

**TRABAJOS DE LOS DEPARTAMENTOS DE CLINICA  
MEDICA Y ANATOMIA PATOLOGICA**

**ENSAYO EXPERIMENTAL SOBRE AVITAMINOSIS K \***

Por Juana Maria Solano Rodriguez

**SUMARIO**

- 1) Historia
- 2) Distribución
- 3) Métodos usados para medir la actividad de vitamina K.
- 4) Material y métodos empleados
- 5) Experiencias realizadas y resultados obtenidos:
  - a) Experimentación
  - b) Examen radiológico
  - c) Examen hematológico
  - d) Anatomía patológica

Conclusiones.

**1) HISTORIA.**

Henrik Dam en 1929 (37), haciendo estudios sobre el metabolismo de los esteroides, observó que los pollos sometidos a

— — —  
\* Mi gratitud a los profesores Dr. Carlos Monge M., Director del Departamento de Clínica Médica y Dr. Pedro Weiss, Director del Departamento de Anatomía Patológica, por las facilidades que nos han dado en sus laboratorios y a los Drs. Juan Machiavello y Oscar Urteaga por su desinteresada colaboración.

una dieta exenta de grasas, compuesta de caseína, almidón, arcilla, una mezcla de sales, papel de filtro y aceite de hígado de bacalao, desarrollaban un síndrome especial que se parecía al escorbuto. Dicho síndrome consistía en la aparición de hemorragias bajo la piel, en la base de inserción de las plumas, en el abdomen, así como erosiones en la molleja. Los animales se volvían anémicos; el número de eritrocitos descendía a dos millones o menos, en lugar de casi 3 millones que tienen habitualmente (80, 121,) y, además, había un retardo enorme del tiempo de coagulación.

En 1930, Horvath (58), trabajando en este mismo asunto observó que la coagulación de la sangre de los pollos puestos en carencia se aceleraba cuando en su alimentación se incluía habas chinas germinadas (soy bean). La misma condición hemorrágica descrita por Dam, fué relatada por Mc Farlane y sus colaboradores (66), en 1931, quienes llegaron a establecer la necesidad de vitaminas liposolubles en la alimentación de los pollos. Utilizando una dieta que contenía 70 % de arroz, 15 % de arcilla, proteínas provenientes de pescado y caseína, observaron que se producía gran mortalidad en los pollos alimentados con dietas que contenían extracto etéreo de pescado, cosa que no ocurría con los animales cuya alimentación contenía harina seca de pescado, nó el extracto etéreo. Hicieron notar, también, que la sangre de los pollos puestos en carencia, podía dejarse toda la noche en el laboratorio, a la temperatura ambiente, sin que se produjese coagulación.

En 1934, Dam y Schönheyder (39a), demostraron que esta enfermedad semejante al escorbuto, en algunos aspectos, que se desarrollaba en los pollos alimentados con cereales solamente, también se manifestaba si la dieta contenía 15 % de levadura seca; podía producirse en ausencia de vitamina C en la dieta, pero, ni el jugo de limón, ni el ácido cevitámico, administrado por vía oral o parenteral, tenían efecto alguno sobre los síntomas; en cambio curaba o podía evitarse por la administración de la parte no saponificable del hígado de cerdo. La semilla de cáñamo era rica en este factor, pero, las grasas de centeno, el girasol, maíz, arroz, no tenían efecto alguno sobre el síndrome. Igual cosa ocurría con el aceite de hígado de bacalao. Posteriormente, Dam y sus colaboradores (37b,c, 41), anotaron que el porcentaje de protrombina era ba-

jo en los pollos alimentados con dietas deficientes en este factor. La enfermedad hemorrágica se desarrollaba en tres semanas, cuando los animales eran alimentados con una dieta compuesta de: caseína 10 %, extracto etéreo de hígado de cerdo 10 %, levadura seca 10 %, mezcla salina 2,7 % y aceite de hígado de bacalao 4 %. Los pollos puestos en carencia mediante esta dieta, eran alimentados, después, durante tres días con hígado de cerdo, cañamones y vegetales verdes, observándose que la coagulación de la sangre volvía a la cifra normal. Llegaron así al conocimiento de que el trastorno era producido por la falta de un factor que retardaba la coagulación de la sangre. Dam (37b,) en 1935, propuso llamar a este factor vitamina K (Koagulation-Vitamin). Estudios posteriores en ratas y cobayos (38d, 40, 52, 53, 71), alimentados con dietas similares a las empleadas en los pollos reprodujeron el síndrome descrito. Dam (37d,) demostró también que esta vitamina no era similar a las vitaminas A y D, y que, aunque era semejante a la vitamina E, con respecto a la solubilidad y resistencia al calor y al aire, era diferente de ella, porque la administración de grandes cantidades de vitamina E, no ofrecía protección alguna en la enfermedad hemorrágica de los pollos.

En 1936, Almquist y Stokstad (5a), demostraron que la diatesis hemorrágica de los pollos podía curarse con la administración de alfalfa. El factor antihemorrágico estaba contenido en la fracción no saponificable de los lipoides de la alfalfa; la clorófila y la fracción esterólica eran impotentes y ninguna carotina ni xantofila eran efectivas como agentes antihemorrágicos. El factor fué obtenido de la alfalfa seca, extractándolo por el exano y luego por la acetona; después se concentraba por destilación. A bajas presiones podía ser destilado a 120 y 140°C de modo que 0.002 gr. del producto eran suplemento suficiente para un kilogramo de alimento. El concentrado, así obtenido, era inestable en extracto alcalialcohólico incoloro, contenía muy poca cantidad de nitrógeno, pero nó sulfuros ni fósforo. Los test colorimétricos indicaban un núcleo inólico (5b, 6a, 39b). Posteriormente, el factor liposoluble fué preparado del pescado putrefacto (5b), por medio del éter de petróleo, obteniéndose un producto de color oscuro, de olor desagradable, que poseía una considerable actividad antihemorrágica.

De 1935 a 1936, Hawkins y Whipple (55), y Hawkins y Brinkhous (54), independientemente, demostraron la tendencia hemorrágica de los perros con fístula biliar provocada y que ella se debía a una deficiencia de protrombina en el plasma. En 1935, Quick y sus asociados, (84), señalan una baja del nivel de protrombina en la sangre de los ictericos, lo que fué confirmado en 1937 por Smith, Warner y Brinkhous (24), quienes encontraron la íntima relación entre la formación de protrombina y la función hepática. Trabajando con perros intoxicados con cloroformo (25), observaron que el nivel de protrombina caía rápidamente, en los casos de envenenamiento rápido, dentro de las 24 horas a 15 y 5 % de lo normal, y que 6 o 7 días después el retorno a la normal era completo.

Como consecuencia de estos trabajos, Quick (83), en 1937, propone, por primera vez, el empleo de vitamina K en el tratamiento de las hemorragias que se presentan en las icterias por obstrucción, pero sin apoyarse en ningun hecho experimental. En 1938, Smith, Warner, Brinkhous y Seegers, (99), determinaron la relación que existe entre la vitamina K y el nivel de protrombina en la sangre de los perros con fístula biliar. Ya en el año anterior, Schmidt y Greaves (53), habian señalado el aumento del tiempo de coagulación, asociado a una deficiencia de protrombina del plasma, en ratas portadoras de fístula biliar, la que podía corregirse por administración de vitamina K y bilis de buey, a dosis de 2 a 3 cc., combinadas.

En 1938, Warner, Brinkhous y Smith, (24d) relatan el primer caso de uso clínico de vitamina K. En el mismo año, Butt, Snell y Osterberg en los Estados Unidos (28a,b,e,f) y Dam, Glavind y sus colaboradores en Dinamarca (38a), demostraron que la vitamina K, administrada al hombre, podía aumentar el porcentaje de protrombina en la sangre de los pacientes que sufrían de ictericia obstructiva, y también, prevenir y controlar las hemorragias que presentan frecuentemente. Similares resultados obtuvieron los primeros (28a), con la administración de bilis sola a un paciente al que se mantenía con una dieta adecuada; pero la administración de vitamina K sola, cuando la bilis estaba ausente del intestino y la dieta era deficiente, no tenía ninguna acción sobre el tiempo elevado de protrombina.

En 1940, Hepding y Moll (59), describen lesiones parenquimatosas en el hígado y riñones de los pollitos en carencia de vitamina K, que no habían sido señaladas hasta entonces. Kark y Lozner (61), demuestran que esta avitaminosis puede presentarse en el hombre con una dieta carencial, está asociada a un descenso de los valores de protrombina en la sangre y puede curarse por la administración de concentrados de vitamina K. Entre nosotros, Angulo Bar (13), hace un estudio sobre valores de protrombina en sujetos normales.

Estas investigaciones llevaron a admitir que, para el hombre y ciertas especies de animales, era esencial el factor liposoluble llamado vitamina K y que su empleo podía prevenir y curar ciertas tendencias hemorrágicas que se presentan en las carencias esenciales de vitamina K, en los pacientes ictericos o en los portadores de una fístula biliar.

## 2) DISTRIBUCION.

La presencia de vitamina K en plantas y tejidos animales ha sido demostrada ampliamente. Se encuentra distribuída en la naturaleza en gran proporción y su mayor fuente la constituyen las partes verdes de los vegetales, siendo de menor contenido aquellas que crecen en la oscuridad (5b, 7, 27 38b). Según Fieser (48), el mayor porcentaje de vitamina K estaría contenido en las partes que contienen clorófila. También se le encuentra en la putrefacción bacteriana (7), lo mismo que en las heces frescas del hombre y de los animales, y su actividad depende de su contenido bacteriano (27, 29). Toda la vitamina K contenida en el organismo parece ser de origen exógeno. Se ha podido observar su completa ausencia en los órganos de los animales sometidos a dietas deficientes en vitamina K; mientras que en los pollos mantenidos con dietas normales se le ha encontrado en todos los órganos examinados. Butt y Snell (29a), han demostrado que la bilis colectada asépticamente no tiene ninguna actividad vitamínica K, observaciones que han sido confirmadas por D. Dann (43a) y J. D. Greaves (52).

El siguiente cuadro, tomado de la obra de Butt y Snell (29a), muestra el porcentaje y actividad en vitamina K de las diferentes plantas y tejidos.

