago.

cialmente puestas en el medio de incubación y por 100 mgrs. de peso seco de eritrocitos. Se puede apreciar que el valor medio en los lactantes aparentemente eutróficos es de 3.20, en los lactantes distró-

ficos de 1er. grado es de 2.12, en los lactantes distróficos de 2do. grado es 1.82 y en los lactantes distróficos de 3er. grado es 1.25.

En la Tabla N° 6 podemos ver el valor de P en la comparación del grupo de lactantes aparentemente eutróficos con cada uno de los grupos distróficos es de < 0.001 , lo que indica una diferencia estadísticamente significativa.

En los casos de los lactantes distróficos de 3er. grado que fueron sometidos experimentalmente a un tratamiento con tiamina Tabla N° 5 se nota que los valores medios del grupo, antes y después del tratamiento son de 1.39 y 1.80 respectivamente que muestra un valor de $P < 0.01 > 0.001$ lo cual indica una diferencia estadísticamente significativa.

Tabla N° 5. Resultados obtenidos en lactantes distróficos de tercer grado antes y después del tratamiento con tiamina

Como tratamiento se les administró 150 mgs. diarios de tiamina; en los casos I y IV fue por vía parenteral (intramuscular) y en el resto fue por vía oral.

Las cifras indican, como en la Tabla N° 1, el porcentaje de radioactividad inicialmente presente, incorporado al $C^{14}O_2$ por 100 mgrs. de peso seco de eritrocitos.

Experimento	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Antes del tratamiento	1.33	2.48	0.95	1.78	1.14	1.39	1.01	1.03
Después del tratamiento	2.25	2.77	1.02	2.30	1.83	1.38	1.57	1.35

ANALISIS ESTADISTICO

N° de casos	Media \pm desviación standard	Coficiente variación	Valores extremos
ANTES DEL TRATAMIENTO			
8	1.39 \pm 0.4843	34.80	0.95 — 2.48
DESPUES DEL TRATAMIENTO			
8	1.809 \pm 0.5521	30.70	1.02 — 2.77

Tabla N° 6. Análisis de la significación estadística de los resultados obtenidos en lactantes distróficos de primer grado en comparación con lactantes aparentemente eutróficos

Grado de libertad	Valor t	Valor P
26	7.343	< 0.001

Análisis de la significación estadística de los resultados obtenidos en lactantes distróficos de segundo grado en comparación con lactantes aparentemente eutróficos.

Grado de libertad	Valor t	Valor P
38	10.747	< 0.001

Análisis de la significación estadística de los resultados obtenidos en lactantes distróficos de tercer grado en comparación con lactantes aparentemente eutróficos.

Grado de libertad	Valor t	Valor P
38	16.296	< 0.001

Análisis de la significación estadística de los resultados obtenidos antes y después del tratamiento con tiamina.

Grado de libertad	Valor t	Valor P
7	3.821	< 0.01
		> 0.001

DISCUSION

Estudios realizados por Warburg y posteriormente por Michaelis y Salomon (4) demostraron que el eritrocito maduro del mamífero utilizaba las vías glicolítica y de la pentosa fosfato con la atinencia que presentaban un bajo tipo de respiración (45). Más tarde, otros autores (4-9-44) confirmaron que ocurría lo mismo en el eritrocito humano, señalaron además que el ciclo del Ac. cítrico es incompleto e inoperante en éste por carecer del complejo lipoproteico de la fracción mitocondrial (21-38-41-42). En cambio el reticulocito posee mitocondrias, presentando así el sistema de los citocromos y toda la cadena de transportadores de electrones, capaz de realizar la oxidación final de la glucosa en el ciclo de Krebs. Bernstein y col. (11), (39) demostraron, que induciendo la reticulocitosis (40) en el conejo, con acetil-fenil-hidrazina neutralizada, el ciclo del ac. cítrico se incrementa del 50 al 100%, decreciendo en forma notable durante la maduración y cesando totalmente en el eritrocito maduro.

