

TRABAJOS DE INVESTIGACION

Estudio sobre la Vitamina B₁₂ *

WERNER G. JAFFÉ
Instituto Nacional de Nutrición

Premio Nacional de Investigaciones Científicas "José María Vargas",
correspondiente al año 1960

INTRODUCCION

El presente trabajo es una síntesis de los estudios que se iniciaron hace 15 años acerca de algunos aspectos nutricionales de dietas vegetarianas. Se incluyen además de varias observaciones originales (1 al 23) no publicadas anteriormente, datos que se han publicado en una serie de trabajos incluidos en la bibliografía (24 al 35). Para el presente estudio se utilizaron más de 3.000 ratas y cerca de 2.000 ratones. Varios resultados adicionales no se han incluido en el presente trabajo porque han sido o serán objeto de publicaciones separadas. No se incluyen las técnicas empleadas por haber sido descritas en los trabajos citados en la bibliografía.

El objeto principal de los experimentos que se presentan es el estudio de los efectos de una dieta exclusivamente vegetariana a través de muchas generaciones. Por su importancia en la alimentación humana interesaba conocer la posible aparición de signos de deficiencias nutricionales, el efecto sobre la reproducción y una posible adaptación a este tipo. En el curso de estos trabajos se presentaron numerosos problemas que se han estudiado detalladamente; algunos de ellos ya no tienen relación directa con aspectos de la nutrición humana,

* Este trabajo fue efectuado en los siguientes laboratorios: Instituto Químico-Biológico, Caracas; Departamento de Bioquímica de la Universidad de Wisconsin, EE.UU.; Departamento de Química de la Nutrición, Ministerio de Agricultura y Cría e Instituto Nacional de Nutrición, Caracas.

sino tratan más bien de cuestiones bioquímicas acerca de la función de la vitamina B₁₂ en el metabolismo, problema hasta hoy día no resuelto. Esperamos poder seguir investigando en este campo en el futuro para contribuir, por lo menos, con un pequeño aporte a un problema seguramente mucho más complejo de lo que parecía al principio.

En este trabajo se presentan únicamente los aspectos investigados por nosotros, sin intentar cubrir la extensa literatura existente sobre el tema.

EXPERIMENTOS PRELIMINARES

En el año 1942 iniciamos unos estudios comparativos sobre el valor alimenticio de las caraotas negras y las habas de soya (1). Ratas blancas se alimentaron con dietas compuestas de maíz pilado y caraotas negras, maíz pilado y soya, y maíz entero y soya, respectivamente. El crecimiento (aumento de peso por animal en 28 días) de las series que recibieron las dietas con soya, resultó superior en un 33% en comparación con los animales alimentados con las dietas preparadas con caraotas negras. Para averiguar si la diferencia era debida al mayor contenido en vitaminas o a la superioridad de las proteínas de soya, se efectuaron otros ensayos con dietas preparadas con una u otra de las leguminosas, pero reforzadas con las siguientes vitaminas: A, D, tiamina, riboflavina y niacina. Como en esta época no era posible obtener en forma pura las vitaminas biotina y ácido fólico, se agregó a las dietas 2.5% de levadura, por tratarse ésta de una buena fuente de ambos factores. En otro ensayo se empleó un extracto hepático como fuente de estas dos vitaminas. Estos ensayos dieron por resultado que la diferencia en la velocidad del crecimiento entre ratas que consumieron las dietas con caraotas y soya, respectivamente, no desapareció, lo que demostró que se debía a diferencias entre las proteínas de ambas leguminosas. Pero, además, se observó que los grupos de ratas que consumieron las dietas reforzadas con extracto hepático crecieron aproximadamente 15% más rápido que aquellos alimentados con dietas similares, pero suplementadas con levadura (2). Estos resultados no se podían explicar a base de los factores de crecimiento conocidos en esta época y nos estimuló a entrar en un estudio detallado de las posibles causas. Fue especialmente promisoría

la observación de que la capacidad de estimular el crecimiento de las ratas, lograda con los extractos hepáticos, guardó relación directa con los resultados beneficiosos obtenidos con dichas preparaciones en el tratamiento de la anemia perniciosa. Esta fue la primera observación sobre un efecto de preparaciones activas contra la anemia perniciosa en animales, sobre la cual se presentó un trabajo en el Tercer Congreso Latino-Americano de Química en Santiago de Chile, 1948.

METODOS EXPERIMENTALES

Los detalles de los métodos experimentales usados se han descrito en las publicaciones correspondientes, empleándose como animales de experimentación a ratas y ratones blancos. Los primeros ensayos se efectuaron con descendientes de ratas que nos fueron donadas por el Instituto de Investigaciones Veterinarias, entonces en la Hacienda Sosa, El Valle. Luego, en 1947, importamos 8 hembras y 2 machos ratas de la cepa "Sprague Dawley", de los Estados Unidos del Norte, y desde entonces mantuvimos una cría con descendientes de estos animales, que se usaron para todos los experimentos posteriores a esta fecha.

La cepa de ratones proviene de una cría del Hospital Vargas descendiente de una cepa del Instituto Rockefeller.

Todos los animales se mantenían en jaulas, con fondo de tela metálica, para evitar la coprofagia. Tanto la comida como el agua se ofrecían "ad libitum" en recipientes especiales que evitaban la dispersión y la contaminación con materias fecales. Los experimentos de crecimiento se hicieron generalmente con animales machos, los cuales sólo se pesaron dos veces semanales. Las crías se redujeron siempre a 6 animales dentro de las primeras 48 horas de vida.

Se calculó la desviación standard del valor promedio. Para determinar si las diferencias entre varios grupos experimentales eran estadísticamente significantes o no, se aplicó el test "t" de Student.

Para la determinación microbiológica de la vitamina B₁₂ usamos una modificación del método descrito en la Farmacopea XIV de los EE.UU., usando la cepa de lactobacillus:

L. leishmannii, obtenida por la "American Type Culture Collection".

El glutation se determinó por un método original (15) que se basa sobre la coloración que da este tripéptido con Nitroprusiato de sodio.

La dieta deficiente en vitamina B₁₂ estaba compuesta por: harina de soya, 46%; maíz molido, 46%; aceite de ajonjolí con vitaminas A, D y E, 5%; mezcla de sales minerales, 4%, y mezcla de vitaminas, 1%. La mezcla de sales era de: NaCl, 22%; CaCO₃, 30%; MnSO₄, 2%; CaHPO₄, 46%. La mezcla de vitaminas contenía por cada 100 gramos: clorhidrato de tiamina, 30 mg.; riboflavina, 30 mg.; pantotenato de calcio, 200 mg.; niacina, 200 mg.; clorhidrato de colina, 10 gr.; inositol, 1 gr.; ácido para-amino-benzoico, 2,5 gr.; ácido fólico, 25 mg.; biotina, 1 mgr.; clorhidrato de piridoxina, 200 mg. Esta dieta fue propuesta por nosotros en 1947 y su uso para trabajos sobre la vitamina B₁₂ se ha adoptado en muchos laboratorios y se prepara comercialmente para este fin. El análisis microbiológico de esta dieta comprueba que no contiene vitamina B₁₂ en cantidades apreciables. Como dieta control se usó un alimento comercial para ratas denominado "Ratarina".

PURIFICACION Y DISTRIBUCION

Se verificó el fraccionamiento del extracto hepático por extracción con alcohol, absorción de solución acidificada con carbón activado (Darco N° 60) y elución con metanol y amoníaco al 10% (3), obteniéndose así una preparación activa en la dosis de 2 mg./día/animal.

En la gráfica N° 1 se presenta un esquema del método usado. El efecto de esta fracción sobre el crecimiento de ratas se puede observar en la tabla N° 1, grupos 11 y 12.

