

LA VITAMINA B₁₂

Dr. LUIS JOSÉ BERGNA

DESDE que MINOT y MURPHY descubrieron que la anemia perniciosa puede mantenerse en remisión administrando hígado, fueron múltiples los ensayos realizados con el fin de purificar y aislar el principio activo contenido en el hígado. Una de las dificultades en los procedimientos de purificación residía en la carencia de un método adecuado para comprobar la actividad del principio en forma experimental, ya que resulta escaso el número de pacientes con anemia perniciosa para probar la fracción resultante de cada tentativa de purificación. Este escollo pudo ser salvado con el descubrimiento de M. SHORB (24). Esta investigadora demostró que el *Lactobacillus lactis Doerner* se desarrolla, cultivado en medios básicos especiales, siempre que se agregue al medio de cultivo hígado o extracto hepático, y que requiere, por lo menos, 2 factores de crecimiento, uno de los cuales, el denominado factor *Lactobacillus lactis Doerner* (factor LLD), parece estar vinculado con la actividad antianémica de los extractos hepáticos. Efectivamente, ensayando con diversos extractos hepáticos purificados del comercio, con el fin de determinar la cantidad mínima capaz de estimular el desarrollo de dicho germen, encontró que existe una relación casi lineal entre la cantidad del factor L.L.D. y la potencia antianémica de tales extractos expresada en unidades como se determina habitualmente, mediante la prueba terapéutica, en enfermos de anemia perniciosa.

RICKES, BRINK, KONIUSZY, WOOD y FOLKERS (21) utilizando este procedimiento lograron aislar de los extractos hepáticos una substancia cristalina que es sumamente potente para estimular el desarrollo del *Lactobacillus lactis Doerner*. Dicho compuesto, que cristaliza en forma de pequeñas agujas rojas, ha sido designado provisionalmente con el nombre de vitamina B₁₂.

R. WEST (35) ensayó clínicamente la vitamina B₁₂ en 3 pacientes con anemia perniciosa en recaída y consiguió buenas respuestas hematológicas mediante la inyección intramuscular de dosis únicas de 3, 6 y 150 microgramos respectivamente; obtuvo evidentes crisis reticulocitarias (de 10,2 a 27,0 por ciento al quinto día) seguidas de aumento del número de glóbulos rojos y de la concentración de hemoglobina; pero, como durante el período de observación (de 23, 14 y 15 días, respectivamente), después de la administración de la vitamina, la mejoría del cuadro clínico no fué suficiente, se debió continuar el tratamiento para lograr su normalización.

Casi simultáneamente con los autores estadounidenses, LESTER SMITH (25), en Inglaterra, obtuvo del hígado de vaca 2 pigmentos rojos, que son terapéuticamente activos a dosis muy pequeñas, en casos de anemia perniciosa. Después de comprobar que la intensidad del color y la actividad antianémica guardan estrecha relación, utilizó el método cromatográfico en el proceso de purificación; los materiales así fraccionados fueron valorados clínicamente por el doctor C. C. UNGLEY, quien realizó más de 100 pruebas en pacientes con anemia perniciosa. Del hígado se extraen cantidades muy pequeñas de este pigmento rojo, puesto que de 4 toneladas de hígado sólo se obtuvo 1 gramo de material activo, siendo la dosis mínima eficaz del mismo de 600 microgramos. Posteriormente, partiendo de hígado proteolizado, se consiguió un producto más potente, el cual fué denominado L. E. 445; 300 microgramos de éste fueron

suficientes para obtener respuesta en pacientes con anemia perniciosa en recaída. Estudios electroforéticos demostraron que estos pigmentos eran impuros y por posterior purificación LESTER SMITH preparó un pigmento con 8 veces la intensidad del color del L. E. 445, y aunque no se había probado clínicamente si su actividad era proporcional al color, debe ser efectivo en dosis de 40 microgramos. La substancia de LESTER SMITH tiene un peso molecular de 1500, es soluble en agua, alcohol, acetona y ácido acético glacial e insoluble en éter y cloroformo. Finalmente LESTER SMITH consiguió en estado cristalino el así denominado factor antianemia perniciosa y, como hace notar, los cristales obtenidos se parecen a los de la vitamina B₁₂; según los cálculos hechos de acuerdo con la intensidad del color, tendrían la misma actividad, por lo cual considera que ambos productos son una misma substancia.