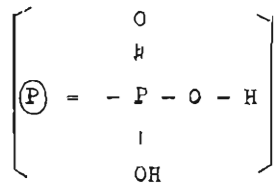
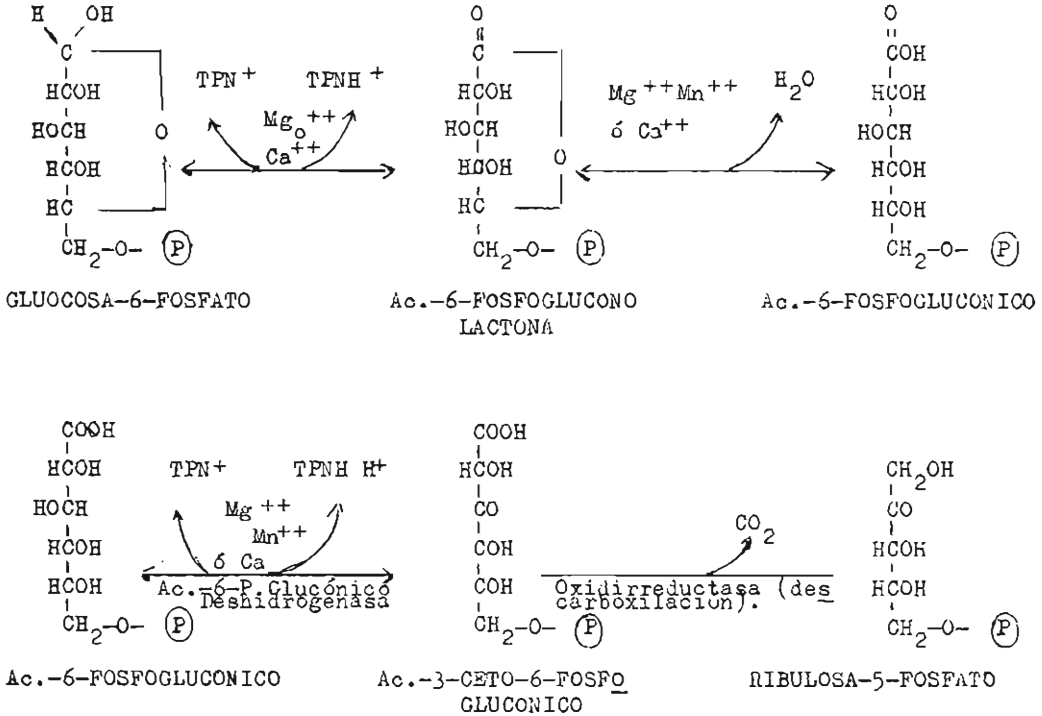
En 1928 Guzmán Barrón y Harrop (8) demostraron que la adición del azul de metileno al sistema Buffer experimental incrementaba notablemente el consumo de oxígeno. El azul de metileno se comporta como un aceptor de electrones del TPNH, por lo cual regenera el factor limitante TPN (37) e incrementa 9 veces la oxidación de la glucosa por la vía de la pentosa-fosfato, es decir, aumenta del 6 al 50% (27). Murphy señala que en el eritrocito el consumo de la glucosa por la vía glicolítica es mucho mayor que por la vía de la pentosa-fosfato (27-37-43-45); últimos estudios parecen señalar (9) que el colorante antes mencionado afecta el

metabolismo del hematíe desviando el catabolismo de la glucosa de la vía de Embden Meyerhof hacia el "shunt" de la hexosa monofosfato, sin alterar el consumo neto de la glucosa (13).

En la vía de la pentosa-fosfato, la tiamina

transformar esta vitamina a su forma activa para su propio uso (7-10). Goodhart (12) señala que los eritrocitos maduros (no nucleados) poseen una capacidad limitada para fosforilar la tiamina, en comparación con los reticulocitos (nu-

Figura Nº. 1. Oxidación de la glucosa por la vía de la pentosa fosfato.



mina es un factor esencial para la reentrada de la glucosa, siendo su forma activa el pirofosfato de tiamina que se halla dentro de la célula (7).