**DISTRIBUCION DE VITAMINA K EN PLANTAS Y TEJIDOS  
SEGUN BUTT Y SNELL**

FUENTE		ACTIVIDAD
<b>Vegetales :</b>		
Hojas de castaño . . . . .	480 mgr.	++++
Espinacas . . . . .	330 „	++++
Col. . . . .	240 „	+++
Coliflor . . . . .	240 „	+++
Alfalfa . . . . .	240—120	++
Agujas de pino . . . . .	120— 60	+
Tomates . . . . .	120— 60	+
Habas chinas (soy bean) . . . . .	120— 60	+
Cañamones . . . . .	120— 60	+
Avena . . . . .	60— 30	—+
Maíz . . . . .	60— 30	—+
Trigo . . . . .	60— 30	—+
<b>Bacterias :</b>		
Escherichia coli . . . . .		++
Bacillus subtilis . . . . .		++
Staphylococcus aureus . . . . .		++
<b>Excretas :</b>		
Heces humanas . . . . .		++
Heces de pollo . . . . .		++
Fístula biliar humana infectada . . . . .		++
Fístula biliar humana estéril. . . . .		--
Orina humana . . . . .		--
<b>Tejidos secos :</b>		
Harina de pescado putrefacta . . . . .	550 mgr.	+++++
Cerdo, pollo, perro, hombre . . . . .	60— 30	+

### 3) METODOS USADOS PARA MEDIR LA ACTIVIDAD VITAMINICA K.

Dos métodos se han empleado de preferencia para medir la actividad antihemorrágica de los diversos preparados. El primero, introducido por Dam (38d), y utilizado después por Almquist, Stokstad y sus colaboradores (5c, 6a, 8), es conocido como "método preventivo". El segundo, empleado primero por Schönheyder (96), y casi al mismo tiempo por F. Dann (43b), se conoce como "método curativo". En los primeros ensayos, Dam (38d), alimentaba un lote de pollos, durante un mes, con dieta deficiente en vitamina K; al mismo tiempo, otro lote de pollos recibía la dieta carencial y la sustancia cuya actividad se quería medir. La acción protectora de esta sustancia se determinaba midiendo el tiempo de coagulación de la sangre de los pollos; cuando en los animales alimentados con la dieta que contenía el material de ensayo, el tiempo de coagulación era más corto que el de los animales en carencia, se decía que esta sustancia era activa en vitamina K.

Fue Schönheyder (96a), quien introdujo el método curativo de ensayo. Se basa en la observación de que en los pollos con avitaminosis K, el tiempo de coagulación de la sangre volvía a la normal, tres días después de haber ingerido suficiente cantidad de alimento que contenía dicha vitamina. El tiempo de coagulación era determinado por el método de Quick. (83). Trabajos similares fueron realizados por Almquist, Stokstad y sus asociados (5c, 6a, 8), y por F. Dann (43b).

Thayer y sus colaboradores (65a), confirmaron los trabajos de Schönheyder, usando una técnica más simple para determinar el tiempo de coagulación. Poco después, Ansbacher, (14b), describe un nuevo tipo de bioensayo utilizando dietas de pescado, lo que impediría la síntesis bacteriana de vitamina K. Más tarde, Flynn y Warner (51a), trabajando con ratas en carencia de vitamina K, describen un nuevo método biológico. Después de mantener a los animales con dietas pobres en vitamina K, durante 6 a 8 semanas, se les liga el conducto colédoco, bajo anestesia con eter, cerrando la incisión con suturas de seda. Los animales presentan hemorragias a los pocos días. El nivel de protrombina desciende a 25 y 10 % de lo normal dentro de las 72 horas de la operación, y la respuesta al

tratamiento con vitamina K, administrada por vía endovenosa o intraperitoneal, se mide por el retorno del nivel de protrombina a la normal.

Ultimamente, Elliot y sus asociados (46), alimentando ratas con dietas que contienen 20 % de su peso de aceite mineral, han producido deficiencias de protrombina. Parece que el aceite inhibe la absorción de vitamina K, así como la de vitamina A y carotina. Butt y Snell (29a) estiman que este método es conveniente y tiene valor suficiente para ser incorporado entre los bio-ensayos utilizados para medir la actividad de vitamina K.

Tridrick y sus colaboradores (110), han criticado estos métodos, haciendo notar que las técnicas de ensayo se basan en la determinación del tiempo de coagulación de sangre total y no sobre los niveles de protrombina, y que tampoco indican el porcentaje de vitamina K necesario para efectuar una cura completa.

### **DEFINICION DE LA UNIDAD DE VITAMINA K.**

Con respecto de la unidad correcta e internacional de vitamina K todavía no se ha llegado a ningún acuerdo. Cada grupo de investigadores ha señalado su propia unidad, existiendo una gran disparidad de criterio. Así, Schönheyder (96), define la unidad de vitamina K, como la más pequeña dosis diaria, por gramo de pollo, de la sustancia de ensayo que, administrada durante tres días, es capaz de reducir el valor S (tiempo de coagulación) de 1.500 a 10 segundos.

Thayer (109), considera como unidad, la cantidad de sustancia administrada en 3 días, necesaria para reducir el tiempo de coagulación a 10 minutos, en el 50 % de un lote de pollos puestos en carencia. Ultimamente Thayer, Doisy y sus asociados (109) han sugerido el empleo de la 2—metil—1,4—naphthoquinona, para determinar la actividad de los diversos preparados; una unidad representa la actividad de un microgramo de este compuesto: Así un mgr. de vitamina K, contiene 1000 Unidades Thayer-Doisy.

En opinión de Ansbacher (14b), la unidad de vitamina K, es la cantidad mínima necesaria para volver a la normal el tiempo de coagulación de la sangre de un pollo en avitami-

nosis K, que pese de 70 a 100 gramos, seis horas después de administrar la sustancia de ensayo. Hace una comparación entre su unidad y las unidades de los otros autores con sus valores relativos (29).

### DIETAS DE CARENCIA.

Casi todos los investigadores han utilizado, para sus experiencias, dietas de carencia en vitamina K semejantes en su composición. Así tenemos la dieta de Dam, la dieta E. de Almquist y Stokstad, la Ration K-1 de Ansbacher, la Ration 240 H de Kline, etc., en las cuales pollitos de raza Leghorn blanca, empollados en incubadoras, han servido de animales de experimentación y en los que la carencia se desarrolla de tres a cuatro semanas, lo mismo que en patos y gansos. Casi todas estas dietas contienen extractos etéreos de pescado, levadura de cerveza y caseína, por ejemplo la dieta E de Almquist y sus colaboradores (5-b) se compone de:

Extracto etéreo de pescado . . . . .	17,5	g
Extracto etéreo de levadura de cerveza	7,7	„
Polvo de arroz pilado . . . . .	72,8	„
NaCl cant. despreciable de CuSO <sub>4</sub> . . . .	1,0	„
Aceite de hígado de bacalao medicinal	1,0	„

Sin embargo, se ha encontrado frecuentes deficiencias con el empleo de dietas que contienen extractos etéreos de pescado, aún en condiciones que tiendan a llevar al minimum la acción bacteriana, pues el pescado es una excelente fuente de vitaminas antihemorrágicas naturales; por lo que Ansbacher (14b) en 1940, ensaya una nueva dieta que no contiene harina de pescado ni levadura y en la que la vitamina K ha sido destruida por la acción continuada del calor. Su uso, aparentemente, no permite la síntesis bacteriana de vitamina K. Es la llamada Ration K-7 de Ansbacher, y parece similar a la Ration 240-H de Kline, con la diferencia de que la acción del calor se prolonga de 36 a 180 horas. Esta Ration K-7 de Ansbacher se compone de:

Mezcla de granos sobrecalentada. . . . .	83	g
Caseína . . . . .	12	„
Mezcla salina . . . . .	2	„
Ca Co <sub>3</sub> . . . . .	1	„

La mezcla de granos contiene 25 partes de trigo midlings y 57 partes de maíz amarillo, conservada durante una semana en una estufa a 120°C. A cada 500 gramos de caseína se le añade una solución acuosa que contiene:

Clorhidrato de tiamina. . . . .	20	mgr.
Riboflavina . . . . .	20	„
Clorhidrato de B <sub>6</sub> . . . . .	20	„
Acido nicotínico . . . . .	1	gr.

El producto se mezcla y seca a una temperatura no mayor de 70°C. Pero, esta dieta no solo es deficiente en vitamina K, sino también en ácido pantoténico, por lo que Ansbacher aconseja añadir un concentrado de complejo B, que puede obtenerse de un extracto acuoso de salvado de arroz, similar al usado por Lepkovsky, muy rico en ácido pantoténico. Cuando los pollitos son alimentados con esta dieta crecen muy poco, presentan un gran aumento del tiempo de coagulación y desarrollan síntomas de avitaminosis entre los 7 y 12 días de iniciada la dieta y mueren aproximadamente en cuatro semanas, pudiendo presentar síntomas a los cuatro días y morir antes de dos semanas cuando viven en malas condiciones higiénicas, tienen acceso a sus heces y beben agua contaminada con la dieta.

#### 4) MATERIAL Y METODOS EMPLEADOS

Hemos utilizado la dieta de Dam y Schönheyder (40a), compuesta de:

Caseína Q. P. . . . .	20	g
Azúcar de caña. . . . .	62,3	„
Levadura seca en polvo. . . . .	15	„
Mezcla salina . . . . .	2,7	„

(La mezcla salina se compone de:  $\text{CaCO}_3$  2 gr.;  $\text{Mg CO}_3$  0,10 gr.; citrato de hierro amoniacal 0,16 gr.; I K 0,000025 gr;  $\text{NaCl}$  0,44 gr.). A 100 partes de esta dieta se le añaden 4 partes de aceite de hígado de bacalao. Para prevenir los errores de otras carencias hemos agregado por cada 100 partes de alimento:

Clorhidrato de tiamina . . . . .	0.003 gr.
Riboflavina . . . . .	0,002 „
Clorh. de piridoxina . . . . .	0,001 „
Acido nicotínico . . . . .	0,02 „
Acido pantoténico . . . . .	0,001 „
Acido ascórbico . . . . .	0,05 „
Vitamina A . . . . .	5.000 U. I.
Vitamina D . . . . .	500 U. I.

Los componentes sólidos se trituran en un mortero y se mezclan bien, añadiendo luego, gota a gota el aceite de hígado de bacalao y un poco de agua, hasta obtener una mezcla uniforme y seca.