RICKES, BRINK, KONIUSZY, WOOD y FOLWERS (22) han demostrado la presencia de cobalto en la molécula de la vitamina B₁₂ y sugieren que ésta es un complejo constituido por 6 grupos alrededor del átomo de cobalto; el color rojo de la vitamina B₁₂ parece estar vinculado, por lo menos parcialmente, con la presencia de ese metal. El ion cobalto es ineficaz para estimular el desarrollo del *Lactobacillus lactis Doerner* y WEST lo probó en casos de anemia perniciosa sin éxito (500 y 150 microgramos de ion cobalto administrado subcutáneamente como acetato y cloruro, respectivamente). La vitamina B₁₂ contiene también fósforo y nitrógeno, pero no pudo demostrarse la existencia de azufre. L. SMITH (26) ha hallado también cobalto en las cenizas del factor antianemia perniciosa, estimando que constituye el 4 por ciento de los cristales desecados al vacío, y sostiene que la molécula contiene tres átomos de fósforo. La presencia de cobalto no ha sido demostrada hasta ahora en compuestos de origen animal, aunque se reconoce que es un elemento esencial en pequeñísimas cantidades; por otra parte, se sabe que el cobalto es capaz de prevenir o curar un síndrome, en el que participa la anemia, que se presenta en los rumiantes cuando se alimentan con pastos pobres en cobalto.

UNGLEY (34) ha encontrado que en la anemia perniciosa una sola dosis de 10 microgramos de la substancia cristalina roja de LESTER SMITH induce una respuesta reticulocitaria máxima y un rápido aumento de los eritrocitos. Posteriormente, la actividad terapéutica de la vitamina B₁₂ ha sido confirmada por otros autores. Su eficacia no se limita a la anemia perniciosa, sino también a los enfermos de anemia macrocítica nutritiva, esprúe no tropical (28), esprúe tropical (27 y 30) y anemia megaloblástica infantil.

La vitamina B₁₂ empleada en dosis única de menos de 5 microgramos, generalmente produce una respuesta clínica y hematológica pobre o falla totalmente. Con dosis únicas que varían entre 6 y 25 microgramos se obtienen respuestas hematológicas que incluyen: marcada crisis reticulocitaria, con su máximo entre el cuarto y noveno día (más frecuentemente en el cuarto-quinto día), seguida por una significativa elevación de la concentración de hemoglobina y del número de glóbulos rojos, como así también de las plaquetas, los glóbulos blancos, disminución del hierro sérico (5) y de la excreción de estercobilina (14b). Funciones esternas seriadas han revelado la completa transformación de la médula megaloblástica en normoblástica dentro de las 48-96 horas (11). Pero en todos los casos la respuesta fué subóptima. El ácido pteroil-glutámico y la timina, otras dos substancias químicamente puras, dan resultados similares; mas el primero es unas 600 veces más activo que la timina y a su vez la vitamina B₁₂ es varios miles de veces más potente que el ácido fólico (29).

Los enfermos experimentan notable mejoría clínica entre el tercero y quin-

to día de la inyección de vitamina B₁₂ con sensación de bienestar, recuperación del apetito, de las fuerzas y de la viveza mental, y rápido alivio del ardor y del dolor en la boca y lengua, ocurriendo esto último mucho antes que la regeneración de las papilas linguales sea completa (lo que sucede entre cuatro y seis semanas [13]). Es digno de hacer notar que las lesiones graves de las mucosas (las cuales habitualmente coinciden con la presencia de aclorhidria y síntomas de degeneración subaguda de la medula espinal), se benefician con la vitamina B₁₂ del mismo modo que con el extracto de hígado, pero no son aliviadas mayormente por el ácido fólico ni por la timina (32).