Brin sugiere que cada célula debe

transformar esta vitamina a su forma activa para su propio uso (7-10). Goodhart (12) señala que los eritrocitos maduros (no nucleados) poseen una capacidad limitada para fosforilar la tiamina, en comparación con los reticulocitos (nu-

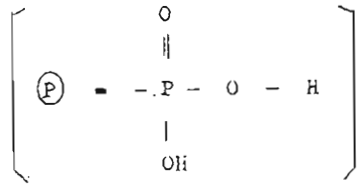
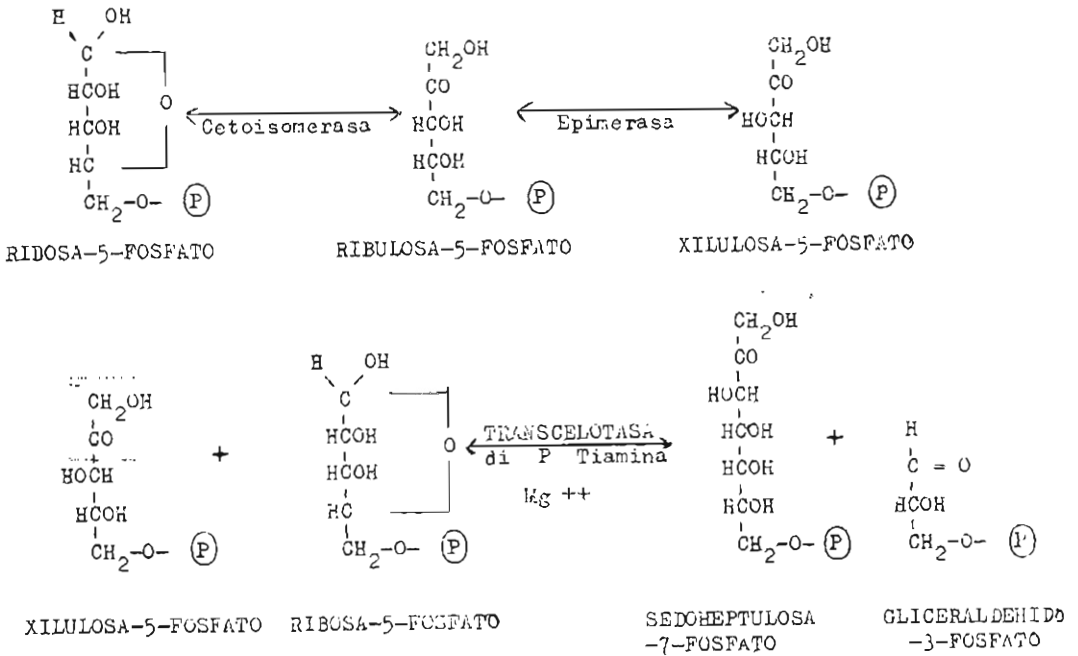
cleados); también se señala que esta fosforilación (3-18) se altera en los pacientes con cirrosis hepática.

Es un hecho comprobado que los eritrocitos maduros humanos poseen una ca-

pacidad limitada para fosforilar la tiamina (40), esto tal vez dependa directamente de la diferencia de especies (1). Además, se ha demostrado que el azul de metileno estimula notablemente la respiración del eritrocito, mas no la produc-

ción de la reacción de la transcetolasa (1); pues el pirofosfato de tiamina se une a la apotranscetolasa para formar la holotranscetolasa que es la enzima activa; no ocurriría tal reacción al faltar tiamina, y en este caso, la pentosa se acu-

FIGURA Nº 2



ción de tiamina pirofosfato, pudiendo al contrario inhibirla (13-25).