Los animales empleados fueron pollitos de raza Leghorn blanca, de dos días de nacidos, empollados en incubadoras, criados en jaulas con piso de tela metálica para impedir la ingestión de materias fecales, y todos procedentes del mismo criadero. El agua y el alimento se coloca en dispositivos especiales para impedir el contacto con ellos, pues como contiene azúcar se pega a las plumas y los animales mueren por enfriamiento. Cerca de las jaulas se coloca una estufa eléctrica para mantener la temperatura uniforme, sobre todo en invierno. Los pollos de control reciben alimentación corriente de cereales y vegetales, a la que se añade harina de pescado, espinacas y leche en polvo, en proporción de 10 % de su peso.

Se pesa los animales y se determina el tiempo de coagulación de sangre total, que es de 5,5 minutos por término medio. Luego se les separa en lotes de 10 pollos cada uno que van a recibir las dietas de carencia y de control, respectivamente.

Para determinar el tiempo de coagulación se punciona la vena principal del ala, unas pocas gotas de sangre bastan para ello, que se reciben en tubos de prueba (100 x 12 mm.) y se llevan al baño maría a 37°5 C manteniéndolos en agitación

constante; un cronómetro marca el tiempo desde que la primera gota de sangre cae al tubo hasta la formación de un coágulo firme. Este tiempo es normalmente de 5 a 5'30".

La tasa de protrombina y el tiempo de Quick se determinan tomando la sangre por punción cardíaca (1 cc. de sangre es suficiente), usando una jeringa B. D. Yale, de 2 cc. y una aguja B. D. N° 20; se vierte 0,9 cc. de sangre en un tubo de centrifuga que contiene 0,1 cc. de solución N. 10 de oxalato de sodio; se mezcla bien y se separa el plasma por centrifugación. Este plasma contiene más o menos 85 % de protrombina. A los 7 días de dieta, el nivel de protrombina cae a 50 % y en los 6 días subsiguientes desciende a 30 % de lo normal para pollos de la misma edad. A medida que transcurren los días, disminuye más todavía, apareciendo hemorragias espontáneas cuando alcanza un valor de 10 %. La técnica usada para la determinación del tiempo de protrombina ha sido la de Quick (83d). Para su ejecución se requiere los siguientes reactivos:

Solución N/10 de oxalato de sodio.

Solución N/40 de cloruro de calcio.

Solución fisiológica que contenga 0,1 cc. de solución de oxalato de sodio (al 34 %), en cada 5 cc. de solución.

Solución de tromboplastina, recientemente preparada.

**Solución N/10 de oxalato de sodio.**—Se prepara disolviendo 1,34 gr. de oxalato de sodio J. P., en 100 c. de agua destilada.

**Solución N/40 de cloruro de calcio.**—Se disuelve 0,28 gr. de cloruro de calcio, J. P. anhidro, en 100 cc. de agua destilada. Esta solución no debe utilizarse después de una semana de preparada.

**Solución de tromboplastina.**—Quick (83d), aconseja usar una emulsión de sesos de conejo, en polvo desecado, que se prepara en el momento de la reacción. Para obtener este polvo, se sacrifica al animal por inyección de 20 cc. de aire en la vena dorsal de la oreja, o por punción del bulbo, separando la cabeza inmediatamente. Se extrae el cerebro, limpiándolo cuidadosamente, separando las meninges y los vasos sanguíneos.

triturrándolo en un mortero hasta formar una pasta uniforme. A esta pasta se le agrega 10 cc. de acetona y se continúa triturando, se decanta la acetona, se agrega una nueva porción, triturando continuamente, se decanta nuevamente, repitiendo la operación 5 o 6 veces; entonces se filtra, obteniéndose un producto granulado grueso que se extiende en una lámina de vidrio, se seca por evaporación y se mantiene a la estufa a 37° C durante 48 horas. Luego se tritura para obtener un polvo fino que se guarda en la refrigeradora en ampollas cerradas. Este polvo puede utilizarse hasta 3 meses después de preparado. Para preparar la emulsión se toman 0,5 gr. del polvo y se mezclan con 5 cc. de solución fisiológica que contiene 0,1 cc. de solución N.º 10 de oxalato de sodio y se incuba a 56° C por 15 minutos. Luego se centrifuga a gran velocidad (3.000 a 5.000 revoluciones) durante 15 minutos. El líquido lechoso que sobrenada se usa como solución de tromboplastina.

**Procedimiento.**—En pequeños tubos de prueba, de los que se usan para la reacción de Kahn, se coloca en orden siguiente:

- 0,1 cc. de plasma oxalatado
- 0,1 cc. de tromboplastina
- 0,1 cc. de sol. de cloruro de calcio N. 40

Con una pipeta de Kahn se toma 0,1 cc. de plasma oxalatado se le agrega 0,1 cc. de tromboplastina, mezclándolos bien; la mezcla se coloca en un baño de agua a 37°5 C. La temperatura del baño debe ser uniforme. Después se añade, manteniendo la mezcla en el baño, 0,1 cc. de solución N.º 40 de cloruro de calcio, agitando continuamente, se marca el tiempo con un cronómetro. Sin dejar de agitar, se mantiene el tubo en el baño hasta que se forme un coágulo firme, que marca el fin de la reacción. El tiempo normal para los pollos es de 45 segundos.

**EXAMEN HEMATOLOGICO.**—Los exámenes se han hecho seriados, obteniéndose la sangre por punción cardíaca. Para el recuento globular hemos utilizado la célula de Thomas, tomando la sangre con pipetas standard, certificadas. El recuento de leucocitos solo pudo llevarse a cabo después de algunos ensayos, empleando una solución de ácido acético al

10 %. La hemoglobina se determinó en el hemoglobinómetro de Sahli. El hematocrito y las constantes corpusculares fueron hechas según el método de Wintrobe (120).

**EXAMEN RADIOLOGICO.**—Las radiografías se tomaron en serie a los 6, 10, 19, 23 y 30 días, utilizando la siguiente técnica:

37 K. V.

50 M. a.

T : 0,10 de segundo

Distancia: 35,5 pulgadas.

## 5) EXPERIENCIAS REALIZADAS Y RESULTADOS OBTENIDOS

### a) EXPERIMENTACION.

Hemos estudiado 3 lotes de veinte pollos cada uno. Una vez pesados los animales, se les determinó el tiempo de coagulación de sangre total, separándolos en lotes de 10 pollos, que fueron alimentados con las dietas de carencia y de control, respectivamente. En estas condiciones, la avitaminosis se desarrolla, rápidamente, de dos a tres semanas. El primer síntoma que se observa es la aparición de edemas blandos, de color azulado, en la parte baja del abdomen, en los muslos y en la base de inserción de las plumas, pudiendo observarse hematomas, más o menos grandes, bajo el pulmón. El estado general está poco alterado. El apetito se conserva. Las plumas pierden su brillo y se separan del cuerpo dando a los animales un aspecto erizado y sucio. La cabeza conserva su aspecto normal, pero se observan hematomas periorbitales desde los primeros días. Las articulaciones se muestran edematosas. Simultáneamente con la aparición de estos síntomas, y a veces, antes de ellos, hay un marcado aumento del tiempo de coagulación y una caída gradual del nivel de protrombina en la sangre, que según Dam y Schönheyder (41), es debida a una falta de protrombina del plasma. El tiempo de coagulación llega a 30 minutos y a veces más, habiendo casos en que la sangre no coagula después de 24 horas. Entre las tres y cua-

tro semanas, los animales mueren, encontrándose en la autopsia, edemas blandos de consistencia gelatinosa debajo de la piel, pequeñas hemorragias en la pared anterior del tórax y abdomen, así como alrededor de la faringe.

Los animales fueron examinados a los 2, 3, 7, 9, 13, 16, 22, 26 y 30 días, determinando el tiempo de Quick y la tasa de protrombina en ambas series. Después de la punción cardíaca, cada pollito recibía una inyección subcutánea de suero fisiológico, de 1,5 cc.; los controles permanecían en buenas condiciones, recuperándose totalmente, no así los pollitos en carencia que morían dentro de las 6 a 8 horas de la punción, encontrándose a la autopsia un gran hematoma pericárdico. Los valores de protrombina y el tiempo de Quick hallados en estos animales, según los días y peso han sido los siguientes:

Nº A.	Edad días	Peso gr.	Tiempo de Quick en segundos	Tasa de protrombina %
1	2	44	45 " "	85%
2	5	47	150 " "	60%
3	7	50	300 " "	45%
4	9	58	600 " "	30%
5	13	65	1250 " "	15%
6	16	84	1500 " "	10%
7	19	97	1750 " "	8%
8 - -	22	120	Más de 1800 "	5%
9 +	26	134	---	—
10 +	30	142	---	—

En el siguiente diagrama se puede apreciar la curva de protrombina y el tiempo de Quick de este lote.

Cuando la tasa de protrombina era el 10 % de lo normal para pollos de la misma edad y el tiempo de Quick llegaba de 1.500 a 1.800 segundos, en una serie de pollos se inyectó 0.0005 gr. de 2-metil-14-naphtoquinona (Hemoquin), en solución oleosa, y en otra serie, se administró por vía oral 0,5 cc. de 2-metil-1,4-naphtoquinona, en solución de aceite de sésamo (Proklot de 0,001 gr. por cc.), más sales biliares (0'325 mgr.), repitiéndose la administración cada seis horas. A las 24 horas, se determinó el tiempo de Quick' el porcentaje de protrombina, encontrándose que el tiempo de Quick había descendido a

900 segundos y la tasa de protrombina era de 30 %. Una nueva administración hacía descender el tiempo a 600 segundos y la tasa se elevaba a 40 %. Continuando el tratamiento, dos días después el tiempo llegaba 120 segundos y la tasa alcanzaba un valor de 58 %, manteniéndose a este nivel o un poco más elevado, 65 % y 60 segundos, sin llegar a alcanzar los valores primitivos. En el diagrama adjunto se observa las curvas correspondientes a la tasa de protrombina y al tiempo de Quick, antes y después de la administración de vitamina K.