En cuanto a los síntomas debidos a la hipoxemia, ceden algo más lentamente, desde que la anemia rara vez es corregida en menos de cuatro-seis semanas.

PATEL (18) ha empleado con éxito el factor cristalino de L. SMITH; en dos casos de anemia macrocítica nutritiva tropical a los que administró una dosis única de 80 microgramos por vía intramuscular, observó notable mejoría del estado general con aumento del apetito y del peso, juntamente con una pronunciada crisis reticulocitaria (36,8 y 11,5 por ciento en el quinto y sexto día respectivamente) y aumento de la hemoglobina, de los glóbulos rojos y de los blancos y desaparición de la pandistrofia medular.

Por la experiencia acumulada hasta ahora, aunque escasa, puede inferirse que la vitamina B₁₂ es también eficaz en el tratamiento de los trastornos neurológicos, hecho de gran interés teórico y práctico; como es bien sabido, la falta de paralelismo entre la gravedad de la anemia y los trastornos neurológicos en ciertos casos de anemia perniciosa, y la relativa resistencia de estos últimos al tratamiento, condujo a suponer que ambos eran el resultado de diferentes deficiencias; la opinión de que estas sustancias son distintas, o al menos que el mecanismo para mantener la integridad de los dos tejidos es diferente, está apoyada por recientes experiencias con el ácido fólico; aunque éste generalmente induce una excelente remisión hematológica y mantiene la sangre en niveles esencialmente normales (al menos durante varios meses), ha fallado para controlar los signos neurológicos.

Tempranamente, SPIES, STONE y ARAMBURU (28) relataron que en un paciente con anemia perniciosa con alteraciones nerviosas de cuatro semanas de duración, consiguieron, con una dosis única parenteral de 15 microgramos de vitamina B₁₂, aliviar el dolor, las parestesias y la rigidez, con aumento de la capacidad para caminar. Por su parte, UNGLEY (33) comprobó la eficacia del factor de L. SMITH en tres casos de anemia perniciosa que presentaban síntomas de degeneración combinada subaguda de la medula espinal; mediante el tratamiento instituido durante períodos de 21, 12 y 10 semanas respectivamente, consiguió progresiva disminución de los síntomas y signos neurológicos, siendo comparable el grado de mejoría al que se logra con los mejores extractos de hígado.

BERK, DENNY BROWN, FINLAND y CASTLE (4) también refieren marcada mejoría subjetiva y objetiva en los trastornos neurológicos de un paciente con grave recaída por inadecuado tratamiento con ácido fólico, el cual debió usarse por las graves reacciones alérgicas locales y generales que provocaba el extracto de hígado. Después de 8 dosis de 5 microgramos diarios de vitamina B₁₂ se obtuvo rápida y marcada mejoría. Es interesante que no se presentó reacción alérgica alguna a pesar de que el paciente aun reaccionaba fuertemente a los extractos hepáticos, por lo que se deduce que la vitamina B₁₂ no es la responsable de las reacciones de hipersensibilidad de los preparados de hígado.

HALL y CAMPBELL (13) en 11 enfermos seguidos durante uno a tres meses, y SPIES, SUÁREZ, GARCÍA, LÓPEZ, MILANES, STONE, LÓPEZ TOCA, ARAMBURU y KARTUS (31) en 19 pacientes, todos enfermos de anemia perniciosa con síntomas

de neuritis periférica y o degeneración combinada subaguda de la medula espinal, prestaron especial atención a la acción de la vitamina B_{12} sobre los síntomas nerviosos y comprobaron una remarcable mejoría en todos los casos. Sin embargo, es menester destacar que una prolongada observación durante un periodo de varios meses es necesaria para que sea posible determinar si la vitamina B_{12} protege definitivamente al sistema nervioso central y periférico en la anemia perniciosa.

