

Reproducción, Lactancia, Crecimiento y Niveles de Glutación en Ratones con una dosis baja de Vitamina B₁₂

W. G. JAFFÉ

Instituto Nacional de Nutrición

Entre las manifestaciones de deficiencia de vitamina B₁₂ en ratones se han observado las siguientes: mortalidad alta de las crías, crecimiento lento (1), peso de destete de las crías bajo (2), relación entre peso del animal y peso del riñón baja (3); además se han descrito últimamente experiencias que demuestran una relación entre los valores de glutación de los hematíes y del hígado y la vitamina B₁₂ en ratas (4). Este fenómeno no se había estudiado todavía en ratones.

Los estudios sobre el metabolismo vitamínico basados en resultados de reproducción y crecimiento siempre son laboriosos y lentos. La capacidad del organismo de almacenar considerables reservas de vitamina B₁₂ que se desgastan lentamente y que hacen necesario un prolongado período de depleción u otras medidas especiales para lograr el estado de deficiencia (dietas muy altas en proteínas o que contienen sustancias tiro-activas), implica dificultades especiales en el estudio de este factor. Por esta razón, todavía no se ha investigado a fondo el requerimiento mínimo de los animales de laboratorio, ratones y ratas en dicha vitamina bajo condiciones normales.

En el presente trabajo se presentan datos sobre la reproducción, el crecimiento, cambio de peso de las madres durante la lactancia y otros factores relacionados con la reproducción animal en relación al aporte de vitamina B₁₂ en la dieta, y se incluyen observaciones acerca de la tasa de glutación san-

guinea y hepática. Los estudios histológicos de algunos órganos de los animales experimentales se comunicarán más tarde. Fue nuestro propósito comparar los distintos criterios sintomáticos de la deficiencia de la vitamina B₁₂ y determinar su supresión con dosis mínimas de la vitamina. Simultáneamente se han efectuado experimentos similares con ratas, los cuales se publicarán oportunamente.

MATERIAL Y METODOS

Los trabajos se efectuaron con ratones blancos, criados y mantenidos por varias generaciones con una dieta de: 46% de harina de soya y 46% de maíz, 5% de aceite vegetal y 2% de sales minerales USP y reforzada con las vitaminas A, D, E y todo el complejo B, con excepción de la vitamina B₁₂. La composición exacta se ha descrito anteriormente (2). Esta dieta basal es muy baja en vitamina B₁₂ según el análisis con *L. leishmanii* (<0.1 mcg./100 gr.). Como dieta control se usó un alimento comercial para ratas con un 24% de proteínas crudas y que contiene harina de pescado y leche en polvo descremada y su contenido en vitamina B₁₂ es de 30 mcg./kg., aproximadamente. Alimento y agua se dieron siempre "ad libitum". Los animales se tenían en jaulas comunes con fondos de tela metálica. Las hembras preñadas se colocaron en jaulas individuales. Las crías se redujeron a 6 animales y se destetaron a la edad de 28 días.

Para las determinaciones del glutatión reducido soluble se usó el método de Grunert y Philips (5) con algunas modificaciones (8). Los animales se sacrificaron mediante un golpe y se obtuvieron inmediatamente muestras de sangre torácica heparinizada y de hígado. Los primeros (0.2 - 0.5 ml.) se pipetearon en una probeta, se hemolizaron con la cantidad de agua destilada para llevar a un volumen de 1.55 cc. y un poco de saponina y se desproteinizaron con 3.35 cc. de solución de ácido metafosfórico al 3% en NaCl saturada para conseguir una solución final 2/3 saturada con NaCl. Se centrifugaron, filtraron y se usó una alícuota 2 cc. para la reacción colorimétrica.

De las muestras de hígado se pesaron duplicados de aproximadamente 0.1 gr. al décimo de mg. en una balanza automática y se homogeneizaron inmediatamente con un homo-

genizador de Elvehjem-Potter después de agregar 4.9 ml. de solución de ácido metafosfórico al 2% en solución de NaCl 2/3 saturada. Se filtraron y se usaron alícuotas de 2 ml. para la reacción colorimétrica. Mediante ensayos de control se comprobó que dentro de una hora no hay cambios importantes ($\pm 3\%$) en los resultados, también si se omite el enfriamiento de las muestras de sangre e hígado recomendado por los autores del método original; todos los análisis se hicieron dentro de este lapso de tiempo. También se comprobó que el uso del ácido metafosfórico o del ácido sulfosalicílico para la deproteinización da resultados idénticos (8).