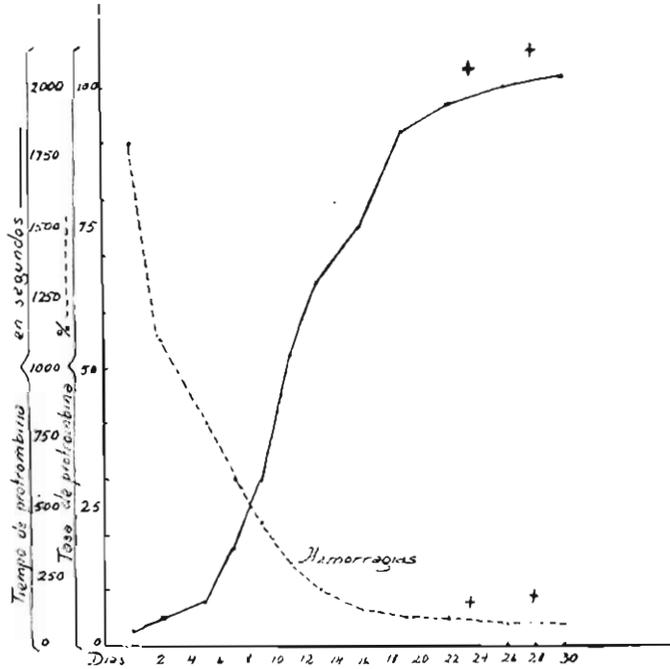


Diagrama N° 1

De estos lotes ha sido posible seguir a dos parejas de pollos, una de control y otra de carencia, que dos meses después de tratamiento de comportaban como los animales normales.

#### b) EXAMEN RADIOLOGICO.

No hemos encontrado al revisar la literatura médica, dato alguno sobre observaciones radiológicas en los animales de experimentación. Nos ha parecido útil ocuparnos de este as-

pecto del problema. Esos exámenes se realizaron en serie, a los 6, 10, 19, 23 y 30 días.

En las radiografías tomadas a los 10 y 19 días, solo se constata un retardo en la osteogénesis de los huesos largos, sin ningún otro signo de alteración en la arquitectura ósea, ni en las articulaciones (Dr. G. Faldini), comparadas con los controles tomados al mismo tiempo.

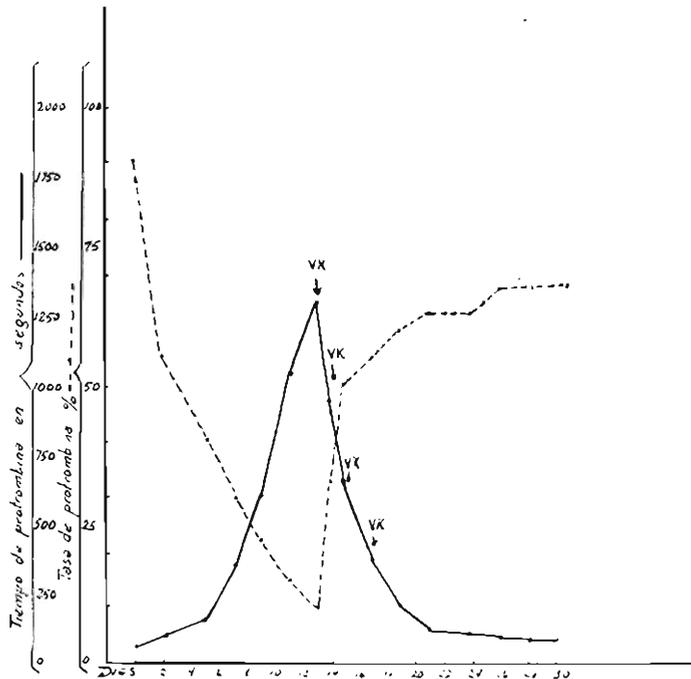


Diagrama N° 2

### c) EXAMEN HEMATOLOGICO.

Los exámenes se han hecho seriados, a los 7, 18, 21 y 30 días, obteniéndose la sangre por punción cardíaca.

Con referencia al cuadro hemático, solo hemos encontrado en la literatura, las cifras que citan Dam y sus colaboradores (37b), de 3.000.000 de eritrocitos para pollos normales, las de Palmer y Bielys (80), de 2.610.000 y los valores que anota Wintrobe (120a), también para pollos normales, como puede verse en el siguiente cuadro.

Nº G.R.	Nº G.B.	Hb. gr. %	Hmto	Vol. gb.	Hb. gb.	C. Hb. gb.
2.81	4.000	10.3	35.8	127	37	29

Nosotros hemos encontrado los siguientes valores para pollos normales, entre 7 y 30 días, siendo interesante anotar que el pollo N<sup>o</sup> 1, fué punzado a los 7 y a los 30 días, obteniéndose en cada punción 1 cc. de sangre, sin que el animal sufriera mayor alteración.

Nº A	Días	Nº G.R.	Nº G.B.	Hmto cgd.	Vo. gb.	Hb. gr. %	Hb. gb.	C. Hb. gb.
C-1	7	2.61	....	28.2	100	8.75	33.5	31.0
C-1	30	2.10	5.000	23.0	110	7.25	34.51	31.4
C-3	18	1.87	....	24.03	128.5	6.55	35.02	27.55
C-6	25	1.92	6.200	25.38	132.1	7.0	36.4	27.55

- 1) El número de hematíes varía entre 2,61 y 1,87 millones por milímetro cúbico.
- 2) El número de leucocitos entre 5.000 y 6.200 por milímetro cúbico.
- 3) El hematocrito corregido oscila entre 28,2 y 23.
- 4) El volumen globular entre 100 y 132 micras cúbicas.
- 5) La hemoglobina entre 8,75 y 7 gramos por ciento.
- 6) La hemoglobina globular entre 33,5 y 36,4 micromicrogramos.
- 7) La concentración de hemoglobina globular entre 31,0 y 31,4 por ciento.

Hay una desglobulización semejante a la que presentan los bebes recién nacidos, discretamente hipocrómica, que tiende a regresar a los 30 días. Las variaciones del número de hematíes, volumen globular y concentración de hemoglobina globular, pueden observarse en el diagrama siguiente.

En los animales en carencia, a igualdad de días con los controles, se observa que cuanto mayor es la avitaminosis, la anemia se acentúa, y se hace francamente hipocrómica y se

advierte tendencia a la macrocitosis. No hay signos de regresión. En estos animales, solo pudo hacerse un examen, porque morían 6 u 8 horas después de la punción, encontrándose a la autopsia, el pericardio ocupado por un gran hematoma. Los valores hallados, entre 7 y 30 días, han sido los siguientes:

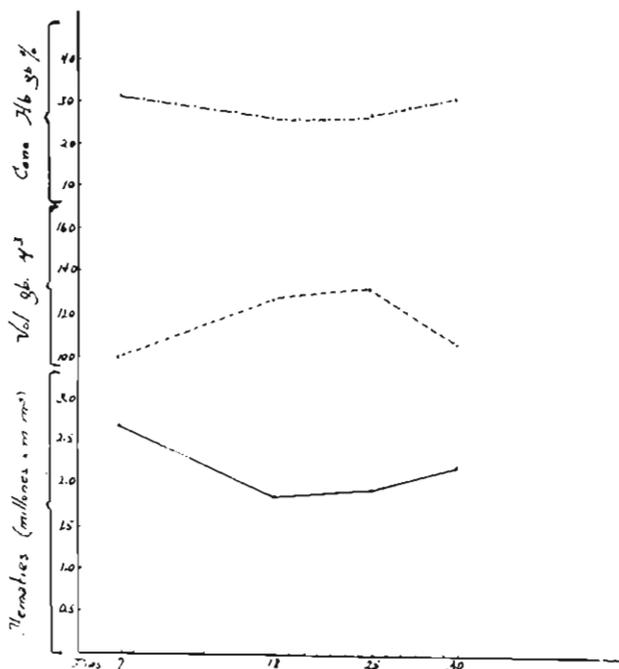


Diagrama N° 3

N° A	Días	N° G.R.	N° G.B.	Hmto cgdo.	Vol. gb.	Hb. gr. %	Hb. gb.	C. Hb. gb
K-2	7	2.22	.....	24.8	111.7	7.7	34.7	31.0
K-4	18	1.72	.....	19.16	111.4	4.75	27.61	24.79
K-5	21	2.15	5.900	27.51	127.9	6.25	29.1	22.72
K-8	30	1.30	5.800	19.0	146.0	4.0	31.8	21.8

- 1) El número de hematíes oscila en 2,22 y 1,30 millones por milímetro cúbico.
- 2) El número de glóbulos blancos permanece más o menos igual.

- 3) El hematocrito corregido varía entre 24,8 y 19,0.
- 4) El volumen globular entre 111,7 y 146,0 micras cúbicas.
- 5) La hemoglobina entre 7,7 y 4,0 gramos por ciento.
- 6) La hemoglobina globular entre 34,7 y 27,61 micromicrogramos.
- 7) La concentración de hemoglobina globular entre 31 y 21,8 por ciento.

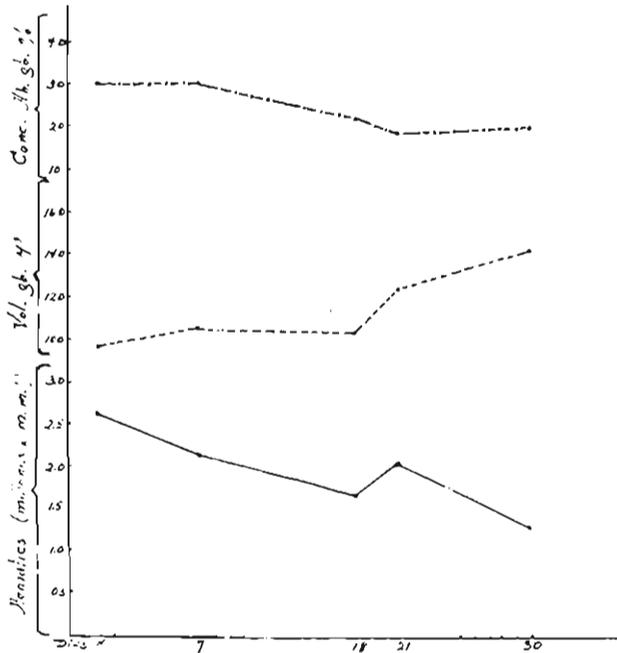


Diagrama N° 4

En el diagrama siguiente se han trazado las curvas correspondientes al número de hematíes, volumen globular y concentración de hemoglobina globular, de los animales en carencia.