Luego se estudió un número de materiales ricos en vitaminas del complejo B hasta entonces conocidos, con los resultados presentados en la tabla N° 1. Para estos ensayos se agregaron a la dieta experimental todas las vitaminas del complejo B aisladas hasta entonces.

Como se observa de los resultados de la tabla N° 1, ninguno de los productos vegetales estudiados, como: pulitura de

arroz, gérmenes de malta desecados, harina de alfalfa y levadura, tenían acción estimuladora sobre el crecimiento de los animales experimentales, mientras que el hígado desecado, el extracto de hígado y la harina de pescado estimularon considerablemente la ganancia diaria de peso de estos animales. Otro material activo fueron las heces desecadas de vaca. Este último material se incluyó en el estudio porque es conocido que los microorganismos (muy abundantes en el tracto gastro-intestinal de los rumiantes), sintetizan vitaminas que son aprovechadas por estos animales. Efectivamente, se encontró que los excrementos desecados de vacas estimulan el crecimiento, igual como la adición de harina de pescado o extracto hepático a la dieta de soya y maíz. La fracción purificada de hígado era activa en la cantidad de 0.2 ml./día, dosis que corresponde a un peso seco de sólo 2 mg.

Los resultados arriba señalados demostraron que el factor en estudio no se encuentra en ninguno de los materiales de origen vegetal estudiados, inclusive la levadura, mientras que existe en harina de pescado, hígado y también en heces de vaca. Esta distribución es única para una vitamina, porque todas las conocidas hasta entonces abundan en mayor o menor grado en los alimentos de origen vegetal, sea como tales o bien en forma de provitaminas, como es el caso, por ejemplo, de la vitamina A, que se encuentra en forma de caroteno en hojas y otros productos vegetales.

Los resultados obtenidos con estiércol de vaca como fuente del factor en estudio, demostraron que éste, probablemente, es un producto de la síntesis microbiana y que los rumiantes, por lo menos, pueden vivir con una dieta vegetariana deficiente en esta vitamina y almacenarla en su organismo, gracias a la síntesis intestinal. Sin embargo, una pregunta bastante interesante sobre este aspecto es si condiciones similares pueden existir en animales no rumiantes y humanos, cuya flora microbiana intestinal es mucho menos abundante que la de los rumiantes.

DEFICIENCIA CRONICA DE VITAMINA B₁₂

Cuando se inició el presente trabajo ya contábamos con muestras de la vitamina pura, que fue aislada y cristalizada (poco después de la ejecución de las investigaciones arriba

descritas), independientemente por dos grupos de investigadores de los EE.UU. (Rickes y otros) y de Inglaterra (Smith) y recibió el nombre de vitamina B₁₂ y más tarde también el nombre químico "cobalamina". Iniciamos un ensayo que se prolongó por 12 años, criando ininterrumpidamente ratas blancas y ratones blancos con la dieta de soya y maíz, deficiente en vitamina B₁₂, con el fin de estudiar el efecto a largo plazo de una dieta vegetariana en animales omnívoros, por las posibles implicaciones de los resultados sobre los conocimientos del valor nutricional de dietas pobres en alimentos de origen animal en humanos. Este estudio nos pareció de considerable importancia para un país en el cual el consumo de productos de origen animal es bajo y donde una parte importante de la clase de escasos recursos económicos tiene una alimentación casi exclusivamente vegetariana y, por lo tanto, muy deficiente en vitamina B₁₂.

En la tabla Nº 2 se presentan algunos de los resultados obtenidos. Se observa que la primera generación de los animales, nacida de madres que consumieron la dieta experimental desde que se unieron a los machos, era normal. Desde la segunda generación en adelante se observa un crecimiento reducido y aumento de la mortalidad de las crías, revelada tanto por el número de crías muertas totalmente, como también por el bajo número de animales destetados por crías nacidas. No se podían observar diferencias de importancia entre la segunda generación y las siguientes. Se había esperado encontrar un mejoramiento paulatino en la reproducción a medida que los animales se adaptan a la deficiencia crónica en vitamina B₁₂. Esto pareció probable porque generalmente se observó que, o se mueren todos los animales de una cría de una rata deficiente, o todos llegan a desarrollarse a adultos. Así pareció posible que existiera un mecanismo de selección de cepas más resistentes a la deficiencia crónica de la vitamina B₁₂. Esto hubiera explicado también la escasez de signos claros de deficiencia en poblaciones de consumo sumamente bajo de productos animales y, por consiguiente, de la vitamina en cuestión, como, por ejemplo, en la India. Sin embargo, los datos experimentales no dan un indicio de la existencia del mecanismo postulado, ya que no se observó la adaptación como se había esperado.

DOSIS MINIMA DE LA VITAMINA B₁₂

Los datos incluidos en las tablas Nos. 3 y 4 son los resultados de estudios sobre la dosis mínima necesaria para obtener una reproducción normal en ratas y ratones. Al mismo tiempo permiten apreciar los principales síntomas de la deficiencia de esta vitamina.

Se notará que el número de crías muertas (mortinatalidad y mortalidad durante las primeras 24 horas) era más alto en las series que consumieron la dieta basal que en los controles. El peso al nacer las crías no era diferente en las distintas series experimentales; igualmente no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, en la mortalidad después de 24 horas de nacidos (muertos/cría) y el cambio de peso de las madres durante la lactancia. Más bien había una tendencia de las madres de la serie control de ganar menos peso en esta época, pero las diferencias individuales eran tan grandes que no se pueden sacar conclusiones seguras.

La adición de vitamina B₁₂ a la dieta basal tenía un efecto significativo sobre la reducción de la mortinatalidad y mortalidad en las primeras 24 horas (no se puede distinguir entre ambas porque las jaulas se controlaban sólo una vez por día) y sobre el crecimiento de las crías durante la lactancia, expresada como peso de destete. Asimismo, causó crecimiento normal de los animales jóvenes después del destete (tabla N^o 4).

En las ratas, la inclusión de 0.003 mg. (3 μ g) de vitamina B₁₂ cristalina por kilogramo de dieta eliminó la mortalidad aumentada de las crías y causó un mejor crecimiento de éstas, sin que llegaran a un peso de destete completamente normal; mientras que la dosis de vitamina B₁₂ de 5 μ g/kg. de dieta permitió a los animales un crecimiento normal e igual al observado en la serie que recibió la dieta con 30 μ g/kg. y en la serie control. El crecimiento después del destete era normal con la dosis de 3 μ g/kg. (tabla N^o 4).

En los ratones, la dosis de 3 μ g/kg. ya era suficiente para eliminar los signos de deficiencia por completo.

No se conoce ninguna otra vitamina que tenga un efecto a tan reducida concentración.

Siempre había una diferencia en el número de animales nacidos en cada camada, entre los grupos controles y todos los

grupos experimentales. Todavía no se sabe a qué se debe esta diferencia. El peso al nacer no era afectado por la dieta de las madres.

LOS SIGNOS DE DEFICIENCIA NUTRICIONAL DE VITAMINA B₁₂

En los experimentos presentados se observaron deficiencias graves en la reproducción (tabla N^o 3) y en el desarrollo de las crías antes y después del destete (tabla N^o 4). En los animales adultos se observó una mayor incidencia de esterilidad en comparación con los controles y un atraso en la maduración sexual, que se manifiesta en la mayor edad de las hembras al dar a luz por primera vez, como se ve en la tabla N^o 5. Se esperaba encontrar también anomalías hematológicas en vista del papel de la vitamina B₁₂ en la anemia perniciosa; sin embargo, no fue posible demostrar la existencia de valores anormales en los elementos sanguíneos estudiados, en ratas que se habían criado por 10 generaciones consecutivas con la dieta deficiente, según se puede observar analizando el cuadro 6. Únicamente los valores de urea se encontraron ligeramente aumentados. Esto coincide con la falta de síntomas hemáticos en humanos que consumen dietas deficientes en vitamina B₁₂.