Simultáneamente con las determinaciones de glutación sanguíneo se efectuaron determinaciones de hematocrito según Van Allen.

RESULTADOS

A.—*Ensayos de reproducción y lactancia.*

En la tabla 1 se han resumido los resultados de las 5 series experimentales. Los animales de las series 1, 2 y 5 se tenían en la misma dieta, por lo menos una generación antes de la iniciación del experimento; las de la serie 4 eran hembras criadas con la dieta basal y suplementada con 3 mcg./kg. de vitamina B₁₂ y que se alimentaron con la dieta básica, deficiente en dicha vitamina, desde 2-5 días antes de dar a luz; las de la serie 3 eran hembras criadas con la dieta basal y puestas a la suplementada con vitamina B₁₂ y metionina un mes antes de casarlas.

Se observa que el número de animales por cría era más alto en la serie de control que en las 4 series experimentales; el número de animales destetados por crías nacidas fué más bajo en la serie deficiente en B₁₂ e igual en las 3 restantes e igualmente en esta serie los pesos de las crías a la edad de 28 días fueron bastante más bajos, mientras que no había diferencias en estas dos características entre la serie de control y la No. 2 y 3 alimentada con la dieta basal y suplementada con vitamina B₁₂.

No había diferencias significativas en el peso de las crías al nacer y el cambio de peso de las madres durante la lactancia. La edad de las madres al nacer la primera cría era menor en las series control y las que recibió el suplemento de

TABLA I
RATONES

No. de serie	Dieta	No. de crías	Número de animales nacidos/cría	Crias muertas	Número de animales destetados/cría	Peso medio a la edad del destete de 28 días	Animales/cría muertos después del 1er. día de nacidos	Peso medio al nacer	Cambio de peso de las madres	Edad de las madres al nacer la primera cría	Peso de las madres al nacer la primera cría
1	I Basal	32	7.1 ± 0.25	3	4.3 ± 0.32	12.6 ± 0.47	1.0	1.5 ± 0.035	-0.5 ± 0.4	117 ± 3.6	28.3 ± 0.42
2	Basal + 3 mg./kg. Vit. B ₁₂	37	7.4 ± 0.34	0	5.2 ± 0.20	17.0 ± 0.22	0.3	1.4 ± 0.029	-0.7 ± 0.35	79 ± 2.8	28.6 ± 0.38
3	Basal + 0.2% metionina y 30 mcg./kg. Vit. B ₁₂	9	7.2 ± 0.38	1	4.7 ± 0.39	15.8 ± 0.70	0.6	1.4 ± 0.042	-0.2	—	—
4	Basal. Suplemento de 3 mcg./kg. de Vit. B ₁₂ durante lactancia	18	7.4 ± 0.73	0	5.1 ± 0.20	15.3 ± 0.38	0.5	1.4 ± 0.043	-0.2 ± 0.37	—	—
5	Control	50	8.3 ± 0.26	2	5.2 ± 0.19	16.9 ± 0.32	0.7	1.4 ± 0.035	-1.3 ± 0.53	79 ± 3.8	27.9 ± 0.77

Comparación de datos de la reproducción y lactancia de ratones alimentados con una dieta vegetariana baja en vitamina B₁₂ con o sin suplementación. — Las crías se redujeron a 6 animales y se destetaron a la edad de 28 días. Se indican los errores standard.

vitamina B₁₂ comparado con la que recibió la dieta deficiente en dicha vitamina, aunque los pesos de todas estas hembras fueron iguales.

Es evidente que, para la lactancia, la dosis de 3 mcg./kg. de vitamina B₁₂ fué adecuada, puesto que el peso de destete y el número de animales destetados/cría eran iguales en las series que recibieron la dieta basal suplementada con esta cantidad ó 10 veces más y los controles, mientras que en los grupos deficientes eran significativamente más bajos.

Cabe señalar que en experimentos con ratas la dosis de 3 mcg./kg. no bastaba para lograr una lactancia normal (7).

B.—Crecimiento después del destete.