Hematológicamente hay un descenso del número de glóbulos rojos, con aumento del volumen globular y disminución del contenido de hemoglobina, que si bien es cierto que en los controles ocurre algo semejante, la desglobulización que presentan éstos tiende a regresar hacia los treinta días, lo que no sucede con los animales en carencia, en los que se acentúa a medida que la avitaminosis es mayor, sin que se advierta ten-

dencia a la regresión. En el cuadro siguiente, hemos hecho una comparación entre los valores de los controles y los animales en carencia, a igualdad de días.

### CUADRO COMPARATIVO DE VALORES ENTRE 7 Y 30 DIAS

Nº A	Días	Nº Hematies	Va. gb.	Conc. Hb. gb. %
C-1	7	2.610.000	100.0	31.0
K-2	7	2.220.000	111.7	31.0
C-3	18	1.870.000	128.5	27.55
K-4	18	1.720.000	111.4	24.79
C-6	25	1.920.000	132.1	27.55
K-5	21	2.150.000	127.9	22.72
C-1	30	2.100.000	110.0	31.4
K-8	30	1.300.000	146.0	21.0

Con respecto al hemograma, Wintrobe (120a), y Blain, (21), dan los valores siguientes, para animales normales:

Nº G.R.	Nº G.B.	Polin. %	Eos. %	Bas. %	Mon. %	Linf. %	
2.81	4.000	19.0	30.0	3.0	...	48.0	(Wintrobe)
....	18.600	8.7	49.4	3.6	5.7	32.8	(Blain)

Nosotros, en los animales de control, hemos encontrado que:

- a) La fórmula leucocitaria es a predominio linfocítico, oscilando entre 77 y 46 elementos por ciento.

- b) Con el crecimiento del animal y paralelamente a la desglobulización, cuando ésta alcanza su mayor intensidad, parece que los linfocitos disminuyen para regresar a las cifras iniciales, conforme aumenta la cifra de eritrocitos.
- c) El porcentaje de monocitos oscila entre 7 y 20 %, y, a la inversa de los que ocurre con los linfocitos, alcanza su mayor intensidad cuando la desglobulización es mayor, regresando a las cifras primitivas con el aumento de hematíes.
- d) La serie mieloide se mantiene igual.
- e) En tres de los casos examinados se encontraron polinucleares basófilos en proporción de 2 %.

El cuadro y diagrama siguientes muestran los valores de los animales de control.

Nº A	Días	Nº G.R.	Nº G.B.	Polin. % J. A. S.	Eos. %	Bas. %	Mon. %	Linf. %
C-1	7	2.61	.....	0 4 12	0	2	7	77
C-3	18	1.87	.....	0 4 29	0	1	20	46
C-6	25	1.92	5.200	0 6 11	0	2	21	60
C-1	30	2.10	5.000	0 1 16	0	0	10	73

En los animales en carencia, a igualdad de días con los controles, se observa que:

- a) Conforme se acentúa la avitaminosis, aumenta el porcentaje de polinucleares neutrófilos, a predominio de formas segmentadas, y con aparición de formas juveniles.
- b) Los linfocitos van disminuyendo con la carencia, sin que se observen signos de regresión.
- c) En ningún caso se encontraron elementos basófilos.

Nº A	Días	Nº G.R.	Nº G.B.	Polin. % J. A. S.	Eos. %	Bas. %	Mon. %	Linf. %
K-2	7	2.22	....	0 5 10	0	0	8	77
K-4	18	1.72	....	0 8 21	0	0	20	51
K-5	21	2.15	5.900	1 7 46	0	0	10	36
K-8	20	1.30	5.800	4 9 54	0	0	4	29

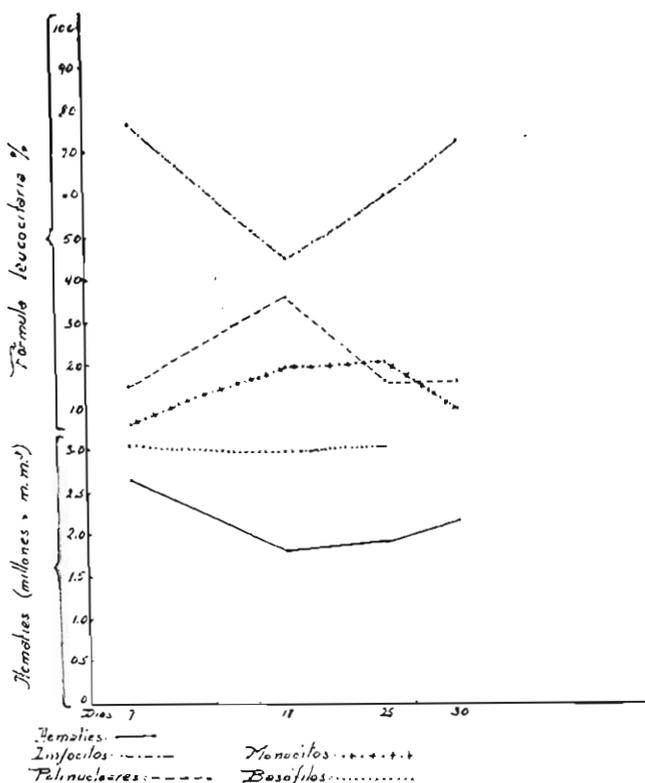


Diagrama Nº 5

Esta anemia pronunciada, francamente hipocrómica, con tendencia a la macrocitosis, aparición de formas juveniles, y con una médula ósea pobre en elementos celulares, no podría tratarse de una anemia posthemorrágica, como suponen Almqvist, Mecchi y Klose (8b), ya que se presenta, aún, en animales que en ningun momento presentaron hemorragias espontáneas.

d) **ANATOMIA PATOLOGICA.** (Sr. O. Urteaga).

Los exámenes se han hecho seriados, a los 7, 18, 25 y 30 días, sacrificando a los animales por sección del cuello, amputándose inmediatamente antes, (in vivo), la tibia y el fémur para observar médula ósea.

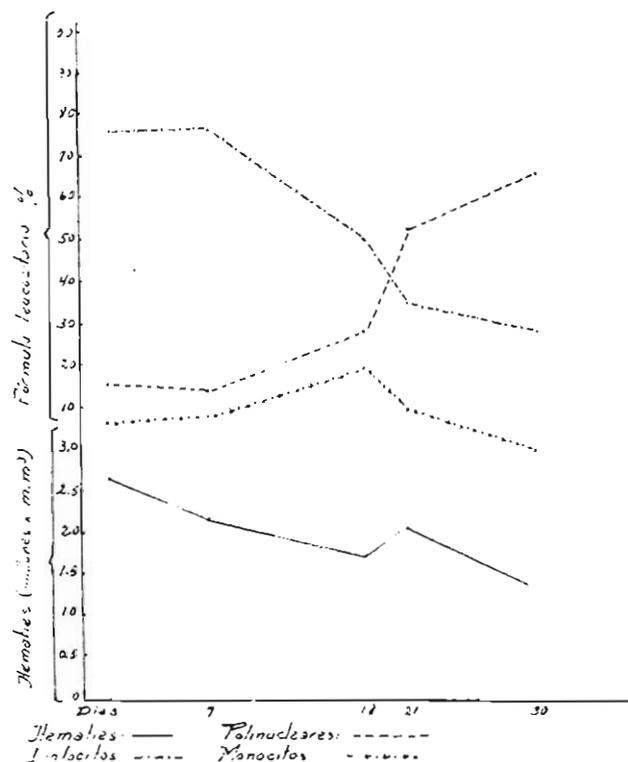


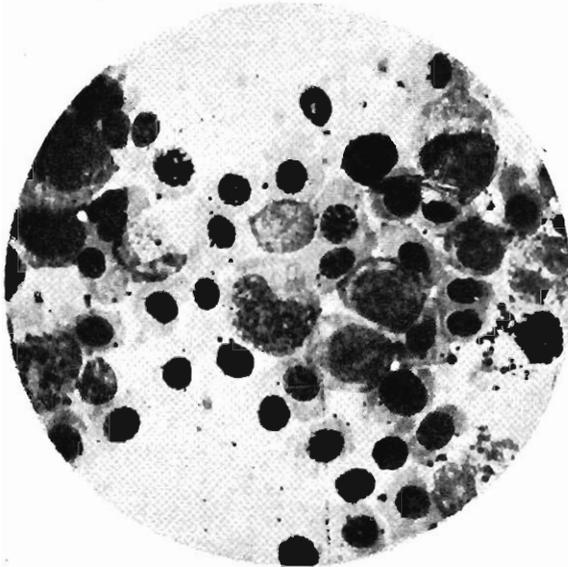
Diagrama N° 6

**CONTROLES.**—Se encontraron los caracteres siguientes :

**Médula ósea.**—Se encuentra en mayor proporción en la tibia, de color rojo y en regular cantidad, en los animales más jóvenes. En menor proporción en el fémur y muy escasa en el esternón. Al examen microscópico, (microfotografía N° 1), se observa que el mielograma es de tipo eritroblástico y linfocítico. Hay regular proporción de cariocinesis (Míc. N° 2). La

serie mieloide está presente, pero en menor proporción. La reacción de las oxidasas es positiva débil.

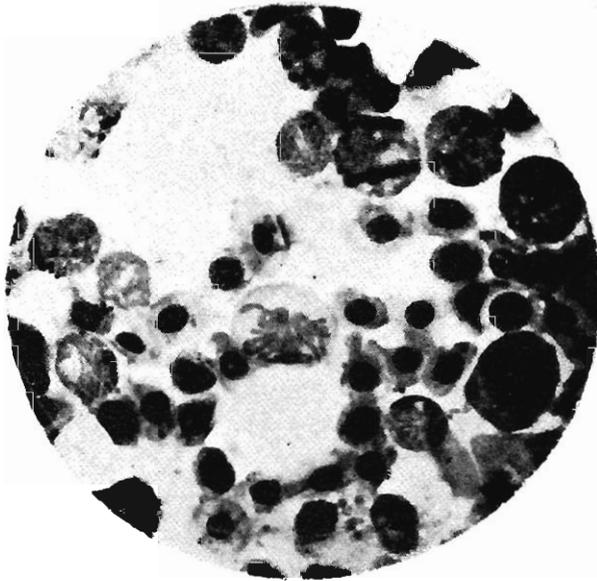
**CORAZON.**—Caracteres macroscópicos normales. Al examen microscópico, las fibras presentan buena afinidad cromática y están orientadas en distintos sentidos. Los núcleos se destacan netamente. Hay espacios conjuntivos con capilares sanguíneos bien manifiestos. A mayor aumento, no se observa vacuolización ni inclusión de las fibras.



