

ANALES DE LA FACULTAD DE MEDICINA

TOMO XXVII N° 4

LIMA. 4° TRIMESTRE DE 1944

LA POLICITEMIA POR EL COBALTO ACCION DEL ACIDO ASCORBICO

Por **ALBERTO GUZMAN BARRON**

Del Departamento de Bioquímica de la Facultad de
Medicina de Lima.

SUMARIO

PARTE EXPERIMENTAL:

- 1.—La policitemia por el cobalto.
- 2.—El bazo y el extracto hepático en la policitemia por el cobalto.
- 3.—Estudios anatomo-patológicos.
- 4.—Acción del ácido ascórbico en la policitemia por el cobalto.
- 5.—Influencia del cobalto en la respiración celular.

DISCUSION.

- 6.—Mecanismo de la policitemia por el cobalto.
- 7.—Mecanismo de la acción del ácido ascórbico en la policitemia por el cobalto.
- 8.—Bibliografía.

INTRODUCCION

Los estudios de policitemias experimentales tienen doble finalidad; en primer lugar, pueden proporcionar datos de uti-

lidad para interpretar el mecanismo de otras policitemias que se presentan en el hombre; además, contribuyen al mejor esclarecimiento de la función eritropoyética. En nuestro país, la eritremia de la altura, es un problema que interesa profundamente; su mecanismo de producción y las consecuencias para el fisiologismo, han sido muy estudiadas por los Profesores Monge, Hurtado y colaboradores. En nuestra estadía en los Estados Unidos, cuando trabajábamos en los laboratorios de Eleazar Guzmán Barrón, uno de los temas que escogimos como labor de investigación fué la policitemia ocasionada por el cobalto. En esa misma época estudiábamos la oxidación del ácido ascórbico y se discutía sobre el rol de esta vitamina en el mecanismo de la eritropoyesis, razón que nos indujo a investigar la acción que el ácido ascórbico pudiera ejercer en el desarrollo de la policitemia por el cobalto y el estudio del mecanismo íntimo de esta policitemia.

Los resultados de nuestras investigaciones preliminares fueron presentados, en unión de mi hermano Eleazar, a la Sociedad de Biología y Medicina Experimental en una sesión efectuada en la Universidad de Chicago, y fueron publicados en su Boletín (Vol. 35, página 407). A nuestro regreso a Lima, ampliamos nuestras investigaciones, las que no han podido ser publicadas hasta hoy por dos razones : en primer lugar, la enorme dificultad para encontrar datos bibliográficos, pudiendo decirse que a excepción de la Biblioteca del Instituto de Higiene del Ministerio de Salud Pública, no hay cómo conseguir dichos datos. Esta seria dificultad felizmente se solucionará pronto con la actual reorganización de la Biblioteca de la Facultad de Medicina. En segundo lugar, nuestra atención se ha dirigido, en los últimos años, hacia el estudio de la nutrición en nuestro país, tema que hemos considerado mucho más importante; por estas razones no hemos podido cumplir la obligación de presentar a la Facultad de Medicina la tesis para el doctorado, a pesar de que hace como diez años ocupamos la Cátedra de Bioquímica por actitud benévola de los señores catedráticos.

¿ Muchas de nuestras conclusiones han sido confirmadas por diversos investigadores y aún se han aplicado a la Clínica nuestros hallazgos, puramente experimentales, siendo el más reciente el efectuado en Londres por Deeny y colaboradores,

quienes fundándose en la acción depresora que el ácido ascórbico ejerce sobre la policitemia por el cobalto, demostrada por nosotros, trataron con dicha vitamina dos casos de cianosis idiopática familiar con fuerte proporción de meta hemoglobina y policitemia y obtuvieron buenos resultados, retornando a las cifras normales el número de hematíes, reduciéndose notablemente la meta hemoglobinemia y desapareciendo los signos clínicos que acompañan a estas afecciones.

Antes de terminar, debemos expresar nuestro agradecimiento a nuestro asistente en el Laboratorio de Investigaciones, Sr. Juan Angulo Bär por su eficaz auxilio en los trabajos de laboratorio y a la Srta. Clara Arce por la parte mecanográfica de esta publicación.

PRIMERA PARTE

CAPITULO I

CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA ACCION DEL COBALTO EN EL ORGANISMO

En los seres organizados existe cierto número de elementos inorgánicos, en pequeñísima cantidad, cuyo rol fisiológico es casi ignorado. Uno de estos es el cobalto. Su presencia en tierras de cultivo y en las plantas fué demostrada por Bertrand y otros (1, 2, 3, 4).

En el organismo animal (vertebrados e invertebrados), se ha constatado la presencia de cobalto en casi todos los tejidos (5, 6, 7, 8, 9, 10), aunque en ínfima cantidad, lo que ha hecho se sospeche del rol que debe desempeñar en el metabolismo celular. Ya en 1922 se había demostrado que mínimas dosis de cobalto estimulaban el desarrollo de hongos del género *Aspergillus* (11). El papel que desempeña en la nutrición de los animales ha sido bastante estudiado. Le Goff (12), administrando cobalto a perros y conejos, observó que no ejercía influencia desfavorable en el desarrollo, en tanto que Waltner (13) halló efecto contrario y aún pérdida de la fertilidad. Orten y colaboradores (14) observaron que la adición de cobalto al hierro, no surtía efecto favorable en la anemia de las ratas provocada por una dieta láctea exclusiva.