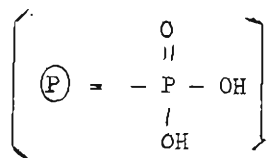
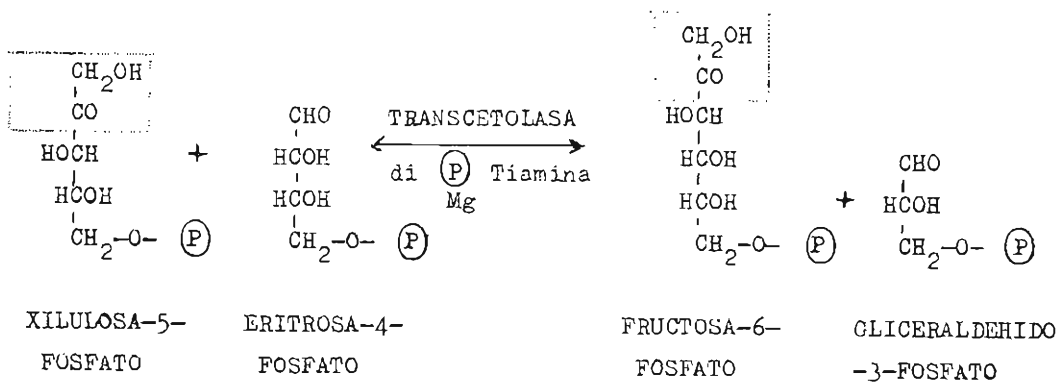
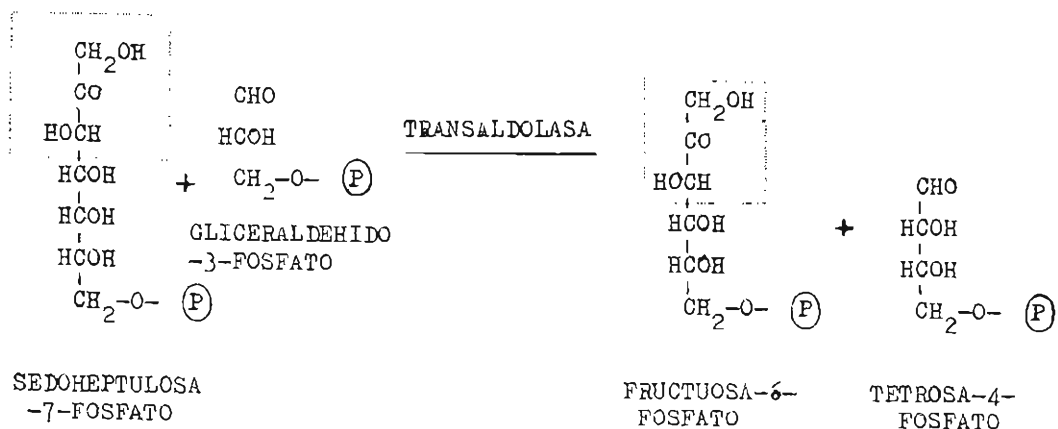
Al incubar eritrocitos de mamíferos alimentados con dieta carente de tiamina ha sido posible determinar una altera-

mula, porque está bloqueada la resíntesis de la hexosa-fosfato. En otras palabras, la causa de la disminución de la reacción de transcetolasa y la subsecuente disminución de la hexosa resistetizada

es una deficiencia del cofactor pirofosfato de tiamina (2-6-7), de allí que la oxidación de la glucosa 2-C¹⁴ a C¹⁴O₂ es la

de la glucosa 2-C¹⁴ y de la glucosa 3-C¹⁴ a las posiciones 1 y 3, 1 y 2, respectivamente, de la glucosa-6-fosfato re-

FIGURA Nº 3



prueba más específica y funcional para descubrir esta alteración (9).