Microfotografía N° 1

**HIGADO.**—Macroscópicamente de color pardo rojizo, liso. Al examen histológico, presenta una buena afinidad tintorial. Los espacios porta son amplios y en ellos se destacan bien las ramificaciones venosas. El lobulillo hepático no presenta la disposición poligonal clásica, característica, las trabéculas están orientadas en distintas direcciones. Las células hepáticas, bien coloreadas por la eosina, con núcleos claros; en algunos puntos concentraciones de cromatina en acúmulos gruesos. Algunas células con dos núcleos. Escasos hematíes entre las células hepáticas, reconocibles por su núcleo y protoplasma. Algunas células conjuntivas alargadas, entre las trabéculas hepáticas, parecen ser células de Kupffer. No hay signos de fagocitosis.

**Espacios porta.**—A pequeño aumento se observan algunos núcleos de células de tipo redondo. A gran aumento se constata que éstos son núcleos linfoides. Se observan canaliculos biliares de aspecto alargado y capilares sinusoides bien manifiestos. En otro corte se observa, a pequeño aumento, que las células hepáticas no presentan en absoluto la disposición en lobulillos. En los espacios porta predominan las ramificaciones venosas de la porta y de la arteria hepática. Los capilares biliares son bien manifiestos. Algunas ramas de la porta están llenas de hematíes y leucocitos. El aspecto de todo el



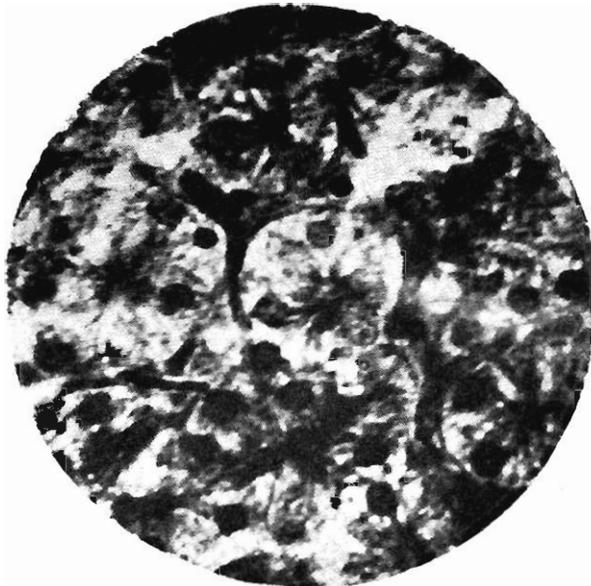
Microfotografía N° 2

corte, donde no se visualizan los espacios porta, hace pensar en un órgano de tipo cromafin (corpúsculo carotideo, cápsula suprarrenal), menos que se trate de hígado.

A mayor aumento, se constatan las células hepáticas de tipo redondo, unas al lado de otras; el protoplasma es espumoso, vacuolado, en algunas zonas, de aspecto radiado. Núcleos compactos. No se visualizan capilares sinusoides entre las células, ni tampoco células de Kupffer. La coloración al Sudan III, es negativa, lo que indica que la vacuolización no es debida a grasa. Este aspecto del hígado (Microf. Nc 3), con células de contorno no poliédrico, de protoplasma espumoso y au-

sencia de capilares sinusoides, muestra un particular parecido al hígado asimilatorio descrito por Forsgren en 1929, en relación con el ritmo glucogénico hepático, y por Weiss en 1936 (119) en el hígado del perro; comentando ampliamente por Urteaga, Aguilar y Cuba en una comunicación a la Academia de Ciencias (trabajo no publicado).

En otro caso, se observa el hígado enteramente opuesto al anterior, las trabéculas hepáticas bien delimitadas, los capilares sinusoides bien visibles. A mayor aumento, las célu-



Microfotografía N° 3

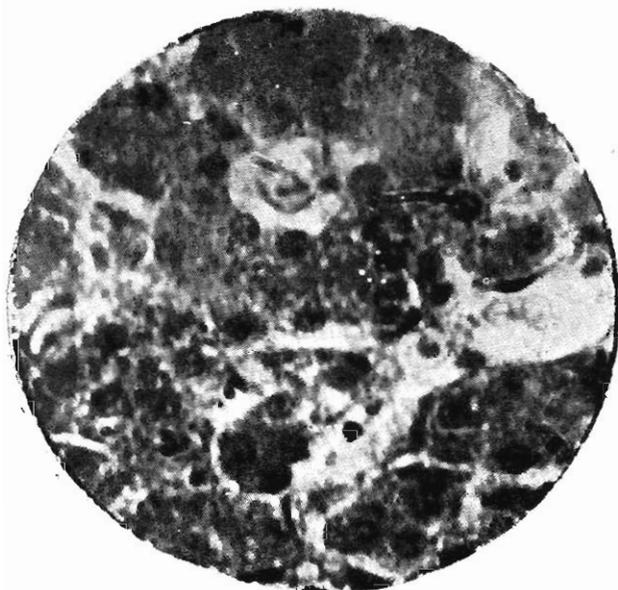
las hepáticas de protoplasma compacto con núcleos bien netos, podría relacionarse con el aspecto descrito por Forsgren (50) del hígado secretorio, en el trabajo antes citado (Microf. Nc 4).

**BAZO.**—Macroscópicamente se destaca de aspecto y coloración normal. A pequeño aumento, está caracterizado por arterias bien manifiestas, gruesas, llenas de hematíes por todos los sectores, centro, borde y contornos de la cápsula de Malpighi. Núcleos linfoides perfectamente redondeados, vecinos a la arteria pero sin envolverla. Todo el parénquima

más o menos homogéneo. No hay distinción entre la parte medular y la cortical (Microf. N° 5).

A gran aumento se constata: células linfáticas de escaso protoplasma y gran núcleo. Las más periféricas, más grandes, parecen tener nucleolo. Las centrales más pequeñas y claras. No hay cariocinesis. Algun leucocito polimorfo nuclear. Las arterias son de paredes gruesas. El endotelio se visualiza no muy aplanado.

Los otros órganos, de aspeto y caracteres normales.



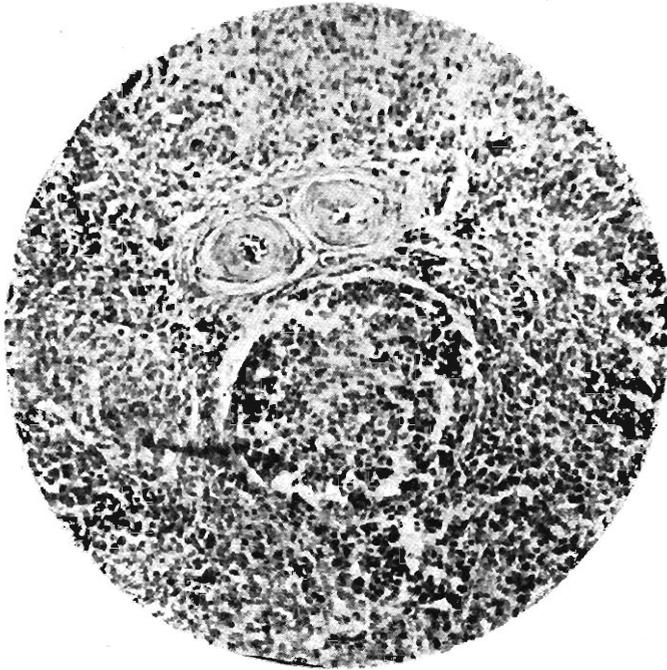
Microfotografía N° 4

En los animales en carencia, los exámenes fueron hechos al mismo tiempo y empleando los mismos procedimientos que en los controles.

**MEDULA OSEA.**—Cuanto mayor es el tiempo de la avitaminosis, el mielograma es más pobre en elementos celulares y hay mayor proporción de grasa, con uno que otro eritroblasto y linfocito, aislados, presentando un aspecto semejante a la anemia aplásica humana. Lo que primero desaparecen son las cariocinesis. La reacción a la oxidasas es negativa. En el caso N° 4 (18 días) se encontró el canal medular de la tibia y el fémur ocupado, casi en su totalidad, por una sustancia de co-

lor amarillento, de aspecto grasoso. A la tinción de la lámina, el colorante se corría hacia los lados. Al examen microscópico se encontraron escasos elementos celulares. En los otros huesos largos no se encontró médula ósea.

Al examen de los otros órganos, macroscópicamente, se observan pequeñas zonas de hemorragias subcutáneas, más extensas en la parte anterior del abdomen y tórax. Hematomas retrofaringeos y orbiculares, y algunas veces en la base de inserción de las plumas. Organos abdominales p;licos. Algunas veces se constata una micropoliadenia.

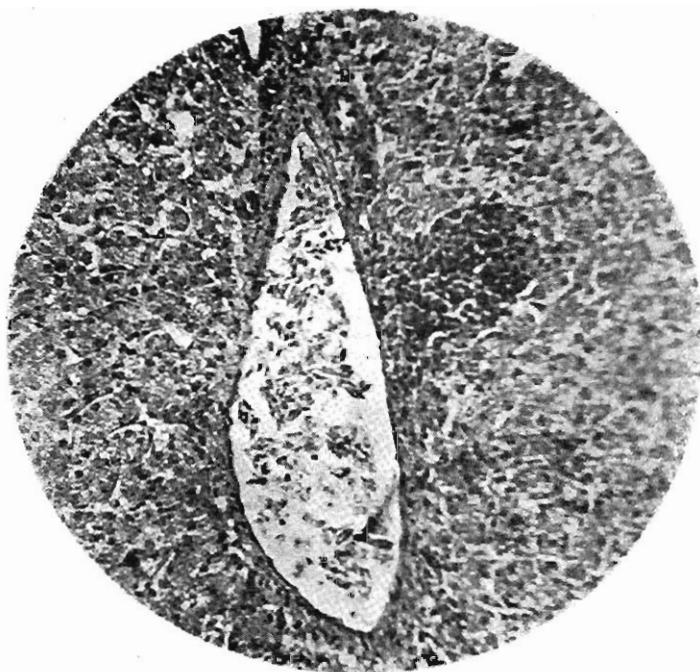


Microfotografía N° 5

**CORAZON.**—Macroscópicamente, parece haber aumento de la grasa periférica. El pericardio contiene una pequeña cantidad de fibrina. Microscópicamente, a pequeño aumento, se constata aumento de la grasa subpericárdica (pericardio visceral, con focos de hemorragias y en algunos sitios pequeña cantidad de una sustancia hialina, de aspecto de fibrina. Las fibras miocárdicas con caracteres normales. Hay aumento de los capilares sanguíneos, los que se encuentran llenos de sangre.