Bertrand (15), estudiando la acción del cobalto en los ratones, sostiene que desempeña papel favorable en la nutrición de estos animales.

Un gran avance, hacia el conocimiento del rol que juega el cobalto en la nutrición animal, fué dado al estudiarse la causa de una enfermedad que se presenta en el ganado lanar y bovino de Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos de N. A., etc.; dicha enfermedad tiene distintas denominaciones, tales como : enfermedad de la costa, enfermedad del arbusto, etc.; se caracteriza por emaciación con anorexia y anemia progresiva. Durante algún tiempo, se pensó que era ocasionada por falta de hierro en los pastos, pero fueron Underwood y Filmer (16), quienes descubrieron que la etiología de este mal era un déficit de cobalto; tal hallazgo ha sido confirmado por numerosos investigadores, quienes además constataron una baja proporción de cobalto en las tierras de cultivo, en el pasto y en los órganos de animales enfermos; por último, consiguieron la prevención y curación de la enfermedad, administrando cobalto (17, 18, 19, 20, 21, 22, 23). Sin embargo, hay autores que sostienen, que no sólo por deficiencia de cobalto se desencadenaría esta enfermedad, sino también el déficit de cobre jugaría rol importante (24); dicen que el efecto benéfico del cobalto se debería a la afinidad que tiene de unirse a ciertos compuestos tóxicos (oximas), a la vez que aumenta el número de hematies; manifiestan que la causa real de la enfermedad sería : intoxicación por hidrógeno cianhídrico (25). En lo que respecta a la cantidad de cobalto que requieren los animales, para prevenirse de este estado patológico, se calcula en un milígramo diario para el carnero, y en 0.6 microgramos para la rata (26, 27, 28). En lo referente al perro, los estudios de Forst y colaboradores (29) parecen demostrar que no existirían estados carenciales por cobalto, aunque constatan que su adición al hierro y cobre en la dieta estimula la hematopoyesis.

El rol que desempeña el cobalto en el organismo humano ha sido poco estudiado, probablemente debido en gran parte a la idea que se tenía de su toxicidad; no obstante, ya en 1930 Le Goff (30) lo utilizaba como un vaso dilatador. Estudios sobre la absorción y eliminación del cobalto, su retención por el hígado para excretarlo luego, han sido realizados por Unters-

teiner (31), y posteriormente por Simeñs (32). La demostración experimental, en animales (conejos y cobayos), de estados cirróticos por efecto del cobalto, ha sido llevada a cabo por Villaret y colaboradores (33). Schultze (34) y Sheldon (35) utilizan el cobalto en los estados anémicos. Kato (36), en estudios realizados tanto en ratas como en niños anémicos, demuestra su eficacia para corregir dichos estados, así como su nula toxicidad cuando se administra en dosis adecuadas. Parece demostrado, que el organismo puede perfectamente soportar dosis diarias de 0.2 a 0.3 grs. (37). La acción hipoglucemiante y benéfica en la diabetes mellitus del adulto y del niño, señalada por Bertrand y colaboradores (6, 38), no ha recibido confirmación posterior (39, 40).

Los estudios experimentales llevados a cabo por nosotros en conejos, utilizando sulfato de cobalto a la dosis diaria de 10 miligramos, durante 4 a 6 semanas, demuestran una moderada disminución del peso corporal al finalizar el experimento, en casi la totalidad de casos, comparados con animales que servían de control, advirtiendo que todos ellos consumían la misma dieta.

ACCION DEL COBALTO SOBRE LOS HEMATIES

La acción que el cobalto ejerce sobre los hematíes, había sido estudiada en 1879 por Azari (41), quien sostuvo que el nitrato de cobalto inflama y luego destruye a los glóbulos rojos.

Stuard (42) niega dicha acción, mientras que Cappole (43) halló que el cobalto ejercía cierta influencia sobre el estado químico de la hemoglobina, pero ninguna sobre el número de hematíes.

Waltner y Waltner (13, 44) demostraron experimentalmente que la ingestión de cobalto por las ratas, ocasionaba aumento del número de hematíes y de la cantidad de hemoglobina, en la sangre de estos animales. Mascherpa (45), utilizando perros sometidos a una dieta láctea o también a sangrías repetidas para producir anemia, constata la acción estimuladora del cobalto en la regeneración de hematíes. Orten y colaboradores (14, 46, 47) estudian la acción del cobalto añadiéndolo a la dieta leche-hierro-cobre que se administra