INFLUENCIA DEL COBALTO EN LA DEFICIENCIA DE VITAMINA B₁₂

El hecho de que es posible criar ratones y ratas por muchas generaciones sin una fuente alimenticia de vitamina B₁₂ nos hizo sospechar que también en estos animales, al igual que en los rumiantes, se verifica una síntesis intestinal del mencionado factor vitamínico por la flora microbiana. Para investigar esta posibilidad se estudió la influencia del cobalto sobre la reproducción de animales deficientes. La molécula de la vitamina B₁₂ contiene un átomo de cobalto, de manera que, en ausencia de este metal en los alimentos, no puede ser sintetizada por los microorganismos intestinales. Efectivamente, se conoce una enfermedad por deficiencia de cobalto en ganado

bovino y lanar, que se cura tanto por la adición de sales de este metal a la dieta o al agua, como también por la aplicación de vitamina B₁₂ por la vía parenteral (Underwood); pero no se habían hecho observaciones análogas en animales no rumiantes. Algunos de los resultados obtenidos con la aplicación de sulfato de cobalto a ratas y ratones deficientes en vitamina B₁₂ se han resumido en la tabla N^o 7. Se notará que las inyecciones de esta sal no resultaron en un mejoramiento de la reproducción, mientras que la aplicación oral tenía un efecto estadísticamente significativo. Este resultado se explica porque las bacterias intestinales pueden sintetizar más vitamina B₁₂ cuando se dan suplementos dietéticos de cobalto, mientras que no reciben ningún estímulo por el cobalto inyectado. Se puede concluir que la síntesis microbiana intestinal de la vitamina B₁₂ es probablemente de importancia también en animales no rumiantes y, además, que el cobalto debe considerarse como otro micro-elemento de importancia en la nutrición, muy probablemente también en la alimentación humana, en dietas que no aportan cantidades suficientes de vitamina B₁₂ y que producen condiciones, en las cuales la síntesis intestinal juega un papel importante. Por esta razón iniciamos también estudios sobre la distribución del cobalto en los alimentos de fuente vegetal.

DISTRIBUCION DE LA VITAMINA EN ANIMALES

La falta de síntomas de deficiencia en animales adultos fue el motivo para estudiar el contenido de los órganos de ratones y ratas en vitamina B₁₂. Se utilizó para este trabajo un método microbiológico basado sobre los requerimientos de ciertos microorganismos por esta vitamina. Ya al iniciar nuestros estudios, y antes del aislamiento de la cobalamina, habíamos empleado y ensayado con varios bacillus lácteos, para el estudio del factor entonces desconocido, sin lograr un procedimiento enteramente satisfactorio. Luego se encontró que el *Lactobacillus leichmannii* requiere la vitamina B₁₂ para su desarrollo y que se presta para un ensayo específico y muy sensible que permite la determinación de menos de una millonésima parte de un miligramo (Hoffman y col.). Aplicando este método con algunas modificaciones, se lograron los resul-

tados presentados en la tabla N^o 8. Ellos demuestran que el riñón contiene cantidades mucho mayores de vitamina B₁₂ que el hígado y que la concentración en ambos órganos depende de la dieta ingerida. Los animales criados con la dieta basal de soya y maíz, libre de esta vitamina, tenían únicamente la décima parte que los controles. Un suplemento de vitamina B₁₂ de 5 µg/kg. de dieta hace subir cerca del doble el nivel de la vitamina en los órganos, siendo esta dosis suficiente para asegurar una reproducción normal, según los datos de la tabla N^o 8. La aplicación de la dieta basal adicionada con 0.1% de caseína yodizada provocó un descenso marcado en las reservas tisulares, si se usaban animales anteriormente alimentados con la dieta control, como se nota en las series Nos. 4, 5 y 6, mientras que la misma dieta no causó ningún descenso de la vitamina B₁₂ en los órganos de animales ya deficientes (tabla N^o 7). Este resultado era inesperado porque es conocido que sustancias tiro-activas, como la caseína yodizada, aumentan marcadamente las necesidades por la vitamina B₁₂. Efectivamente, la dieta basal sin la adición de caseína yodizada causa una baja mucho menos marcada, como se ve en la serie N^o 8. En la serie N^o 9 se estudió la rapidez con que se llenan las reservas agotadas de vitamina B₁₂ de animales anteriormente deficientes. Como se nota, estas reservas son prácticamente normales al cabo de un mes de consumo de la dieta control o de la dieta basal, adicionada con 30 µg/kg. de vitamina pura.

La comparación entre los valores de ratas y ratones demuestra que en la última especie, el nivel de vitamina B₁₂ hepática es más de 4 veces al de ratas, mientras que los niveles renales no son muy diferentes. El consumo de la dieta basal deficiente no causa una baja tan marcada como es en el caso de las ratas. Parece que los ratones tienen un mecanismo más eficaz de impedir la pérdida de esta vitamina o de su absorción de los intestinos. La tercera posible explicación de una síntesis intestinal más efectiva de la vitamina en ratones que en ratas, no parece respaldada por los resultados presentados en la tabla N^o 7.

En la tabla N^o 9 presentamos unos resultados obtenidos al fraccionar la vitamina B₁₂ de hígados y riñones de ratas normales y deficientes en 3 fracciones: primero se determinó

la vitamina total en los órganos homogenizados, luego se centrifugó el homogenizado para eliminar los núcleos y otras fracciones insolubles y finalmente se hizo una precipitación del homogenizado con ácido metafosfórico, para separar la fracción de la vitamina ligada a proteínas. Mientras que la concentración relativa de las 3 fracciones era aproximadamente igual, tanto en los riñones de las ratas normales como en las deficientes, en el hígado había una diferencia marcada. En los hígados de los animales deficientes, los análisis de la fracción de vitamina B₁₂ soluble total y la no proteica dieron valores iguales; en los controles el último valor era mucho más alto que el primero. La explicación para esta observación se debe buscar en la presencia de una parte de la vitamina B₁₂, en forma combinada a proteínas existente en la fracción eliminada por la centrifugación y que es inestable en presencia del ácido metafosfórico, liberándose por este tratamiento y transformándose en vitamina soluble. Aparentemente, esta fracción falta por completo en los animales deficientes.

La comparación de las concentraciones de vitamina B₁₂ total, con la fracción soluble en hígado y riñones, demuestra que en el primer órgano, la mayor parte de la vitamina se encuentra combinada en la fracción eliminada por centrifugación, es decir, en los núcleos, mientras que en los riñones la mayor parte se encuentra en la parte soluble. Esta diferencia parece significativa, en vista de que se ha relacionado la vitamina B₁₂ con la síntesis de las proteínas. Es aceptado generalmente el papel de las nucleoproteínas en la síntesis proteica y la importancia del hígado como sitio de esta síntesis, especialmente para las proteínas plasmáticas.

COMPOSICION DE LA DIETA Y EL REQUERIMIENTO POR LA VITAMINA B₁₂

En otro experimento se estudió la influencia del contenido proteico de la dieta sobre la necesidad en vitamina B₁₂ de los animales. En la tabla N^o 10 se presentan algunos de los resultados obtenidos, que permiten postular un efecto negativo de las dietas altas en proteínas sobre animales deficientes en vitamina B₁₂. La serie alimentada con la dieta más pobre en proteínas creció mejor, y la alimentada con la dieta más rica

en proteínas mostró el mayor retardo en el crecimiento. No es de extrañar que el efecto beneficioso de la vitamina B₁₂ elimina estas diferencias y que esto no se nota en la mortalidad de las crías, porque la vitamina se aplicó sólo 1-3 días antes de nacer la cría correspondiente.