**HIGADO.**—De color pardo amarillento, liso. Al corte, se observan pequeñas zonas de hemorragia y tractos de degeneración grasosa.

**Examen histológico.**—A pequeño aumento, se observa una discreta organización trabecular. Entre las columnas hepáticas se aprecian capilares intertrabeculares. Espacios porta muy amplios. La vena porta muy dilatada y llena de sangre. (Micrf. N<sup>o</sup> 6 y 7). En algunos espacios porta se observan acú-



Microfotografía N<sup>o</sup> 6

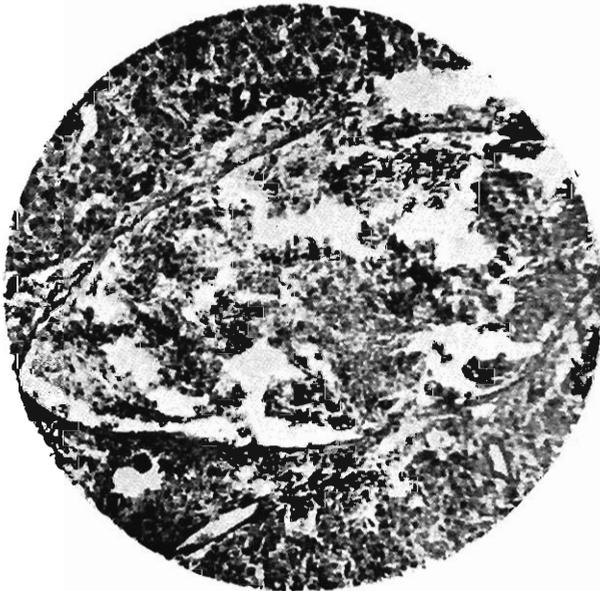
mulos de células redondas, cuyos núcleos se tiñen intensamente con la hematoxilina.

A mayor aumento, las células hepáticas se presentan poliédricas. El protoplasma presenta una pequeña vacuolización, fina. En algunos sitios, los núcleos están llenos de grumos de cromatina. Entre las trabéculas hepáticas, capilares sanguíneos en los que se observa uno que otro hematíe y células conjuntivas alargadas, probablemente células de Kupffer. No hay signos de hematofagia. La coloración al Sudan

III de las pequeñas vacuolitas indica discreta degeneración grasosa. En algunos sitios pequeñas zonas de hemorragias.

**BAZO.**—Pequeño, pálido, casi blanquecino. El aspecto histológico más o menos conservado.

**RIÑONES.**—De coloración blanco-amarillenta, aspecto arcilloso, grandes, penetran profundamente en la pelvis. Friables. El examen histológico revela una degeneración de la sustancia glomerular, a predominio albuminoide.



Microfotografía N° 7

**ESTOMAGO E INTESTINO.**—Algunas veces, hemorragias subserosas y en ocasiones, presencia de ulceraciones muy pequeñas en el intestino; erosiones discretas en la molleja. Estas lesiones, según Almquist, y Stokstad (5) y Garret Cheney (36d), no dependen de la carencia en vitamina K.

Los otros órganos con caracteres normales.

## RESUMEN

- 1) Hemos hecho un ensayo experimental de avotamionosis K con el fin de estudiar las lesiones hitopatológicas y radicio-

lógicas en relación con las alteraciones hematológicas y las variaciones de protrombina en la sangre.

- 2) El cuadro clínico observado en los animales es semejante en todos sus aspectos al descrito por Dam, Schönheyder, Almquist y sus colaboradores.
- 3) Con respecto a los valores de protrombina y tiempo de Quick, anotamos :
  - a) Valores normales : En los animales de control, la tasa normal de protrombina es de 85 % y el tiempo de Quick es de 45 segundos.
  - b) En los animales en carencia, cuanto mayor es la avitaminosis, el tiempo de Quick es mayor y la tasa de protrombina disminuye hasta el 5 % de lo normal para pollos de la misma edad.
  - c) La administración de 2-metil-1,4-naphtoquinona a los animales en carencia con tiempo de Quick elevado y tasa de protrombina baja, hace variar estos valores hacia los límites normales, pero sin alcanzar los valores primitivos.
- 4) **Examen radiológico.**—En opinión del Dr. G. Faldini, en nuestros casos solo se encuentra un retardo de la osteogénesis sin ninguna otra alteración en la arquitectura ósea. No hemos encontrado en la literatura referencia alguna sobre el particular.
- 5) **Examen hematológico :**
  - a) En los animales normales observados durante 30 días, se encontró que los valores eran semejantes a los de Dam, Palmer, Bielys y Wintrobe. Estudios en serie en este intervalo de tiempo permiten observar una desglobulización semejante a la de los recién nacidos, discretamente hipocrómica y que tiende a regresar a los 30 días.

- b) En los animales en carencia, a igualdad de días con los controles, se observa que, cuanto mayor es la avitaminosis, la anemia es mayor, francamente hipocrómica y con tendencia a la macrocitosis. No se advierte signos de regresión.
- c) el hemograma en los animales normales a predominio linfocítico. En los animales en carencia observamos una disminución de la linfocitosis con correlativa neutrofilia y aparición de formas juveniles.
- d) Médula ósea : El mielograma normal es de tipo eritroblástico y linfocítico, con regular proporción de cariocinesis; reacción de las oxidasas positiva débil.

En los animales en carencia, el mielograma es pobre en elementos celulares, con gran proporción de grasas. Desaparición de las cariocinesis. Reacción a las oxidasas negativa, presentando un aspecto semejante al de la anemia aplásica humana.

- 6) Lesiones histopatológicas.—Se observa :
- a) Degeneración grasosa del corazón.
  - b) Discreta degeneración grasosa y presencia de focos hemorrágicos en el hígado.
  - c) Bazo : pobre en sangre, de aspecto histológico más o menos conservado.
  - d) Riñones : Degeneración discreta de la zona cortical.
  - e) Estómago e intestino : hemorragias subserosas; erosiones pequeñas de tipo ulceroso.

## BIBLIOGRAFIA

1. — Aggeler, P. M., Lucia, S. P. & Goldman, L. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., Abril 1940.
2. — Aggeler, P. M. & Lucia, S. P. : Am. J. Med. Sc. Marzo 1941.
3. — Allen, J. C. & Julian, O. C. : Arch. Surg. Mayo 1940 .
4. — Almquist, H. J. : Biol. Chem. Mayo 1936, Feb. 1937.—Phys. Rev. Enero 1941.
5. — Almquist, H. J. & Stokstad, E. D. R. : J. Biol. Chem. Sep. 1935.—J. Nutrition, Oct. 1936, Sep. 1937.
6. — Almquist, H. J. & Klose, A. A. : J. Am. Chem. Soc. Junio 1939. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. Oct. 1940. J Biol. Chem. Enero 1940.
7. — Almquist, H. J., Plenter, C. F. & Mecchi, E. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. Abril 1938.
8. — Almquist, H. J., Mecchi, E. & Klose, A. A. : Biochem. Nov. 1939. J. Biol. Chem. Oct. 1938.
9. — Almquist, H. J. & Mecchi, E. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 1941.
10. — Andrus, W. D., Lord, J. W. Jr. : J. A. M. A., Abril 1940.—Arch. Surg. Sep. 1940.
11. — Andrus, W. D., Lord, J. W. Jr., & Kauer, J. T. : Science, Enero 1940.
12. — Andrus, W. D., Lord, J. W. Jr. & Moore, R. A. : Surgery, Dic. 1939. Arch. Surg. Sep. 1940.
13. — Angulo Bar. : Biol. Soc. Quim. Dic. 1941.
14. — Ansbacher, S. : J. Nutrition, Abril 1939.—Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., Mayo 1940.
15. — Ansbacher, S. & Fernholz, E. : J. Biol. Chem. Nov. 1939.
16. — Ansbacher, S. Fernholz, E. & Dolliver, M. A. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., Abril 1940.
17. — Ansbacher, S., Fernholz, E. & Mac Phillamy, H. B. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., Nov. 1939.
18. — Bauer, B. : Deutsche Med. Wchnscr. Mayo 1941.
19. — Binkley, S. B., McKee, R. W., Thayer, S. A. & Doisy, E. A. : J. Biol. Chem., Mayo 1940.—Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. Junio 1940.
20. — Binkley, S. B., MacCorquodale, D. W., Thayer, S. A. & Doisy, E. A. : J. Biol. Chem., Sep. 1939.
21. — Blain, D. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 1928.
22. — Bollman, J. L., But, H. R. & Snell, A. M. : J. A. M. A., Sep. 1940.
23. — Brinkhous, K. M. : Medicine, Sep. 1940.
24. — Brinkhous, K. M., Smith, H. P. & Warner, E. D. : Am. J. Med. Sc. Abril 1937. Julio 1938.—Am. J. Phys. Feb. 1936.—Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., Enero 1938.
25. — Brinkhous, K. M. & Warner, E. D. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. Junio 1940.
26. — Butt, H. R. : Proc. Staff Meet. Mayo Clin., Sep. 1938.
27. — Butt, H. R. & Osterberg, A. E. : J. Nutritio, Junio 1938.