Hasta el momento, pocos casos han sido seguidos suficientemente como para dar una idea de la dosis de mantenimiento de la vitamina B_{12} . HALL y CAMPBELL (12) sostienen que un microgramo de vitamina corresponde a una unidad U. S. P. de extracto de hígado o de mucosa gástrica; en 2 pacientes la administración de 1 microgramo diario de vitamina B_{12} indujo una respuesta hematológica máxima, ya que la inyección posterior de una dosis alta de vitamina B_{12} no produjo una nueva respuesta reticulocitaria.

JONES, DARBY y TOTTER (14 b) sugieren que deben suministrarse 3 microgramos diarios de vitamina B_{12} durante las primeras seis semanas y luego continuar con 1 microgramo de vitamina por día.

SPIES y colaboradores (31) hacen notar que la dosificación de la vitamina B_{12} varía mucho de enfermo a enfermo desde el momento que observaron ligera respuesta a la inyección de apenas 4 microgramos de vitamina B_{12} y completo fracaso con una dosis de 10 microgramos. La mayoría de los pacientes seguramente han de responder en forma máxima con dosis de 100 microgramos o quizá algo menos (30 y 31); esto corresponde, aproximadamente, a la cantidad de hígado comúnmente administrado, durante las primeras semanas de intenso tratamiento, a los pacientes gravemente enfermos de anemia perniciosa. El promedio de los enfermos parece responder en forma subóptima a dosis única de 8-10 microgramos. Por su parte, HALL y CAMPBELL (11) obtienen excelentes remisiones hematológicas con 25 microgramos de vitamina B_{12} por semana administrados por vía intramuscular, mientras que si se aplica con intervalo mayor de una semana no siempre se consigue una elevación máxima del número de glóbulos rojos. Como ocurre con el extracto de hígado, el tratamiento debe continuarse indefinidamente, pues de lo contrario sobreviene una nueva recaída de la enfermedad.

La vitamina B_{12} no tiene ningún efecto sobre las anemias secundarias, las anemias aplásticas, las leucemias, las púrpuras idiopáticas, las leucopenias de las infecciones o las debidas a idiosincrasia a ciertas drogas, etcétera (31). Por lo que se conoce hasta la fecha, la vitamina B_{12} sólo actúa sobre las anemias que se caracterizan por la transformación megaloblástica de la medula ósea (16). Sin embargo, esto no significa que necesariamente sea efectiva en todas las anemias megaloblásticas. UNGLEY (34), refiere que una paciente con anemia megaloblástica del embarazo no respondió a 65 microgramos del factor antianemia pernicioso de L. SMITH; igualmente BETHELL, MEYERS y NELIGH (5) trataron un caso de anemia macrocítica del embarazo con 1 microgramo diario de vitamina B_{12} durante diez días, por vía parenteral, sin obtener resultado favorable. DAY, HALL y PEASE (7), también fracasaron al tratar una paciente con anemia macrocítica del embarazo con 27,5 microgramos de vitamina B_{12} intramuscular, inyectados en un lapso de ocho días; en esta enferma cada inyección de vitamina B_{12} fué seguida por la aparición de náuseas y vómitos; tampoco fué beneficiada mediante la hepatoterapia. Por el contrario, estas 3 enfermas mejoraron rápidamente con la administración de ácidos pteroilglutámico.

BERK, CASTLE, WELCH, HEINLE, ANKER y EPSTEIN (3) han hecho la interesante observación de que la vitamina B_{12} es ineficaz si se administra por vía oral en la dosis que resulta eficaz por vía parenteral. A 4 enfermos con anemia