De estos resultados se puede concluir que las necesidades por vitamina B₁₂ dependen, hasta cierto grado, del contenido de proteínas de la dieta, aumentando la demanda fisiológica por la vitamina con la mayor ingestión de ellas. Estas observaciones están de acuerdo con los resultados de varios autores (Hartman y cols.).

En la misma tabla se han incluido los resultados de un experimento sobre la influencia de una dieta de mayor contenido graso en la reproducción de los animales deficientes en vitamina B₁₂. Al comparar los datos correspondientes a las series Nos. 1 y 7 se notará que, aunque hay menor mortalidad y peso de destete más alto en la última, estas diferencias no son significantes. Se puede concluir que dentro de los límites de este ensayo no había influencia del contenido de grasa en dietas deficientes en vitamina B₁₂ sobre los requerimientos en esta vitamina de las ratas en reproducción.

VITAMINA B₁₂ Y GLUTATION

El glutacion es un tripéptido compuesto de glicina, ácido glutámico y cisteína que se encuentra en la mayoría de los tejidos animales y en muchas plantas. Sobre su función bioquímica se sabe poco; el hecho de que el glutacion hepático se metaboliza sumamente rápido, como se demostró mediante la técnica de radioisótopos, hace suponer que tiene un papel metabólico importante. Dos grupos de investigadores (Chow, Register) habían demostrado una relación entre vitamina B₁₂ y glutacion. Por la acción de la ingestión de proteínas sobre la formación de glutacion (Leaf y Neuberger) y su posible relación con síndromes de desnutrición humana, como la pluricarenancia infantil o Kwashiorkor, estudiamos la relación entre vitamina B₁₂, glutacion y aminoácidos en la dieta, con los resultados presentados en la tabla N^o 11.

En este ensayo se emplearon 300 ratones. Se usaron las dietas Basal, Control, una baja en los aminoácidos, metionina y

cistina, que se preparó con caraoatas negras cocidas, y otra sin proteínas, compuesta de almidón, aceite, sales minerales y vitaminas.

Los animales se sacrificaron aplicando un golpe, se sacaron rápidamente los hígados, los cuales se pesaron y se homogenizaron con ácido metafosfórico en solución salina. El glutathion se determinó inmediatamente con un método colorimétrico, descrito por nosotros (15). Los procedimientos experimentales se describirán más detalladamente en un trabajo futuro.

La comparación de los valores encontrados en los grupos Nos. 1, 2 y 4, y también de los animales alimentados con y sin B_{12} en los grupos 2 y 4, demuestra que la mera falta de la vitamina no provoca una baja de los valores hepáticos de glutathion. La dieta baja en metionina y cistina, la sin proteína y el ayuno, produjeron una baja significativa; ésta era mayor en los animales deficientes en B_{12} que en los no deficientes (grupos 5, 9, 11 y 12), mientras que el experimento del grupo 3, en el cual la dieta baja en metionina se aplicó durante un mes entero, dio un resultado contrario, es decir, los animales deficientes en vitamina B_{12} tenían niveles de glutathion significativamente superiores a los no deficientes en la dieta con esta vitamina. Resultados paradójicos como éste se han observado en otros ensayos sobre glutathion (Register y Bartlett), en los cuales la aplicación simultánea de dos medidas, que por sí solas bajan el nivel de glutathion, en conjunto causan más bien un incremento.

Estos resultados demuestran que hay una relación entre la vitamina B_{12} y el glutathion, pero mucho menos evidente que la existente entre las proteínas dietéticas y el glutathion y que la primera no es directa, porque no se manifiesta en animales alimentados con dietas completas con excepción de la vitamina B_{12} . Parece que debe existir algún "stress" como la deficiencia en metionina, o en proteínas totales, o en ayunas, para poder manifestarse la relación glutathion hepático-vitamina B_{12} . Una interpretación completa de estos resultados no será posible hasta que no se conozca más exactamente el papel del glutathion en el metabolismo.

Por último, se presenta en la tabla N^o 12 el resultado parcial de un estudio analítico sobre el contenido en vitamina B_{12}

de los alimentos criollos más importantes. Llama la atención el valor muy alto de las sardinas, tanto frescas como enlatadas. Efectivamente, de más de 20 muestras de pescados analizados, las sardinas dieron el valor más alto, que fue superado solamente por hígado de res.

DISCUSION

Los ensayos presentados se efectuaron siempre con la intención de tratar de aplicar los resultados a los problemas de la nutrición humana, que habían servido como punto de partida para todo el trabajo. La investigación experimental presentada tenía como objeto inicial el estudio de uno de los aspectos principales de la dieta popular venezolana, el bajo consumo de productos animales y la prevalencia de alimentos de origen vegetal, especialmente caraotas y maíz. Las observaciones sobre una vitamina nueva eran inesperadas; pronto se pudo concluir, sin embargo, que este nuevo factor podría tener un interés especial para un país donde la dieta básica de gran parte de la población se compone de alimentos deficientes en esta vitamina. Se efectuaron, por lo tanto, varios ensayos con el fin de esclarecer la importancia de la vitamina B₁₂ en los distintos aspectos de la fisiología humana.

Al sacar conclusiones de experimentos de laboratorio para la medicina humana, se presentan numerosas dificultades. Sin embargo, la experimentación animal siempre ha sido y será el método que tiene que anticiparse a los ensayos clínicos y a la aplicación en la medicina preventiva. Es imposible encontrar, en humanos, cuadros tan claros como se pueden producir con relativa facilidad en animales experimentales, por la posibilidad de alimentar a estos últimos, durante todo el tiempo necesario, con dietas de composición completamente conocida y constante, condición casi imposible de lograr en humanos. Por lo tanto, es muy difícil descubrir una deficiencia alimenticia pura de la vitamina B₁₂ en humanos, y los síntomas de la carencia de este factor siempre estarán acompañados y modificados por los de otros factores o condiciones patológicas que existen simultáneamente. No obstante estas limitaciones, nuestros resultados permiten una serie de conclusiones de interés para la medicina humana y la salud pública.

La distribución de la vitamina B₁₂ es única entre todas las vitaminas conocidas. De los datos obtenidos en ensayos biológicos con ratas y resumidos en la tabla N° 1 y los de ensayos microbiológicos y presentados en la tabla N° 12 se observa que ningún alimento de origen vegetal la contiene en cantidades de importancia nutricional. Las publicaciones de otros autores comprueban esta observación, con excepción de los datos sobre unas algas marinas que viven en simbiosis con bacterias sintetizantes de B₁₂ y de leguminosas germinadas que, según unos autores indios (Rohatgi et al.), son relativamente ricos en dicha vitamina. Ni nosotros, ni otros autores, sin embargo, hemos podido comprobar esta última afirmación.

El significado de esta distribución de la vitamina en los alimentos se observa claramente en el siguiente cálculo: una dieta compuesta de arepas, caraotas negras y plátanos, consumida en cantidades para suplir completamente las necesidades de un hombre adulto, aporta aproximadamente el 100% de la vitamina B₁, el 60% de la riboflavina, el 75% de la niacina y el 70% de la vitamina A que se recomienda como cantidad óptima, mientras que no contiene nada de vitamina B₁₂. Sólo si se incluyen alimentos de origen animal en la dieta se logrará un aporte proporcional de dicha vitamina.