- 28.—Butt, H. R., Snell, A. M. & Osterberg, A. E. : Proc. Staff Meet. Mayo Clin., Feb. 1938, Nov. 1938, Agosto 1939, Enero 1940.—J. A. M. A. Marzo 1939, Julio 1939.
- 29.—Butt, H. R. & Snell, A. M. : Vitamin K., Ed. W. D. Saunders C" Philadelphia & London, 1941.—J. A. M. A. Dic. 1939.
- 30.—Caroli, J., Lavergne, H. et Bose, B. : Paris Medical. Julio 1939.
- 31.—Clark, R. L. Jr., Dixon, C. F., Butt, H. R. & Snell, A. M. : Proc. Staff Meet. Mayo Clin. Junio 1939.
- 32.—Copley, A. L. : Am. J. Physiol., Junio 1939.
- 33.—Culler, S. C., Ziffren, S. E., Gibson, R. B. & Smith, H. P. : J. A. M. A., Sep. 1940.
- 34.—Canessa, I. & Cifuentes, H. : Rev. Med. Alim. Chile. Enero 1942.
- 35.—Capon, N. B. : Lancet. Mayo 1942.
- 36.—Cheney, G. : J. Lab. Clin. Med., Junio 1939.—J. A. M. A., Sep. 1940, Arch. Int. Med., Oct. 1942.—Am. J. Med. Sc. 1940.
- 37.—Dam, Herrik : Biochem. Ztschr. 1929, 1930.—Nature. Abril 1935.—J. Biochem. Junio 1935.
- 38.—Dam, H. & Glavind, J. : Lancet. Marzo 1938, Biochim. J., Marzo 1938, Juuio 1938.—Ztschr. F. Vitaminforsch. 1939.
- 39.—Dam, H. & Schönheyder, F. : Biochem. J., 1934. Mayo 1936.
- 40.—Dam, H., Schönheyder, F. & Lewis, L. : Biochem. J. Enero 1937.
- 41.—Dam, H., Schönheyder, F. & Tage-Hansen, E. : Biochem. J., Junio 1936.
- 42.—Dam, H., Tage-Hansen, E. & Plum, P. : Lancet. Dic. 1939.
- 43.—Dann, F. P. : Am. J. Pshys., Julio 1938.—Proc. Soc. Exper. Biol. Med., Nov. 1939.
- 44.—Doisy, E. A., MacCorquodale, D. W., Thayer, S. A. Binkley, S. B. & McKee, R. W. : Science. Nov. 1939.
- 45.—Eagle, H. : Medicine, Mayo 1937.
- 46.—Elliot, M. C., Isaacs, B. & Ivy, A. C. : Proc. Soc. Exper. Biol & Med., Feb. 1940.
- 47.—Engel, R. : Med. Welt. Enero 1939.
- 48.—Fieser, L. F. : Science Enero 1940.—Ann. Int. Med., Oct. 1941.—J. Am. Chem. Soc., Agosto 1939.
- 49.—Fitzgerald, J. E. & Webster, A. : Am. J. Obst. & Gynec. Sep. 1940.
- 50.—Forsgren, L. : Klin. Welt. N° 28. 1929.
- 51.—Flynn, J. E. & Warner, E. D. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., Enero 1940, Junio 1940.
- 52.—Greaves, J. D. : Am. J. Phisyol., Marzo 1939.
- 53.—Greaves, J. D. & Schmidt, C. L. A. : Pro. Soc. Exper. Biol. & Med. Oct. 1937.
- 54.—Hawkins, W. B. & Brinkhous, K. M. : J. Exper. Med., Junio 1935.
- 55.—Hawkins, W. B. & Whipple, G. B. : J. Exper. Med., Oct. 1935.
- 56.—Holmboe, H. S. & Holmboe, R. W. : J. Lab. & Clin. Med., 1940.
- 57.—Holst, W. F. & Halbrook, E. R. : Science, Abril 1938.
- 58.—Horvath, A. A. : Am. J. Phisyol., Julio 1930.
- 59.—Hepding L. & Moll, Th. : Ann. Merck. 1940.
- 60.—Howell, W. H. : J. Am. Med. Sc., Sep. 1941.
- 61.—Kark, R. & Lozner, E. J., : Lancet, Dic. 1939.

- 62.—Kato, B. & Poncher, H. G. : J. A. M. A., Marzo 1940, Julio 1940.  
 63.—Kelly, O. R. & Bray, W. E. : J. Lab. & Clin. Med., Feb. 1940.  
 64.—Lord, J. W. Jr. & Pastore, J. B. : J. A. M. A., Dic. 1939.  
 65.—MacCorquedale, D. W., Binkley, S. B., Thayer, S. A. MacKee, R. W. & Doisy, E. A. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., Marzo 1939, Mayo 1939.  
 66.—MacFarlane, W. D., Graham, W. R. Jr. & Richardson, F. : Biochem. J. 1931.  
 67.—Mason, H. C. & Smith, M. E. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., Junio 1939.  
 68.—Mertz, E. T., Seegers, W. G., Smitis, H. F. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. Nov. 1939.  
 69.—Molitor, H. & Robinson, H. J. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., Enero 1940.  
 70.—McCay, C. M. : The Vitamins, Symposium. A. M. A. Ed. 1939.  
 71.—Murohy, R. : Science, Marzo 1939.  
 72.—MacPherson, A. I. S. & Henderson, J. L. : Lancet, Mayo 1942.  
 73.—Montes, R. O. : Rev. Med. Chile, Nov. 1941.  
 74.—Norris, R. F. & Rush, A. : Surg. Gynec. & Obst. Junio 1940.  
 75.—Norcross, J. W. & MacFarland, D. M. : J. A. M. A., Dic. 1940.  
 76.—Olson, K. B. & Menzel, H. : Surgery, Agosto 1939.  
 77.—Ortega, R. : Rev. Med. Alim. Chile, Abril 1941.  
 78.—Nñez, J. C. & Sanguinetti, A. A. : Prensa Med. Arg. Dic. 1940.  
 79.—Osterberg, A. E. : Proc. Staff Meet. Mayo Clin. 1939.  
 80.—Palmer, A. I. & Bielys, J. : folia Hemat. 1935.  
 81.—Pray, L. G., McClewn, H. D. & Pollard, W. L. : Am. J. Obst. & Gynec. 1941.  
 82.—Pohle, F. J. & Stewart, J. K. : J. Clin. Invt. Marzo 1940.—Am. J. Med. Sc., Nov. 1939.  
 83.—Quick, A. J. : Am. J. Physiol., Feb. 1937.—J. Biol. Chem. 1938.—J. A. M. A., Mayo 1938.—Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., Dic. 1939.—Am. J. Med. Sc., Enero 1940.—J. A. M. A., Abril 1940.  
 84.—Quick, A. J. Stanley—Brown, M. & Barcroft, F. W. : Am. J. Med. Sc. Oct. 1935.  
 86.—Rabuffetti, L. U. : Facultad, Buenos Aires, Feb. 1941.  
 86.—Reinhold, J., Valentine, E. H. & Ferguson, L. K. : Am. J. Med. Sc. Junio 1940.  
 87.—Rhoads, J. E. : Surgery, Mayo 1939.—Ann. Surg., Mayo 1940.  
 88.—Rhoads, J. E. & Fliegelman, M. T. : J. A. M. A. Feb. 1940.  
 89.—Rhoads, J. E. & Fitz-Hugh, Th. Jr. : Am. J. Med. Sc. Nov. 1941.  
 90.—Richdorf, L. F. & Kearney, W. : Lancet, Mayo 1942.  
 91.—Rhoads, J. E. & Panzer, L. M. : J. A. M. A. Enero 1939.  
 92.—Scanlon, G. H., Brinkhous, K. M., Warner, E. D., Smith, H. P. & Flynn, J. E. : J. A. M. A., Mayo 1939.  
 93.—Scarborough, H. : Lancet, Junio 1940.  
 94.—Savacol, J. W. : Am. J. Med. Sc. Junio 1941.  
 95.—Sanford, H. N., Smigelsky, I. & Chapin, J. : J. A. M. A. 1942.  
 96.—Schönheyder, F. : J. Biochem., 1936. —Am. J. Physiol. Agosto 1941.

- 97.—Seegers, W. H., Brinkhous, K. M., Smith, H. P. & Warner, E. D. : J. Biol. Chem., Mayo 1938, Nov. 1938.—J. Exper. Med. Junio 1938.
- 98.—Seligman, A. M., Hurwitz, A., Frank, H. A. & Davis, W. A. : Surg. Gynec. & Obst., Nov. 1941.
- 99.—Seegers, W. H. : J. Biol. Chem., Oct. 1940.
- 100.—Sharp, E. A. : J. A. M. A., Feb. 1940.
- 101.—Smith, H. P., Ziffren, S. E., Owen, C. A. & Hoffman, G. R. : J. A. M. A. Julio 1939.—Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., Abril 1939.
- 102.—Smith, H. P. & Owen, C. A. : J. Biol. Chem., Julio 1940.
- 103.—Smith, W. K. : Science, Mayo 1938.
- 104.—Snell, A. M. : J. A. M. A., Abril 1939.—Proc. Staff Meet. Mayo Clin. Feb. 1938.
- 105.—Snell, A. M. & Greene, C. H. : Am. J. Physiol., Abril 1940.
- 106.—Stewart, J. D. : Ann. Surgery., Abril 1939, Nov. 1941.
- 107.—Stewart, J. D. & Rourke, G. M. : J. A. M. A., Dic. 1939.
- 108.—Tage-Hansen, E. : J. A. M. A., Nov. 1939.
- 109.—Thayer, S. A., MacCorquodale, D. W., McKee, R. W., Doisy, E. A., Emmett, A. D., Brown, R. A. & Bord, O. D. : Am. J. Chem. Soc. Sep. 1939.
- 110.—Tidrick, R. T., Joyce, F. T. & Smith, H. P. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., Dic. 1939.
- 111.—Tishler, M., Fieser, D. F. & Sampson, W. L. : J. Biol. Chem., Feb. 1939.
- 112.—Urteaga, O., Cuba A. & Aguilar P. : Comunicación a la Academia de Ciencias, Lima, 1942 (En prensa).
- 113.—Vergara, S. : Act. End. Quim. Enero 1940.
- 114.—Waddell, W. W. Jr. & Lawson, G. Mc L. : J. A. M. A., Oct. 1940.
- 115.—Waddell, W. W. Jr. & Guerry, Dupont III. : J. A. M. A., Junio 1939.
- 116.—Waddell, W. W. Jr., Guerry, Dupont III., Bray, W. E. & Kelley, O. R. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. Marzo 1939.
- 117.—Warner, E. D., DeGowin, E. L. & Seegers W. H. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. Feb. 1940.
- 118.—Warren R. & Rhoads, J. E. : Am. J. Med. Sc., Agosto 1939.
- 119.—Weiss, P. & Pons, J. : Act. Med. Peruana, N° 6, 1938.
- 120.—Wintrobe, M. M. : Folia Hemat. 1933. —Am. J. Med. Sc. 1933.—J. Lab. & Clin. Med., 1932.
- 121.—Wintrobe, M. M. : Clinical Hematology, Lea & Febiger, Ed. Philadelphia, 1942.
- 122.—Ziegler, E. R., Osterberg, A. E. & Hovig, M. : J. A. M. A. Abril 1940.