Cuando la prole tenía 28 días de edad, se eliminaron las madres y se seguía pesando la cría semanalmente. No se pesaron machos y hembras por separado, razón por la cual en la tabla 2 se señalan los valores promedio. Se utilizaron únicamente 10 crías de cada serie para este experimento.

Se puede observar en la tabla 2 que el crecimiento después del destete fué mayor en las series suplementadas y de control en la última semana de lactancia (4ª semana) y la 5ª; a esta edad estos animales llegaron a un peso de cerca de 20 gramos y el ritmo de su crecimiento decreció, mientras que la serie deficiente seguía creciendo con la misma velocidad de la semana anterior. Finalmente, la diferencia de peso de las series deficientes y suplementados aparentemente se eliminó por completo en los animales adultos, como se puede notar de los valores promedio de peso de las hembras después de dar a luz por primera vez (tabla 1).

C.—Valores de glutatión en hígado y eritrocitos.

En la tabla 3 se presentan los resultados de las determinaciones de glutatión soluble reducido en hígado y sangre de los animales alimentados con 3 dietas distintas. Se usaron únicamente animales machos adultos de 2-3 meses de edad para este experimento. Se notará que en ningún caso había una diferencia significativa.

TABLA 2

**CRECIMIENTO SEMANAL PROMEDIO DE RATONES
EN GRAMOS**

Serie No.	Dieta	4ª semana	5ª semana	6ª semana	7ª semana
1	Basal	3.2	2.7	2.3	2.4
2	Basal + 3 mcg/kg. B ₁₂	5.7	4.0	1.3	1.5
3	Control	5.7	3.4	1.4	1.2

TABLA 3

GLUTATION EN HIGADO Y ERITROCITOS DE RATONES

Dieta	Suplemento	Hígado	Eritrocitos
Basal	—	254 ± 4.0 e. s.	82 ± 3.9 e. s.
fd.	3 mcg./kg. Vit. B ₁₂	239 ± 8.5	83 ± 1.8
fd.	5 mcg. de Vit. B ₁₂ inj. 5 veces	268 ± 11.3	83 ± 4.2
Control	—	269 ± 15.1	84 ± 3.6

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Entre los criterios que se han tomado en cuenta en el presente trabajo para comparar las series de ratones deficientes en vitamina B₁₂ con las que recibieron un suplemento en dicha vitamina, los siguientes arrojaron diferencias significantes: número de animales destetados por cría nacida, peso de destete de las crías y edad de las hembras, criadas en jaulas comunes, al dar a luz por primera vez. El primer punto, a saber, el número reducido de animales sobrevivientes al final del período de lactancia en las crías deficientes, era debido, en gran parte, a la mayor incidencia de morti-natalidad o mortalidad durante las primeras 24 horas de vida de las crías, mientras

que la mortalidad después del primer día de nacidas era ligeramente aumentada en esta serie. El peso de destete de la serie deficiente fué aproximadamente 25% inferior a él de los demás grupos experimentales. El número de las crías que se murieron totalmente fué muy bajo en todas las series, aunque mayor en la serie de la dieta basal. En las ratas es mucho más frecuente que se muera la cría entera bajo condiciones experimentales similares.

No se pudo notar ninguna diferencia entre las diferentes series experimentales en el cambio de peso de las madres durante el período de lactancia, ni tampoco en el peso de las crías al nacer. Es evidente que la importancia de la vitamina B₁₂ en los ratones se manifiesta principalmente en la lactancia, siendo el efecto sobre el peso del destete el más destacado. El crecimiento después del destete, es decir, después de las 4 semanas, fué más rápido en los animales deficientes y finalmente alcanzaron el mismo peso de los controles.

Esto se observa del hecho de que el peso de las hembras después del nacimiento de la primera cría fué prácticamente igual en todas las series, lo que significa que los ratones deficientes en vitamina B₁₂ recuperaron posteriormente la deficiencia de peso observable a la edad del destete. La pequeña diferencia en la edad de estos animales y los controles no puede explicar completamente este hecho; como se ve de los datos de la tabla 2, el período de crecimiento rápido es más largo en las series deficientes que en los controles.

Las hembras de la dieta deficiente eran más viejas al dar a luz por primera vez que las de las dietas suplementadas con vitamina B₁₂ o de control. Esta observación está de acuerdo con resultados obtenidos en ratas donde se observó un retardo en la maduración sexual debido a una deficiencia en dicha vitamina (15).