Los datos de las tablas 2, 3, 4, 5 y 6 son de utilidad para dirigir la búsqueda por los síntomas de deficiencia de vitamina B₁₂ en humanos. Según ellos, será probable encontrar trastornos en la reproducción; aumento de la mortalidad o abortos, mal crecimiento, especialmente en niños pequeños, y un desarrollo atrasado. Todos estos trastornos se han señalado como secuencia de deficiencias nutricionales, pero sin la experiencia con animales sería casi imposible decidir cuáles son los factores dietéticos causantes de ellos. Con las pocas excepciones de las enfermedades carenciales clásicas, como escorbuto, beri-beri, pelagra, casi no existen deficiencias en humanos ocasionadas por la falta de un solo nutriente. En animales experimentales, sin embargo, se puede producir artificialmente la deficiencia de un solo factor definido. Trastornos parecidos a los encontrados por falta de vitamina B₁₂ en ratas y ratones se han descrito en humanos en los casos de las llamadas pluricarencias. Es evidente la conclusión de que la falta de vitamina B₁₂ puede jugar un papel importante en estos cuadros clínicos. En las fórmulas elaboradas por el Instituto Nacional

de Nutrición para el combate del síndrome pluricarenal infantil, como también de las pluricarenias de las embarazadas, se ha incluido la vitamina B₁₂ por esta razón. En el caso del crecimiento de niños se ha encontrado efectivamente un estímulo importante con la aplicación de la vitamina B₁₂ (Wetzel).

En vista de la distribución única de la vitamina en los alimentos, se podría esperar una mayor frecuencia de signos graves de deficiencia en grupos de poblaciones de bajo consumo de alimentos de origen animal. Varias de las observaciones presentadas pueden ayudar a explicar esta falta de síntomas. La síntesis de la vitamina B₁₂ por la microflora intestinal juega probablemente un papel importante, como se ve de los resultados presentados en la tabla N^o 8, aunque se desconoce su significado exacto en humanos. Además, la gran facilidad de almacenar cantidades muy grandes de dicha vitamina en riñón e hígado será de considerable importancia. La falta de síntomas hematológicos en animales adultos (tabla N^o 7) será explicable por las mismas causas y por las necesidades reducidas de adultos para mantener el cuadro hematológico normal, en comparación con las necesidades para la reproducción y el crecimiento.

En humanos la situación es similar. Son raros los casos descritos de una deficiencia alimenticia de vitamina B₁₂ en adultos, aunque recientemente se han señalado algunos casos en personas que por razones religiosas no ingirieron ningún alimento de origen animal (Harrison et al.). Casi siempre se encuentran deficiencias de vitamina B₁₂ conjuntamente con malnutrición proteica, por ser los alimentos pobres tanto en uno como en el otro nutriente. Y es por esta razón tan difícil separar el efecto clínico de estas deficiencias. Además, se desconoce la importancia de la síntesis intestinal de la vitamina por la microflora y la importancia del cobalto de los alimentos en los humanos. Sólo en los casos de trastornos de la absorción de la vitamina B₁₂ se pueden encontrar síntomas inequívocos de deficiencia, como, por ejemplo, en la anemia perniciosa, la anemia causada por el parásito *Diphyllobothrium latum* (von Bonadorff), etc. En el sprue existen probablemente trastornos de absorción de varios nutrientes, inclusive la B₁₂.

Igualmente, se pueden observar síntomas de deficiencia de la vitamina después de la gastrectomía total. En estos casos pasan generalmente 3-4 años sin trastornos, debido a la gran capacidad del organismo de almacenar la vitamina. Esta capacidad es evidente y que deducimos del análisis de los datos cuantitativos de la tabla N^o 8 al comparar los valores de vitamina B₁₂ en hígados y riñones del grupo de control con la serie N^o 3, alimentada con la dieta que contiene 5 $\mu\text{g}/\text{kg.}$, dosis que observamos es suficiente para impedir la aparición de signos de deficiencia. Solamente en los dos órganos estudiados, los animales del primer grupo tenían un promedio de 1.393 μg de vitamina B₁₂ más que los del segundo, lo cual, en vista de los requerimientos tan bajos, esta cantidad es muy grande. Efectivamente, se observa de los datos contenidos en la tabla N^o 2 que en la primera generación de animales mantenidos con la dieta deficiente, no aparecieron signos de deficiencia y que sólo desde la segunda generación en adelante éstos se hicieron manifiestos.

Más difícil es sacar conclusiones acerca de la dosis mínima requerida normalmente para el hombre a base de los resultados en animales. Considerando la relación entre las cantidades requeridas de otras vitaminas por ratas y hombres, se puede presumir que la dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{día}$ de vitamina B₁₂ por persona será probablemente suficiente. Si se calcula la cantidad de vitamina B₁₂ que existe en una dieta humana considerada como buena, se llega a una cifra de alrededor de 5 $\mu\text{g}/\text{día}$, como lo demuestra el siguiente cálculo: 1/2 litro de leche, 1 μg ; 100 gramos de carne de res, 3 μg ; 1 huevo, 1 μg . Este cálculo coincide bastante bien con la experiencia clínica en la anemia perniciosa. En estos casos generalmente basta la dosis inyectada de 1 $\mu\text{g}/\text{día}$ para obtener remisión completa. Se sabe que la absorción de la vitamina ingerida es generalmente no más del 20%. Así, con una dosis de 5 μg en los alimentos, sólo 1 μg se absorbe. Como se puede concluir de los datos de la tabla N^o 12, esta dosis se puede lograr fácilmente con la inclusión de suficiente cantidad de carne, pescado y leche en la dieta.

Tomando en cuenta los datos de la tabla N^o 10 sobre influencia del contenido proteico de la dieta sobre los requerimientos en vitamina B₁₂, parece probable que éstos también serán menores en grupos humanos de bajo consumo de pro-

teínas. Precisamente son estos mismos grupos los que también consumen menores cantidades de dicha vitamina; por lo tanto, esta relación entre ambos nutrientes puede ayudar a explicar la falta de síntomas por deficiencias de B₁₂ en humanos.

RESUMEN

La distribución de la vitamina B₁₂ en los alimentos corrientes es única, porque se encuentra en cantidades significativas sólo en los de origen animal. Una colonia de ratas alimentadas por 18 generaciones seguidas ininterrumpidamente con una dieta vegetariana y deficiente en B₁₂ no mostró signos de adaptación a esta dieta. Los síntomas de la deficiencia nutricional más sobresalientes se observan en la reproducción y el crecimiento y no en el cuadro hematológico de los adultos. La adición de sales de cobalto a la dieta deficiente aminora los síntomas carenciales, mientras que la inyección de este metal es inefectiva. Esto se debe probablemente al estímulo que ejerce el cobalto sobre la síntesis de vitamina B₁₂ por los microorganismos intestinales. El órgano de mayor concentración en vitamina B₁₂ es el riñón; las cantidades almacenadas en animales normales son muy grandes en comparación con las necesidades. Los requerimientos son muy bajos; la dosis ingerida de 5 µg/día se puede considerar como adecuada. Cuando la dieta es alta en proteínas, se manifiesta la deficiencia de vit. B₁₂ con mayor severidad. En los animales deficientes en vitamina B₁₂ se observan niveles bajos de glutatión si existe algún "stress" nutricional adicional; no se nota este fenómeno si se alimentan con dietas solamente deficientes en cobalamina. Las mejores fuentes alimenticias son: hígado, sardinas y otros pescados, carnes, leche, queso y huevos.

Se discuten las posibles aplicaciones de estas observaciones para problemas nutricionales humanos, haciendo hincapié que se pueden esperar signos de deficiencia de vitamina B₁₂ en casos de pluricarencias, sobre todo en niños.