Wood y Katz (28), (29) han enunciado que la extensión de la radioactivi-

de los derivados de 3-C, es proporcional a la fracción de glucosa total metabolizada por el ciclo de la pento-

sa fosfato. Sostienen ellos que el fenó-

meno de la extensión de radioactividad depende de la reentrada en el ciclo oxidativo de las pentosas de la hexosa sintetizada y de la cantidad de glucosa

luación bioquímica de la deficiencia de tiamina (6). El método es suficientemente sensible para demostrar un defecto bioquímico antes que aparezcan signos

Figura N° 4-A. Oxidación del glucosa 2-C¹⁴ por la vía de la pentosa fosfato. Distribución del C¹⁴ de la glucosa 2-C¹⁴ en esta vía. El carbono marcado se muestra en las reacciones, usando el símbolo (°).

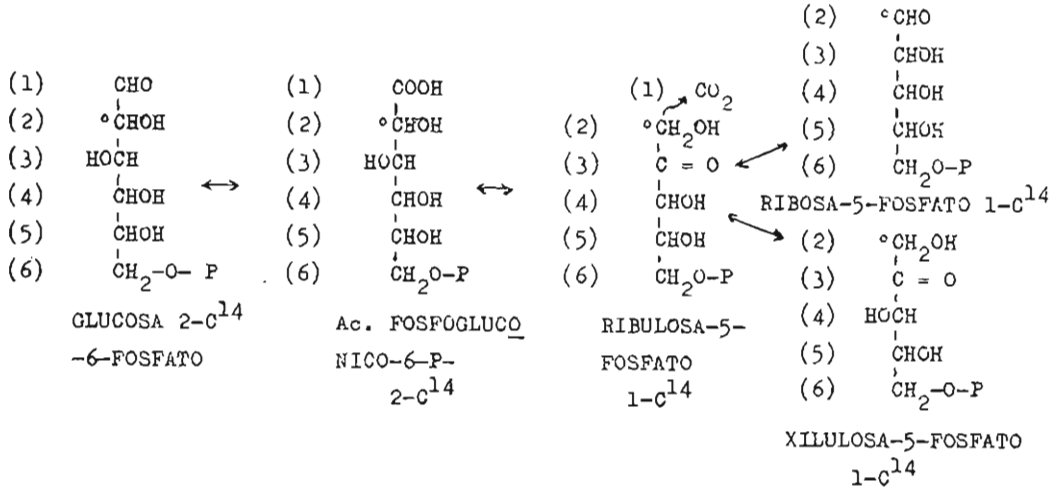
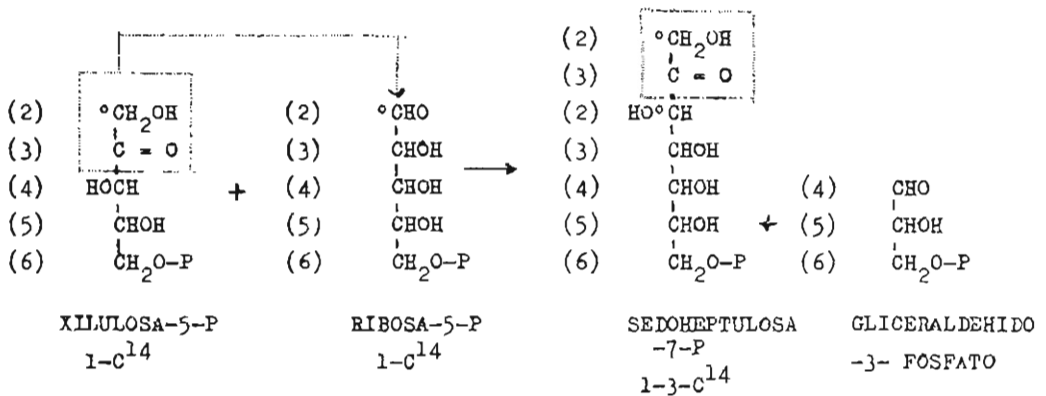


FIGURA N° 4-B



metabolizada por este ciclo (figura 4A al 4D).

En experimentos usando eritrocitos, la perturbación del metabolismo intermedio en los estados de deficiencia de tiamina ha previsto una base para la eva-

clínicos y, por lo tanto, un estado marginal de deficiencia (6).