El número de animales nacidos en cada cría fué prácticamente igual en todas las series experimentales, inclusive la que recibió el suplemento de 30 mcg./kg. de vitamina B₁₂, que corresponde a la cantidad de dicha vitamina contenida en la dieta control; sin embargo, las ratonas alimentadas con esta última ración dieron a luz crías más numerosas. Esta observación puede indicar que las dietas a base de soya y maíz y suplementadas con vitamina B₁₂, aunque adecuadas para todas las demás funciones reproductivas estudiadas, no lo son para

lograr un óptimo en el tamaño de las crías. Nuestros resultados obtenidos con ratas permiten una conclusión similar (7); igualmente, Cary y col. han hecho observaciones idénticas con ratas (6). Hemos iniciado experimentos para estudiar este punto más a fondo.

También fué inesperado el resultado de que no había diferencia en el nivel de glutathion sanguíneo y hepático de los ratones de las distintas series experimentales. Ling y Chow, como también Register (3), han demostrado últimamente que la deficiencia de vitamina B₁₂ produce un descenso del glutathion en tejidos de ratas. Nosotros observamos una baja muy marcada del glutathion en hígado de ratones alimentados con dietas deficientes en metionina o también en vitamina B₁₂ después de 24 horas en ayunas (8). Tanto más sorprende la falta de una influencia demostrable de la vitamina B₁₂ sobre la tasa del glutathion sanguíneo y hepático en los ratones, bajo las técnicas experimentales usadas en el presente trabajo.

Los suplementos de vitamina B₁₂ estudiados de 3 mcg./kg. y de 30 mcg./kg. junto con 0.2% de metionina eran igualmente activos en su efecto de eliminar los signos de deficiencia observados en la serie experimental deficiente en dicha vitamina. Se puede concluir que, para nuestra cepa de ratones, por lo menos, un suplemento de solamente 3 mcg./kg. en vitamina B₁₂ en una dieta de soya y maíz de 24% de proteínas es adecuado para la reproducción y la lactancia como dosis de mantenimiento. Además, se notó un efecto significativo sobre el peso de destete de crías de madres que habían recibido el suplemento de 3 mcg./kg. antes de dar a luz, pero no lo recibieron durante la lactancia (serie 4, tabla 1); esto significa que existía un "carry over", es decir, un efecto prolongado de este suplemento bajo, también después de su supresión. No se estudiaron dosis de adición menores de 3 mcg./kg., ni tampoco el efecto de ésta en hembras casadas repetidas veces.

Una comparación entre los resultados obtenidos con ratones en el presente estudio y con ratas, obtenidos bajo condiciones idénticas (7) demuestra claramente que las necesidades de las cepas de animales usadas ("Sprague Dahley" en el caso de las ratas) no son iguales. En las ratas, el suplemento de 3 mcg./kg. de vitamina B₁₂, aunque de considerable efectividad, no era suficiente para resultados óptimos, mientras que cinco mcg./kg. dieron un efecto óptimo en este caso. En estos animales también el crecimiento después del destete, el peso al

nacer y la tasa de glutation en eritrocitos e hígado fueron influenciados por el suplemento vitamínico. En ambos casos, la dieta de soya y maiz fortificada y suplementada con minerales y vitaminas, inclusive la B₁₂, dió resultados idénticos con los de la dieta de control, con la única excepción del tamaño de las crías, que fué mayor en los controles.

La dosis efectiva para ratones de 3 mcg./kg. de vitamina B₁₂ en una dieta de soya y maiz es muy baja. Los trabajos publicados sobre la dosis mínima de dicha vitamina mencionan cantidades mayores. Zucker y Zucker, en una revisión de la literatura sobre el particular, llegan a la conclusión de que la cantidad de vitamina B₁₂ de 15-30 mcg./kg. en la dieta es suficiente para las necesidades de crecimiento de ratas y pollos (9). En los experimentos discutidos por estos autores se han usado dietas que contenían proteínas yodizadas tireoactivas, que aumentan las necesidades en dicha vitamina, o que tenían un porcentaje elevado en proteínas con el mismo efecto. Nuestras dietas tienen todas un porcentaje de 24% de proteína cruda y 6% de grasa aproximadamente, y, por lo tanto, se acercan más a las condiciones normales. De algunos estudios experimentales más recientes con gallinas se han sacado conclusiones acerca de la dosis de vitamina B₁₂ para la reproducción de esta especie animal que son similares a las encontradas para ratones por nosotros (14).