perniciosa se les hizo ingerir 5 microgramos diarios, durante diez días, de vitamina B₁₂ sin lograr respuesta hematológica. Pero ésta se obtuvo cuando se agregó a la vitamina B₁₂ dada «per os» (5 microgramos diarios durante 10 días) 150 ml diarios de jugo gástrico normal. Análogas comprobaciones han realizado HALL, MORGAN y CAMPBELL (14); pero estos autores son más cautelosos y sugieren que no debe afirmarse que la vitamina B₁₂ administrada por boca no tiene acción hematológica en la anemia perniciosa hasta que dosis mucho más altas que las empleadas sean utilizadas en las mismas condiciones. Recientemente WEST (36) logró con grandes dosis de vitamina B₁₂ (600 microgramos) por vía oral respuesta reticulocitaria máxima. SPIES y colaboradores (31) dieron 50 microgramos de vitamina B₁₂ por boca a un sujeto que padecía de anemia perniciosa y espúe a la vez, observándole por espacio de diez días sin que pudiera comprobarse ninguna modificación hematológica, clínica ni neurológica. Pero esta triple respuesta se consiguió cuando se administraron «per os» 25 microgramos de vitamina B₁₂ que habían sido incubados con 75 ml de jugo gástrico normal. Estas observaciones demuestran que la actividad hematopoyética de la vitamina B₁₂ en la anemia perniciosa cuando se administra por vía oral es potencializada por la administración simultánea de jugo gástrico normal y que, al igual de lo que ocurre con los extractos de hígado, la actividad de la vitamina B₁₂ no es tan grande por vía bucal como cuando se da parenteralmente. Es posible que la función del factor intrínseco del jugo gástrico normal sea facilitar la absorción de la vitamina B₁₂ (o compuestos químicamente parecidos que se hallen en los alimentos) por el intestino, más bien que reaccionar con el factor extrínseco como hasta ahora se ha supuesto. Aboga también en favor de la defectuosa absorción de la vitamina B₁₂ en la anemia perniciosa el hecho comprobado por BETHELL, MEYERS y NELIGH (5) y confirmado por BERK, CASTLE, WELCH, HEINLE, ANKER y EPSTEIN (3), de que los pacientes con anemia perniciosa en recaída eliminan con sus materias fecales alrededor de 1 microgramo de vitamina B₁₂ por gramo de heces desecadas (según se comprueba mediante las pruebas con microorganismos), la cual es una cantidad varias veces mayor que la necesaria para producir remisión cuando se introduce por vía parenteral.

La vitamina B₁₂ está presente en pequeñísimas cantidades en el hígado, ya que una tonelada de éste, en estado fresco, proporciona 250 miligramos aproximadamente. Por tal motivo se ha procurado dilucidar su estructura química con el fin de conseguir su obtención sintética. Si bien por el momento estos trabajos no han tenido éxito, en cambio RICKES, BRINK, KONIUSFY, WOOD y FOLKERS (23) han logrado aislar de una cepa de *Streptomyces griseus*, un compuesto rojo, el cual es idéntico a la vitamina B₁₂ desde el punto de vista de su acción sobre el crecimiento del *Lactobacillus lactis Doerner*, sobre enfermos con anemia perniciosa y por sus características físicoquímicas.

ERF y WIMER (9 b) quienes trataron a 5 pacientes con la vitamina B₁₂ extraída del *Streptomyces griseus*, sostienen que ésta produce iguales resultados clínicos que la vitamina B₁₂ preparada a partir de hígado cuando se utilizan dosis similares. Dichos autores utilizaron también la vitamina B₁₂, extraída de *Streptomyces griseus*, por vía sublingual en 3 casos (en dosis de 200, 150 y 50 microgramos, respectivamente) obteniendo ligera reticulocitosis en 2 casos y definida mejoría clínica en los 3 pacientes.

Bibliografía

- (1) «Annotations. Anti-anemic substances from liver». *Lancet*, 254: 876, june 5, 1948.
- (2) ALVAREZ W. C.: «The antipernicious anemia factor in liver or vitamin B₁₂ has been crystallized.» (Comment). *Gastroenterology*, 11: 761-2, nov. 1948.