SUMMARY

The distribution of vitamin B₁₂ in foods is unique in the sense that it is only found in significant amounts only in those of animal origin. A rat colony fed during eighteen generations uninterruptedly with a diet deficient in B₁₂ did not show any signs of adaptation to it. The most important signs of nutritional deficiency are more apparent in reproduction and growth but not in the hematologic picture of the adult animal. The addition of cobalt salts to the deficient diet diminishes the deficiency symptoms, the injection of the metal is without effect. This is probably due to the stimulation of intestinal synthesis of B₁₂ by the micro-organisms of the gut produced by cobalt.

The organ in which there is the biggest concentration of B₁₂ is the kidney, the amount of the stored vitamin in normal animals is very big in comparison with the requirements. The requirements are very small. The 5 micrograms ingested daily can be considered as adequate. When the diet is high in protein the deficiency appears more severely. Low levels of glutathione are shown in the animals deficient in B₁₂ if there is some other nutritional "stress" added. This phenomenon does not become apparent if the animals receive only the diet deficient in B₁₂.

The best sources of B₁₂ are: liver, sardines, other fishes, meats, milk, cheese and eggs.

The possible applications of this observations to human nutritional problems are discussed stressing the fact that signs of vitamin B₁₂ deficiency can be expected in pluricarencial syndromes mainly in children.

GRAFICA N° 1

ESQUEMA DEL FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTO HEPATICO

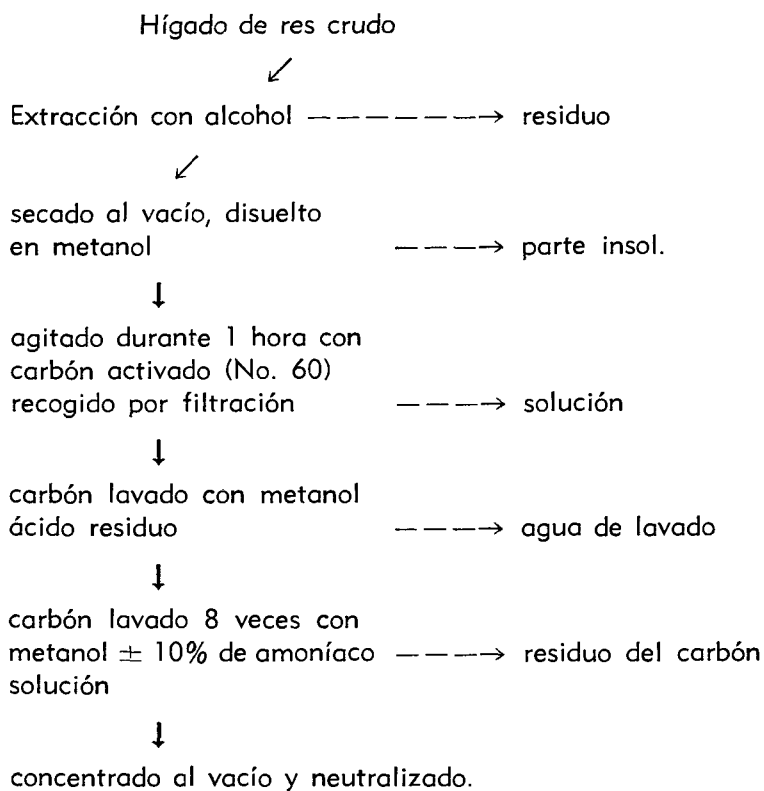


TABLA N° 1

**CRECIMIENTO DE RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA BASAL
DE SOYA Y MAIZ CON DISTINTOS SUPLEMENTOS**

Grupo N°	S U P L E M E N T O	Aumento de peso por animal y se- mana en gramos
1		24
2	25% de caraotas negras cocidas dese- cadas y molidas	21
3	25% de harina de alfalfa	22
4	25% de pulitura de arroz	26
5	25% de gérmenes de malta	26
6	46% de harina de ajonjolí	25
7	46% de harina de maní	24
8	10% de levadura	21
9	10% de heces de vaca desecadas	33
10	1% de harina de pescado	33
11	Agua del prensado de pescado equi- valente al 0.3%	36
12	1% de extracto hepático comercial ...	35
13	0.2 ml. de la fracción hepática diaria- mente *	36
14	0.2 ml. de la fracción hepática inyec- tada *	34
15	1% residuo del fraccionamiento	27

Cada grupo experimental consiste de 4 ó 6 ratas machos de 3 semanas de edad al iniciarse el ensayo.

* Veá gráfica N° 1. Se aplicó con gotero diariamente.

TABLA Nº 2

REPRODUCCION DE RATAS ALIMENTADAS POR VARIAS GENERACIONES CON UNA DIETA SIN VIT. B₁₂

Generaciones	No. de crías	Crías muertas	Animales/ cría	Peso al nacer	Nº de anima- les desteta- dos/cría	Peso de destete	Muertos/ cría	Ganancia de peso de las madres du- rante la lac- tancia
1	9	0	8.4	5.7	5.3	63.1	0.3	9.0
2-3	24	8	6.0	5.8	2.1	41.4	1.0	6.2
3-4	19	6	7.1	5.6	3.0	47.9	0.1	10.5
5-7	32	11	7.7	6.0	2.3	38.9	1.1	2.1
8-12	32	8	6.9	5.6	4.2	43.1	0.8	10.3
13-15	30	9	7.6	5.3	3.6	45.7	0.6	7.6
16-18	36	10	7.0	5.3	3.1	42.9	0.7	0

TABLA Nº 3
 DOSIS MINIMA DE VITAMINA B₁₂ PARA RATAS Y RATONES
 R A T A S

Dieta	Nº de crías	Crias muertas	Animales/cría	Peso al nacer	Animales destetados crías nacidas	Muertos durante lactancia/crias	Peso al destete	Cambio de peso de madres durante lactancia
Basal	30	9	7.6 ± 0.37	5.4 ± 0.19	3.6	0.5	46.7 ± 3.1	9.1 ± 3.0
íd. + 3 µg/kg. de vit. B ₁₂	15	1	8.0 ± 0.62	5.8 ± 0.13	5.3 '	0.1	57.7 ± 2.2'	21.4 ± 3.0
íd. + 5 µg/kg. de vit. B ₁₂	26	3	8.2 ± 0.43	5.7 ± 0.19	4.8 '	0.4	66.6 ± 1.0'	17.1 ± 3.7
íd. + 30 µg/kg. de vit. B ₁₂	20	1	7.5 ± 0.50	5.5 ± 0.22	5.2 '	0.7	62.8 ± 3.1'	7.6 ± 5.6
Control	103	2	9.3 ± 0.29	6.0 ± 0.05	5.5 '	0.3	66.6 ± 1.0'	0.8 ± 2.1
R A T O N E S								
Basal	32	3	7.1 ± 0.25	1.5 ± 0.036	4.3 ± 0.32	1.0	12.6 ± 0.47	-0.5 ± 0.4
íd. + 3 µg/kg. de vit. B ₁₂	37	0	7.4 ± 0.34	1.4 ± 0.029	5.2 ± 0.20	0.3	17.0 ± 0.22	-0.7 ± 0.36
íd. + 30 µg/kg. de vit. B ₁₂	9	1	7.2 ± 0.38	1.4 ± 0.042	4.7 ± 0.69	0.6	15.8 ± 0.70	-0.2 ± 0.37
Control	50	2	8.3 ± 0.26'	1.4 ± 0.035	5.2 ± 0.19	0.7	16.9 ± 0.32	-1.3 ± 0.53

TABLA N° 4

CRECIMIENTO EN 4 SEMANAS DE RATAS DESPUES DEL DESTETE
Y ALIMENTADAS CON DIETAS CON DIFERENTES NIVELES
DE VITAMINA B₁₂

Dieta y suplemento	Nº de animales	Sexo	Aumento de peso
Basal	23	m.	91.3 ± 4.0
	21	h.	79.9 ± 2.9
fd. + 3 µg/kg. de vit. B ₁₂	25	m.	120.0 ± 2.8
	28	h.	99.1 ± 1.7
fd. + 5 µg/kg. de vit. B ₁₂	30	m.	128.4 ± 2.8
	30	h.	95.5 ± 1.8
Control	24	m.	121.5 ± 3.0
	28	h.	92.1 ± 2.1

TABLA N° 5

FERTILIDAD DE RATAS HEMBRAS DEFICIENTES EN VITAMINA B₁₂

Grupo	Nº de animales hembras fértiles unidas a los machos	Nº de animales que dieron a luz	Edad de la madre al nacer la primera cría en días
Deficiente	21	12	147 ± 2.5
Suplementados con Vit. B ₁₂	27	27*	111 ± 3.9*
Controles	24	24*	96 ± 3.7*

* Diferencia con el grupo deficiente significativo.