Los ratones utilizados en el presente estudio, con la excepción de los animales de la serie de control, provenían todos de una cría mantenida desde hace 8 años con la dieta basal de soya y maíz sin vitamina B₁₂. Por lo tanto, no puede haber habido un "carry over" o efecto tardío de cantidades de vitamina B₁₂ ingeridas en generaciones anteriores. Pero hay que considerar la posibilidad de que se había efectuado, en el curso de estos 8 años, una selección de animales con requerimientos reducidos en vitamina B₁₂ u otra adaptación especial a la dieta. Se han descrito diferencias en los requerimientos de diferentes cepas de ratones respecto a sus necesidades en vitamina B₁₂ (10), pero no se han determinado cuantitativamente. El hecho de que algunos autores, al trabajar con dietas a base de caseína, no han podido observar influencia alguna de la vitamina B₁₂ sobre la reproducción y lactancia de ratones (11) se debe probablemente a que esta dieta basal tenía cantidades suficientes de la vitamina mencionada. Análisis microbioló-

gicos efectuados en este Instituto dieron valores de 3-5 mcg./kg. de vitamina B₁₂ en "caseína sin vitaminas".

Algunos investigadores encontraron que la suplementación con vitamina B₁₂ de dietas a base de harina de soya no da siempre un efecto óptimo como los dan preparaciones crudas de APF (factor proteico animal), que contiene, además de dicha vitamina, también antibióticos (12). Es a base de esta observación que se ha generalizado últimamente el uso de suplementos de antibióticos en la alimentación de animales. En nuestra cría de ratones, en la dieta basal vegetariana, la aureomicina no tenía efecto alguno (13). Los resultados presentados en el presente estudio de que la suplementación con B₁₂ de la dieta basal elimina completamente los signos de deficiencia en lactancia y crecimiento está de acuerdo con la observación anterior.

RESUMEN

Se estudiaron la reproducción, lactancia, crecimiento después del destete y tasa de glutatión sanguíneo y hepático en ratones criados por segunda generación o más en una dieta basal de soya y maíz reforzada con vitaminas y minerales, pero deficiente en vitamina B₁₂ con o sin suplementos en dicha vitamina y con una dieta completa de control. La dieta basal causó una reducción en el número de animales destetados por cría nacida, peso de destete a la edad de 28 días reducido en un 25% y mayor edad de las hembras, criadas en jaulas comunes, al nacer la primera cría. El peso de las crías al nacer, cambio de peso de las madres durante la lactancia y peso de las hembras al nacer la primera cría eran iguales en todas las series, al igual que la tasa de glutatión en eritrocitos e hígados de machos adultos. El crecimiento después del destete hasta la 7ª semana era más rápido en las series deficientes que en los controles.

Suplemento de 3 mcg./kg. o de 30 mcg./kg de vitamina B₁₂, más 0.2% de metionina, eran iguales efectivos para suprimir los efectos de la deficiencia de dicha vitamina.

El número de animales nacidos en cada cría fué mayor en la serie de control que en las series experimentales con o sin el suplemento de vitamina B₁₂. Se discuten estos resultados y se indican algunas diferencias en el efecto de la deficiencia en vitamina B₁₂ de ratones y ratas.

SUMMARY

Reproduction, lactation, post weaning growth and glutathione level in erithrocites and liver were studied in mice kept on a basal fortified soy-bean-corn diet deficient in vitamin B₁₂ with and without supplementation with this vitamin and on a complete stock diet. The deficient diet caused a reduction in the number of animals weaned per litters born, 28 day weaning weight reduced by about 25%; also the age of the females, kept in common cages and separated when pregnant, at the time of giving birth to their first litters, was higher in the deficient group. All these deficiency symptoms were equally well overcome by a supplement of 3 mcg./kg. of vitamin B₁₂ as by one of 0.2% methionine together with 30 mcg./kg. of this vitamin. No differences were apparent between deficient, supplemented and control groups in: birth weight of litters, weight change of the mothers during lactation, weight of females at the time of giving birth to the first litter and hepatic and erithrocite glutathione levels of 2-3 months old males. Litter size was larger in the controls than in the unsupplemented and supplemented groups fed the soy bean-corn rations. Post weaning growth (weaning age 4 weeks) was faster in the deficient than in the other groups.