En nuestro medio, estudiando la oxidación de la glucosa 2-C¹⁴ en eritrocitos de niños (33), se ha encontrado que el rendimiento de C¹⁴O₂ en estados de hipo-

nutrición es menor comparado con los niños aparentemente normales.

En niños en estados de hiponutrición un tratamiento con tiamina aumenta el rendimiento de $C^{14}O_2$.

Como se señala en la parte correspondiente, nuestro estudio ha sido realizado en cuatro grupos de lactantes cuyos

rendimiento encontrada estadísticamente significativa.

El mayor rendimiento de $C^{14}O_2$ a partir de la glucosa 2- C^{14} obtenido en eritrocitos de lactantes aparentemente eutróficos, explicaría un adecuado funcionamiento del ciclo de la pentosa fosfato.

El menor rendimiento de $C^{14}O_2$ esta-

FIGURA Nº 4-C

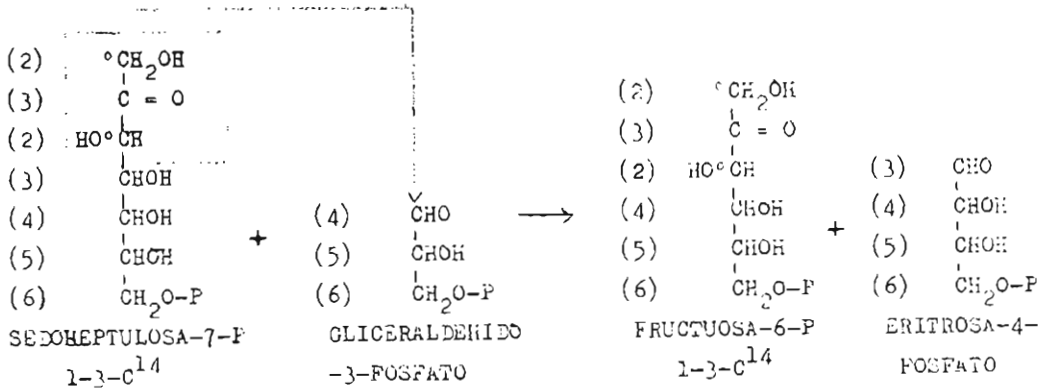
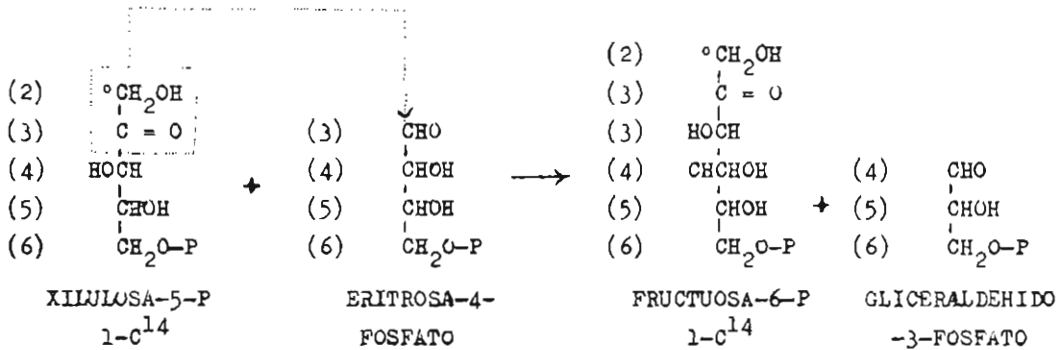


FIGURA Nº 4-D



resultados se pueden apreciar en las Tablas 1, 2, 3, 4 y 5. El porcentaje de radioactividad incorporada por 100 mgrs. de peso de eritrocitos encontrado en el grupo de lactantes aparentemente eutróficos, es mayor que el obtenido en el grupo distrófico en general, siendo la dife-

ncia en relación con la disminución de la reacción de la transcetolasa y la subsecuente disminución de la hexosa resintetizada, como reflejo de la deficiencia del cofactor tiamina pirofosfato.