TABLA N° 6
 CARACTERISTICAS HEMATOLOGICAS DE RATAS MACHOS
 ADULTOS DEFICIENTES EN VITAMINA B₁₂

Número de animales	Deficientes 38	Controles 16
Hemoglobina gm. %	16.1 ± 0.27	17.6 ± 0.45
Hematocrito	42 ± 1.1	42 ± 0.75
Glóbulos rojos × 1.000/mm. ³	7.075 ± 204	7.342 ± 267
Urea gm./1.000	0.27 ± 0.017	0.24 ± 0.072
Glóbulos blancos/mm. ³	9.769 ± 585	10.856 ± 800
Gran. Linfocitos %	8.4 ± 0.89	9.2 ± 2.0
Peq. Linfocitos	73.0 ± 7.9	69.7 ± 6.0
Monocitos	4.0 ± 0.43	2.2 ± 0.38
Eosinófilos	2.0 ± 0.39	3.1 ± 0.38
Bastones	0.6 ± 0.012	0.5 ± 0.021
Neutrófilos	14.6 ± 1.45	11.8 ± 1.66
Anisocitosis moderada	8	7
Hipocromia	4	1

Los controles recibieron la misma dieta basal, pero adicionada con 30 μ g/kg. de vit. B₁₂.

No hay diferencias estadísticamente significativas.

TABLA N° 7
 INFLUENCIA DEL COBALTO SOBRE LA REPRODUCCION DE
 RATAS Y RATONES

R A T A S

Dieta	N° de crías nacidas	Crías muertas	N° de animales destetados/cría	Peso de destete
Basal	18	11	1.4	35 ± 1.78
íd. + 4 mg.% de CoCl ₂	12	8	1.75	54 ± 4.35*
íd. + 0.02 mg.% CoCl ₂ en agua de bebida	21	9	2.9*	55 ± 3.58*
íd. + Vit. B ₁₂	13	4	3.2*	59 ± 5.23*
R A T O N E S				
Basal	42	11	3.4	11.5 ± 0.377
íd. + 4 mg.% CoCl ₂	20	1	4.7*	11.9 ± 0.482
íd. + 0.02 mg.% CoCl ₂ en agua de bebida	28	4	4.5*	11.7 ± 0.327
íd. 200 mg. CoCl ₂ inyect. i. p.	21	5	3.0	11.4 ± 0.375
íd. + Vit. B ₁₂	19	2	5.0*	15.2 ± 0.364

Se incluye el error standard del promedio.

* Diferencia con grupo basal estadísticamente significativa.

TABLA N° 8

VITAMINA B₁₂ EN ORGANOS DE RATAS Y RATONES SOMETIDOS A DIFERENTES TRATAMIENTOS DIETETICOS

N°	N° de animales	Dieta	Dieta anterior	Vit. B ₁₂ en µg/g.	
				Hígado	Riñón
1	9	Control	—	0.204 ± 0.016	1.421 ± 0.032
2	8	Basal	—	0.022 ± 0.002	0.106 ± 0.005
3	8	íd. 5 µg/kg. de vit. B ₁₂	—	0.040 ± 0.004	0.182 ± 0.022
4	4	Basal ± 0.1% caseína iodizada, 1 semana	Control	0.130 ± 0.036	1.057 ± 0.150
5	4	íd. 2 semanas	íd.	0.096 ± 0.017	0.304 ± 0.027
6	4	íd. 3 semanas	íd.	0.0760 ± 0.008	0.269 ± 0.043
7	4	íd. 12 semanas	Basal	0.015 ± 0.001	0.092 ± 0.006
8	4	Basal, 3 semanas	Control	0.127 ± 0.018	0.488 ± 0.009
9	4	Control, 4 semanas	Basal	0.177 ± 0.022	1.129 ± 0.131
10	6	Basal + 30 µg/kg. vit. B ₁₂	íd.	0.197 ± 0.029	1.594 ± 0.069
R A T O N E S					
1	6	Control	—	0.949	2.27
2	6	Basal	—	0.152	0.920
3	6	Basal con 5 µg/kg. vit. B ₁₂	—	0.236	1.58

TABLA N° 9
FRACCIONES DE VIT. B₁₂ EN ORGANOS DE RATAS DEFICIENTES
Y NORMALES

H I G A D O			
Serie	B ₁₂ total μg/g.	B ₁₂ soluble μg/g.	B ₁₂ no precipitable con ácido meta- fosfórico μg/g.
Control	0.151 ± 0.033	0.037 ± 0.01	0.079 ± 0.01
Deficiente	0.016 ± 0.005	0.0080 ± 0.0012	0.0076 ± 0.001
R I Ñ O N			
Control	2.307 ± 0.14	1.575 ± 0.16	0.715 ± 0.09
Deficiente	0.080 ± 0.0042	0.059 ± 0.0042	0.045 ± 0.0064

TABLA N° 10

REPRODUCCION DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS BAJAS EN VIT. B₁₂ Y CON DIFERENTES NIVELES DE PROTEINA O GRASA

N°	Dieta y suplemento	N° de crías nacidas	N° de animales sobrevivientes/crías nacidas	Peso de destete
1	Basal 22% de prot. 5% grasa	24	3.5	43.3 ± 2.2
2	íd. vit. B ₁₂ inyectada	10	4.2	50.2 ± 2.1
3	45% de prot.	12	3.3	36.4 ± 4.8
4	íd. vit. B ₁₂ inyectada	10	3.6	55.0 ± 4.6
5	14% de prot.	12	3.1	47.5 ± 2.3
6	íd. vit. B ₁₂ inyectada	8	5.3	57.7 ± 3.5
7	12% de grasa	12	4.6	48.3 ± 3.2
8	íd. + 5 µg B ₁₂ /kg	17	4.6	57.5 ± 3.8

La vitamina B₁₂ se inyectó en una sola dosis de 15 µg por la vía i. p. en las madres 1-3 días antes de dar a luz. En el grupo N° 8 el suplemento vitamínico fue incorporado en la dieta.