Some differences of the deficiency symptoms and minimal vitamin B₁₂ doses between a strain of mice and of rats are discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden Fortpflanzung, Wachstum und der Gehalt an löslichem, reduziertem Gluthation in Mäusen untersucht, die auf einer Diät auf der Base von Soya Mehl und Mais und die mit Mineralien und Vitaminen verstärkt war, aber einen äußerst niedrigen Gehalt an Vitamin B₁₂ aufwies, mit oder ohne Zusätze dieses Vitamins, als auch in einer Gruppe, ernährt mit einer kompletten Kontrolldiät, die reichlich tierisches Eiweiss enthielt. Die Gruppen waren für wenigstens eine Generation vor Beginn der Versuche mit der entsprechenden Versuchsdiät ernährt worden. Der Einfluss der Vitamin B₁₂ Mangeldiät war:

Verminderung der Anzahl und des Durchschnittsgewichtes der Jungen im Alter von 4 Wochen und höheres Alter der Muttertiere bei Geburt des ersten Wurfes; dagegen waren die Geburtsgewichte, Gewichtsänderung der Muttertiere während der Säugeperiode, und deren Gewicht nach der Geburt des ersten Wurfs gleich in allen Serien, ebenso wie der Gehalt an Gluthation in Erythrocyten und Leber. Das Wachstum nach der Entwöhnung im Alter von 4 Wochen war stärker bei den deficienten Tieren, da diese in dem Alter noch kleiner waren als die Kontrollen.

Ein Zusatz von nur 3 gama Vitamin B₁₂ pro kg. Diät war ausreichend und ebenso wirksam wie ein solcher von 30 gama plus 0.2% Methionin um die genannten Mangelsymptome zu unterdrücken. Die Anzahl der Jungtiere pro Wurf war grösser in der Kontrollserie als in allen experimentellen Gruppen. Diese Ergebnisse werden diskutiert und Vergleiche mit Ergebnissen mit Ratten angestellt.

BIBLIOGRAFIA

- (1) D. K. Bosshardt, W. S. Paul, K. O. Doharty, J. W. Huff y R. H. Barnes. — *J. Nutr.* 37, 21 (1949).
- (2) W. G. Jaffé. — *Acta Cient. Venez.* 2, 78 (1951).
- (3) W. G. Jaffé. — *Arch. Biochem.* 27, 464 (1950).
- (4) U. D. Register. — *J. Biol. Chem.* 206, 705 (1954).
C. T. Ling y B. F. Chow. — *J. Biol. Chem.* 202, 443 (1953).
- (5) R. R. Grunert y P. H. Philip. — *Arch. Biochem.* 30, 217 (1951).
- (6) L. P. Dryden, A. M. Hartman y C. A. Cary. — *J. Nutr.* 45, 377 (1951).
- (7) W. G. Jaffé. — Datos no publicados.
- (8) W. G. Jaffé y P. Budowski. — *Acta Cient. Venez.* Vol. 5, No. 4 (1954).
- (9) T. F. Zucker y L. M. Zucker. — *Vitamins and Hormones* 8, 1 (1950).
- (10) Y. Chiung Puh Lee, J. T. King y M. B. Visscher. — *Am. J. Physiol.* 173, 465 (1953).
- (11) L. Mirone y E. M. Wade. — *Am. J. Physiol.* 175, 11 (1953).
- (12) E. L. Stockstad, T. H. Jukes, J. Pierce, A. C. Page y A. L. Franklin. — *J. Biol. Chem.* 180, 647 (1949).
- (13) W. G. Jaffé. — *Arch. Venez. Nutr.* 2, 381 (1952).
- (14) J. L. Milligan, G. H. Arscott y G. F. Combs. — *Poultry Sci.* 31, 830 (1952). A. C. Wiese, C. F. Peterson, R. V. Dahlstrom y C. E. Lampan, *id.* 31, 851 (1952).
- (15) L. P. Drydew, A. A. Hartman y C. A. Cary. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 27, 195 (1954).