Al comparar el rendimiento de $C^{14}O_2$ entre los eritrocitos de lactantes aparen-

temente eutróficos y los distróficos de primer grado que no presentaban signos clínicos de deficiencia de tiamina encontramos una diferencia que es estadísticamente significativa, revelándonos así un defecto bioquímico que se traduce como una deficiencia temprana de tiamina.

Debemos señalar además que el rendimiento de $C^{14}O_2$ va disminuyendo gradualmente cuanto mayor grado de distrofia presentan, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

Como parte que complementa a este trabajo y para fundamentación del mismo, se seleccionaron lactantes distróficos de III grado que habían acusado deficiente oxidación de la glucosa $2-C^{14}$ para someterlos posteriormente a una dieta suplementaria de tiamina, (se les administró 150 mgs. diarios de tiamina durante 7 días), luego de la cual se realizaron las incubaciones correspondientes en las mismas condiciones.

Como se puede observar en la Tabla 5, en el 90% de las incubaciones de eritrocitos de lactantes tratados con tiamina se obtuvo incremento de la radioactividad reincorporada al CO_2 ; este incremento es estadísticamente significativo y demuestra evidentemente la acción de la tiamina.

Finalmente, debemos señalar que el rendimiento de $C^{14}O_2$ obtenido en la incubación de eritrocitos de lactantes aparentemente eutróficos es mayor (Media = 3.2) que la obtenida en los niños aparentemente normales (33) (Media = 2.4), en los adultos normales (35) (Media = 2.2) y en las gestantes normales (34) (Media = 2.1); indudablemente esto refleja una mayor actividad metabólica en los lactantes (23-24-32).

CONCLUSIONES

Del estudio realizado en el presente trabajo sobre la oxidación de la glucosa $2-C^{14}$ a $C^{14}O_2$ en eritrocitos de lactantes aparentemente eutróficos y distróficos de 1er., 2do. y 3er. grado para investigar la deficiencia de tiamina, se han obtenido resultados que permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1) El rendimiento de $C^{14}O_2$ en los lactantes distróficos en general es menor que el obtenido en lactantes aparentemente eutróficos. Esta deficiencia es estadísticamente significativa.

2) El rendimiento de $C^{14}O_2$ en los lactantes distróficos es mucho menor cuanto mayor grado de distrofia presentan. Estas diferencias son estadísticamente significativas.

3) En los lactantes distróficos un tratamiento con tiamina incrementa el rendimiento de $C^{14}O_2$. Este incremento es estadísticamente significativo.

BIBLIOGRAFIA

1. Brin, M.; Shohet, S. S. and Davidson, C. S.: *Biol. Chem.* 230, 319, 1958.
2. Wolfe, J.: Brin; Davidson Ch.: *J. Clin. IV.* 37, 1476-84; 1958.
3. Williams, R. H. and Bissell, G. W.: *Arch. Med. Inter. Med.* 73, 203; 1944.
4. Dajaniau, Osten: *J. Biol. Chem.* 913, 231; 1958.
5. Van Slyke, D. D. y Folch, J. *Biol. Chem.* 136, 509, 1940.
6. Peters, R. A.: The biochemical lesion in vitamin B₁ deficiency. *Lancet*, 1, 1161; 1936.
7. Brin, Myron: *J. A. M. A.* 187 (10): 762-65; 1964.
8. Guzmán Barrón, E. S. and Harrop, G. A.: *J. J. Exp. Med.* 48: 207; 1928.
9. Lamar Crevasse, W. H.; Hewson, G. G.;