TABLA Nº 11

VALORES DE GLUTATION REDUCIDO HEPATICO EN RATONES SOMETIDOS A DIFERENTES TRATAMIENTOS DIETETICOS

104

ARCHIVOS VENEZOLANOS DE NUTRICION

Nº	Tratamiento	Con Vitamina B ₁₂		Sin Vitamina B ₁₂	
		Nº de animales	Glutation hepático mg./100 gr.	Nº de animales	Glutation hepático mg./100 gr.
1	Dieta control	15	267 ± 12	—	—
2	Basal	13	256 ± 7	15	256 ± 9
3	Baja en metionina 1 mes	25	72 ± 2.3*	16	69 ± 2.4**
4	Id. más metionina	20	256 ± 10	16	244 ± 9
5	Sin protefna 4 días	18	89 ± 7 *	20	68 ± 5 **
6	Id. más 0,25% 1-Cisteína HCl	7	206 ± 22	14	218 ± 11
7	Id. más 0.2% 1-Cistina	7	241 ± 17	14	234 ± 14
8	Id. más 0.25% D. 1-Metionina	8	190 ± 17	5	212 ± 14
9	Sin proteína 1 día	5	129 ± 12 *	5	111 ± 4
10	Id. 2 días	8	99 ± 6 *	4	97 ± 7
11	Dieta baja en metionina 1 día	12	88 ± 6 *	12	72 ± 2.3*
12	Ayunas 1 día	6	175 ± 7 *	11	151 ± 6 *
13	Id. 2 días	7	175 ± 22	8	165 ± 10

** Diferencia con grupo correspondiente con vitamina B₁₂ estadísticamente significativa.

* Diferencia con grupo control estadísticamente significativa.

Los suplementos de aminoácidos son equimolares.

TABLA N° 12

CONTENIDO DE VITAMINA B₁₂ EN ALGUNOS ALIMENTOS CRIOLLOS

	Vit. B ₁₂ μ g/100 gr.
Sardinas frescas	13.8
Sardinas enlatadas	14.3
Pargo	0.6
Carite	2.2
Carne de res (ganso)	2.2
Hígado de res	153.0
Carne de cochino (paleta)	3.4
Clara de huevo	0.0
Yema de huevo	1.2
Queso blanco	0.8
Leche pasteurizada	0.52
Maíz pilado	0.0
Carotas negras	0.0
Arvejas	0.0
Garbanzos	0.005
Papas	0.0
Yuca	0.0

BIBLIOGRAFIA

- (1) Jaffé, W. G.—Estudios sobre la alimentación en Venezuela. *Rev. Min. S.A.S.* 2, 1.107-1.142 (1943).
- (2) Jaffé, W. G.—A Heat Lable Factor from Liver Active in Growth Stimulation of Rats Fed a Natural Diet. *J. Biol. Chem.* 165, 387-388 (1946).
- (3) Jaffé, W. G.; Elvehjem, C. A.—Fractionation of Growth Stimulating Factor in Liver. *J. Biol. Chem.* 169, 287 (1947).
- (4) Jaffé, W. G.—Sobre un nuevo factor de crecimiento. Trabajo presentado al Cuarto Congreso Suramericano de Química. Santiago de Chile. Marzo de 1948.
- (5) Jaffé, W. G.—Über neue Wuchsstoffe für Ratten, Mäuse und Milchsäurebakterien. *Zeitschrift für Vitamin, Hormon und Fermentforschung* 2, 33 (1949).
- (6) Jaffé, W. G.—Reproduction of Mice Kept on Rations Low in Vitamin B₁₂. *Arch. Bioch.* 27, 2 (1950).
- (7) Jaffé, W. G.—Influencia de dietas con bajo contenido en vitamina B₁₂ sobre la reproducción de ratones. *Acta Cient. Ven.* 2, 2 (1951).
- (8) Jaffé, W. G.—Influence of Cobalt on reproduction of Mice and Rats. *Science* 115, 265-267 (1952).
- (9) Jaffé, W. G.—Efecto de la aureomicina en ratas y ratones deficientes en vitamina B₁₂. *Arch. Ven. Nutr.* 2, 2 (1951).
- (10) Jaffé, W. G.—El Cobalto como microelemento esencial para la reproducción animal y su relación con la vitamina B₁₂. *Arch. Ven. Nutr.* 2, 1 (1951).
- (11) Jaffé, W. G.—Influencia de distintos suplementos dietéticos sobre la reproducción de ratas alimentadas con dietas bajas en vitamina B₁₂. *Arch. Ven. Nutr.* 3, 1 (1952).
- (12) Jaffé, W. G.—Reproducción de ratas alimentadas con dietas bajas en vitamina B₁₂ conteniendo diferentes niveles de nitrógeno. *Acta Cient. Ven.* 3, 6 (1952).
- (13) Jaffé, W. G.—Cobalto en la reproducción de ratones y ratas. Ensayos con dietas altas y proteínas. *Arch. Ven. Nutr.* 3, 2 (1952).
- (14) Jaffé, W. G., y Gómez, O. L.—Recientes adquisiciones sobre la vitamina B₁₂. *Arch. Ven. Nutr.* 5, 1 (1954).
- (15) Jaffé, W. G., y Budowski, P.—Influencia de la dieta sobre la concentración de glutatión en ratones. *Acta Cient. Ven.* 5, 4 (1954).
- (16) Jaffé, W. G.—Reproducción, lactancia, crecimiento y niveles de glutatión en ratones con una dosis baja de vitamina B₁₂. *Arch. Ven. Nutr.* 5, 2 (1954).
- (17) Jaffé, W. G.; Indacochea, N.; Embden, C.—Über den Vitamin B₁₂-Gehalt von Organen verschieden ernährter Ratten. *Rev. Experientia*, 13, 251 (1957).
- (18) Jaffé, W. G.—Die Mindestdosis von Vitamin B₁₂ für die Fortpflanzung von Ratten und der Einfluss der Diät auf den Vitamin B₁₂ - Bedarf. Ferdinand Enke Verlag - Stuttgart (1956).
- (19) Jaffé, W. G.—Requirements of rats for vitamin B₁₂ during growth, reproduction and lactation. *J. Nutr.* 59, N^o 1 (1956).

- (20) Jaffé, W. G.—Einfluss von Vitamin B₁₂ und Schwefelhaltiger Aminosäuren auf den Leberglutathionsgehalt. Ferdinand Enke Verlag - Stuttgart, 311 (1956).
- (21) Jaffé, W. G., y Embden, C.—Nota preliminar sobre la presencia de vitamina B₁₂ en alimentos criollos. Arch. Ven. Nutr. 6, 2 (1955).
- (22) Jaffé, W. G.—Nota preliminar sobre la influencia de factores dietéticos en la fertilidad de ratones y ratas. Arch. Ven. Nutr. 6, 1 (1955).
- (23) Jaffé, W. G.—Influence of Vitamin B₁₂ and Sulfur Amino Acids on Liver Glutathione Level in Mice. Rev. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 97, 665-668 (1958).
- (24) Aschkenasy, A.—Ann. de la Nutrition et de l'Alimentation, 4, 141 (1950).
- (25) Bonsdorff, B. von.—Vitamin B₁₂ and Intrinsic Factor. Edit. F. Enke, Stuttgart, pág. 311 (1956).
- (26) Harrison, R. J.; Booth, C. C., and Mollin, D. L.—Lancet I, 727 (1956).
- (27) Hartman, A. M.; Dryden, L. P., and Cary, C. A.—J. Am. Diet. Assoc. 25, 929 (1949).
- (28) Hoffman, C. E.; Stukztad, E. L. R.; Hutchings, B. L.; Dornbush, A. C., and Jukes, T. H.—J. Biol. Chem. 181, 635 (1951).
- (29) Leaf, G., and Nenberger, A.—Biochem. J. 41, 280 (1947).
- (30) Register, V. D., and Bartlett, R. G.—J. Biol. Chem. 212, 741 (1955).
- (31) Rickes, E. L.; Brink, N. G.; Koninszy, F. R.; Wood, T. R., and Folkers, K.—Science 107, 396 (1948).
- (32) Rohatgi, K.; Bernerjee, M., and Bernerjee, S.—J. Nutr. 56, 403 (1955).
- (33) Smith, E. L.—Nature 161, 638 (1948).
- (34) Underwood, E. J.—Nutr. Abstr. Rev. 9, 515 (1940).
- (35) Wetzel, N. C.; Fargo, W. C.; Smith, I. H., and Helikson, J.—Science 110, 651 (1949).