- (3) BERK L., CASTLE W. B., WELCH A. D., HEINLE R. W., ANKER R. and EPSTEIN M.: «Observations on the etiologic relationship of achylia gastrica to pernicious anemia. X Activity of vitamin B₁₂ as food (extrinsic) factor». *New England J. Med.*, 239: 911-3, dec. 9, 1948.
- (4) BERK L., DENNY-BROWN D., FINLAND M. and CASTLE W. B.: «Effectiveness of vitamin B₁₂ in combined system disease. Rapid regression of neurologic manifestations and absence of allergic reactions in a patient sensitive to injectable liver extracts». *New England J. Med.*, 239: 328-30, aug. 26, 1948.
- (5) BETHELT F. H., MEYERS M. C. and NELIGH R. B.: «Vitamin B₁₂ in pernicious anemia and puerperal macrocytic anemia». *Proc. Central Soc. Clin. Res.*, 21: 27-8, oct. 29-30, 1948; *J. Lab. and Clin. Med.*, 33: 1477-8, nov. 1948.
- (5b) BICKEL G., DELLA SANTA R. et ODIER J.: «Anémie progressive pernicieuse traitée par la vitamine B₁₂». *Soc. Med. des Hôpitaux de Paris*, 65: 498-503, mars 25-avril 1, 1949.
- (6) DAMESHEK W.: «And now B₁₂!» (Editorial). *Blood*, 4: 76-8, jan. 1949.
- (7) DAY L. A., HALL B. E. and PEASE G. L.: «Macrocytic anemia of pregnancy refractory to vitamin B₁₂ therapy; response to treatment with folic acid: report of case». *Proc. Staff. Meet. Mayo Clin.*, 24: 149-57, march 30, 1949.
- (8) Editorial: «Antianemic properties of vitamin B₁₂». *J.A.M.A.*, 138: 595, oct. 23, 1948.
- (9) Editorial: «Further refinement of liver extracts effective in pernicious anemia». *Ann. Int. Med.*, 29: 1169-72, dec. 1948.
- (9b) ERF L. A. and WIMER B.: «Comparison of vitamin B₁₂ from liver and from Stréptomycus Griseus in the treatment of pernicious anemia». *Blood*, 4: 845-62, july, 1949.
- (10) Glanzmann S.: «Nuevos avances en terapéutica antianémica: vitamina B₁₂». *Medicina Clínica*, 11: 279, 1948.
- (10b) GRIPPA A.: «Aggiomamenti: La Vitamina B₁₂». *Il Progresso Terapeutico*, 1: 87-90, marzo-aprile, 1949.
11. HALL B. E. and CAMPBELL D. C.: «Effect of vitamin B₁₂ on the hematopoietic and nervous systems in addisonian pernicious anemia». *Proc. Central Soc. Clin. Res.*, 21: 93, oct. 29-30, 1948; *J. Lab. and Clin. Med.*, 33: 1646, dec. 1948.
- (12) HALL B. E. and CAMPBELL D. C.: «Vitamin B₁₂ therapy in pernicious anemia. I Effect on hemopoietic system. Preliminary report». *Proc. Staff. Meet. Mayo Clin.*, 23: 584-90, dec. 8, 1948.
- (13) HALL B. E. and CAMPBELL D. C.: «Vitamin B₁₂ therapy in pernicious anemia. II Effect on the general clinical and neurological manifestations. Preliminary report». *Proc. Staff. Meet. Mayo Clin.*, 23: 591-5, dec. 8, 1948.
- (14) HALL B. E., MORGAN E. H. and CAMPBELL D. C.: «Oral administration of vitamin B₁₂ in pernicious anemia. I Presence of intrinsic factor in Berkefeld-filtered pooled human gastric juice: preliminary report. *Proc. Staff. Meet. Mayo Clin.*, 24: 99-107, feb. 16, 1949.
- (14b) JONES E., DARBY W. J. and TOTTER J. R.: «Pernicious anemia and related anemias treated with vitamin B₁₂. *Blood*, 4: 827-44, july, 1949.
- (15) LEADING, article: «Antianemic substances from liver». *Lancet*, 254: 716-7, may 8, 1948.
- (16) LEADING, article: «Vitamin B₁₂». *Lancet*, 1: 151-2, jan. 22, 1949.
- (16b) MC PHERSON A. Z., JONSSON U. and RUNDLES R. W.: «Vitamin B₁₂ therapy in megaloblastic anemia of infancy». *J. Pediat.*, 34: 529-35, may, 1949.
- (17) «Medicina de Actualidad. Nuevo tratamiento de la anemia perniciosa». *El Día Médico*, 20: 1320-23, julio 5, 1948.
- (18) Patel J. C.: «Crystalline antipernicious anaemia factor in treatment of two cases of tropical macrocytic anaemia». *Brit. Med. J.*, 2: 934-5, nov. 25, 1948.
- (19) «Products and Processes. Crystalline vitamin B₁₂». *Chem. Engng. News*, 26: 1304, may 3, 1948.
- (20) RAVINA A.: «Un progres décisif de thérapeutique anti-anémique: la vitamin B₁₂». *Presse Méd.*, 57: 89-90, janvier 22, 1949.
- (21) RICOES E. L., BRINK N. G., KONIUSZY F. R., WOOD T. R. and FOLKERS K.: «Crystalline vitamin B₁₂». *Science*, 107: 396-7, april 16, 1948.
- (22) RICKES E. L., BRINK N. G., KONIUSZY F. R., WOOD T. R. and FOLKERS K.: «Vitamin B₁₂, a cobalt complex». *Science*, 108: 134, august 6, 1948.