- Hajemi and Ship, J.: *Lab. and Clin. Med.* 65 (4) 539, 1965.
10. Brin, Myron: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 98: 528-41, 19.
 11. Bernstein, R. E.; Troughton, V. A. and Donly, D. L.: *The Biochem. J.* 94, 14 P. 1965.
 12. Goodhart, R. S. and Sinclair, H. M.: *Biochem. J.* 33, 634, 1939.
 13. Van Slyke, D. D.; Steele, R.; Pazin, J.: *Biol. Chem.* 192, 769, 1951.
 14. Guzmán Barrón, A. *Actas y Trabajos del Segundo Congreso Peruano de Química*, 11, 262, 1943.
 15. Hurtado, A. y colab.: *An. Fac. Med.* 19, 9, 1936.
 16. Horecker, B. L. and Smyrniotis, P. Z.: *J. Amer. Chem.* 75, 1009, 1953.
 17. Racker, E., De la Haba, G. and Leder, I. G.: *J. Ame. Chem.* 75, 1010, 1953.
 18. Williams, R. D.; Mason, H. L.; Power, M. H., and Wilder, R. M.: *Arch. Inter. Med.* 71, 38, 1943.
 19. Umbreit, W. W. Burris, R. H. and Stauffer, J. F.: *Manometric Techniques* Burgess Publishing Co. Minneapolis, 149, 1957.
 20. Villavicencio, M.; Rosales, F.; Olivera, A.; Melgar, E., y Guerra, R.: *Acta Physiol. Latinoam.* 8, 219, 1958.
 21. White, Abraham; Philip; Smith, "Principles of Biochemistry" Third Edition (Mc Grew Co). 793-801, 1064).
 22. Davis, R. A. and Wolf, A. J. *Pediatrics*, 21, 409, 1958.
 23. Holth, L. E. Jr. The Thiaminic requirement of the man, *Fed. Proc.*, 3: 171, 1949.
 24. Holth, E. T. The Thiaminic requirement of the normal infant. *J. Nutrition*, 37: 53, 1949.
 25. Smits, G. and Florinjn F. *Biochim. Biophys. Acta*, 5, 355, 1950.
 26. Victor, M. and Adams: *Res. Pub. Ass. Vern. Met. Dis.* Vol. 32.
 27. Murphy, J. R.: *J. Lab. and Clin. Med.* 55: 286, 1960.
 28. Wood, H. G. and Katz J. *Biol. Chem.* 233: 1279, 1958.
 29. Katz, J.; Wood, H. G.: *J. Biol. Chem.* 235: 2165, 1960.
 30. Gómez, F. *Boletín Méd. del Hosp. Infantil de México* 11:631, 1954.
 31. Mouriquand, G. y Dechavanne.— *Vademecum de Terapéutica Infantil*. Ediciones Toray, S. A. 273, 1962.
 32. Fanconi, G. y Waligreen, A. *Tratado de Pediatría*, Editorial Científico-Médica 376-78, 1962.
 33. Montesinos, A. Tesis de Bachiller N° 6211, 1965.
 34. Maradiegue, E. Tesis de Bachiller N° 6246, 1965.
 35. Palhua, M. Tesis de Bachiller N° 6336, 1965.
 36. Torres, H. Tesis de Bachiller N° 3569, 1956.
 37. Bartlett, G. R. and Marlow, A. A.: *J. Lab. and Clin. Med.* 42:178, 1953.
 38. Rubinstein, D.; Ottolenghi, P. and Densted, O.: *Canad. J. Bioch. Phys.* 34: 222, 1956.
 39. Berstein, R.: *J. Clin. Inv.* 38: 1572, 1959.
 40. Lowenstein, L.: *Int. Rev. Cyt.* 8:136, 1959.
 41. Rubinstein, D. and Densted, O.: *J. Biol. Chem.* 204: 623, 1953.
 42. Ashwell, C. and Dische, Z.: *Biochim. et Biophys. Acta* 4:276, 1950.
 43. Huennekens, L. Liu, H.A.P.: *Myers and Gabrio: J. Biol. Chem.* 227: 253, 1957.
 44. Irving, M.: "The Harvey Lectures" 56: 151-91, 1960-61.
 45. Brin, M. and Yonemoto, R.: *J. Biol. Chem.* 230: 307, 1958.