- (23) RICKES E. L., BRINK N. G., KONIUSZY F. R., WOOD T. R. and FOLKERS K.: «Comparative data on vitamin B₁₂ from liver and from a new source. *Streptomyces griseus*». *Science*, 108: 634-5, dec. 3, 1948.
- (24) SHORR M. S.: «Activity of vitamin B₁₂ for the growth of *Lactobacillus lactis*». *Science*, 107: 397-8, april 16, 1948.
- (25) SMITH, E. L.: «Purifications of antipernicious anaemia factors from liver». *Nature*, 161: 638-9, april 24, 1948.
- (26) SMITH, E. L.: «Presence of cobalt in the antipernicious anaemia factor». *Nature*, 162: 144-5, july 24, 1948.
- (27) SPIES T. D., LÓPEZ G. G., MILANES F., LÓPEZ TOCA R. and CULVER B.: «Observations on the hepopoietic response of persons with tropical sprue to vitamin B₁₂». *South. M. J.*, 41: 523-5, june 1948.
- (28) SPIES T. D., STONE R. E. and ARAMBURU T.: «Observations on the antianemic properties of vitamin B₁₂». *South. M. J.*, 41: 522-3, june 1948.
- (29) SPIES T. D., STONE R. E., LÓPEZ G. G., MILANES F., LÓPEZ TOCA, R. and ARAMBURU T.: «Thymine, folic acid and vitamin B₁₂ in nutritional macrocytic anaemia, tropical sprue and pernicious anemia». *Lancet*, 255: 519-22, oct. 2, 1948.
- (30) SPIES T. D. and SUÁREZ R. M.: «Response of tropical sprue to vitamin B₁₂». *Blood*, 3: 1213-20, nov. 1948.
- (31) SPIES T. D., SUÁREZ R. M., GARCÍA LÓPEZ G., MILANES F., STONE R. E., LÓPEZ TOCA R., ARAMBURU T. and KARTUS S.: «Tentative appraisal of vitamin B₁₂ on the mucous membrane lesions of macrocytic anemia». *J. Lab. and Clin. Med.*, 33: 1019-23, aug. 1948.
- (32) UNGLEY C. C.: «Anti-anaemic substances from liver». *Lancet*, 1: 771-2, may 15, 1948.
- (33) UNGLEY C. C.: «Macrocytic anaemias». *Brit. Med. J.*, 2: 154, july, 17, 1948.
- (34) WEST R.: «Activity of vitamin B₁₂ in addisonian pernicious anemia». *Science*, 107: 398, april 6, 1948.
- (35) WEST R. and REISNER E. H. Jr.: «Treatment of pernicious anemia with crystalline vitamin B₁₂». *Am. J. Med.*, 6: 643, 1949.