a las ratas, hallando en estas condiciones, que el cobalto es capaz de aumentar el número de hematíes, hemoglobina, volumen celular; y utilizando el método de Keith Rowentree modificado, indican que la policitemia es verdadera, que hay aumento real del número de hematíes circulantes con incremento del volumen celular, por consiguiente, sin relación a variaciones plasmáticas. Sostienen también que el manganeso ejercería acción estabilizadora en la producción de policitemia por el cobalto (48), punto de vista apoyado por Kleimberg (49), utilizando conejos. La obtención experimental de policitemia por el cobalto, ha sido llevada a cabo en cobayos, ratones y ratas por Sutter (50). Beard y Andes (51), estudiando el papel del cobre como elemento que se debe añadir al cobalto para conseguir aumento del número de hematíes, señalan que por sí solo el cobalto es capaz de producir tal resultado. Brand y Stuky (52), utilizando compuestos orgánicos de cobalto añadidos a la mixtura leche-hierro cobre para ratas anémicas, obtienen resultados semejantes a los obtenidos por autores que emplearon sales inorgánicas. Posteriores estudios (53 a 63), han confirmado la acción hematópoyética del cobalto, sea en animales normales o previamente anemizados.

CAPITULO II

LA POLICITEMIA POR EL COBALTO

METODOS.—En nuestros estudios, los animales de experimentación han sido conejos adultos de ambos sexos, que eran colocados en jaulas aisladas, mantenidos en habitaciones que los resguardaban de ruidos u otras molestias; se les alimentaba con una dieta mixta y completa. La sangre, para las determinaciones hematológicas, se extraía con una jeringuilla, de la vena marginal de la oreja, siendo recibida en tubitos que contenían cantidad adecuada de heparina como anticoagulante; las muestras se tomaban a la misma hora —11 a. m.—. En la sangre extraída se practicaba las determinaciones siguientes: numeración de hematíes y de leucocitos, fórmula leucocitaria, numeración de reticulocitos, dosage de la hemoglobina, volumen globular (hematocrito),

índice icterico y valor globular o índice de color. El método utilizado para la determinación de hemoglobina, en un grupo de experimentos, ha sido el de Wong (63), y en otro, el foto-colorimétrico de Klett-Summerson (64), controlados por el manométrico de Van Slyke (65). Las técnicas utilizadas para las otras determinaciones, han sido las habituales, con pipetas y células controladas por el Bureau Standard de E. U. A. En la coloración de reticulocitos, se ha usado el método seco al azul de cresil brillante, expresándose los resultados en miles por milímetro cúbico.

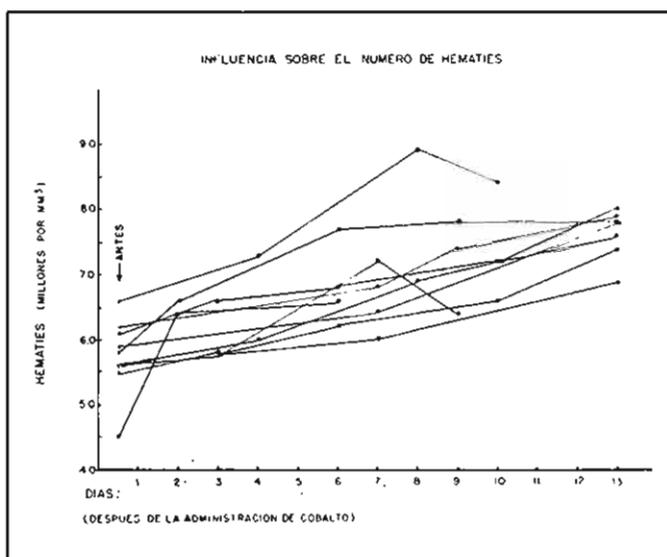
Días antes de iniciar los experimentos, se realizaron varias determinaciones para asegurarnos de una constancia en los datos hematológicos; después se pesaban los conejos, y se empezaba la administración diaria de un centímetro cúbico de la solución acuosa de sulfato de cobalto al 1 %, por vía intramuscular, durante dos semanas, es decir, que diariamente cada conejo recibía diez miligramos de sulfato de cobalto. Por lo común, estos animales soportan bien tales dosis aún por espacio de cuatro semanas, salvo excepciones en que se presentan trastornos diarreicos y desmedro de la salud que acarrearán la muerte del animal. En el hombre, con dosis superiores a 0.30 grs., se ha observado alteraciones semejantes (37).

Para el establecimiento de cifras normales que nos sirvieran de referencia para el cálculo de ciertos índices hematológicos, tomamos los datos obtenidos en los distintos grupos de animales antes de los experimentos y así hemos hallado como promedio normal : para los hematíes 6.310,000 p. mm³., y para la hemoglobina 16.74 grs. %. Los autores que se han ocupado de establecer, estos datos en el conejo, dan cifras variables (66 a 75), por eso hemos preferido utilizar los promedios obtenidos por nosotros.

En esta primera parte de los experimentos, vamos a estudiar la influencia que ejerce el cobalto sobre : el número de hematíes, hemoglobina, reticulocitos, índices hematológicos, leucocitos, fórmula leucocitaria, etc.

INFLUENCIA DEL COBALTO SOBRE EL NUMERO DE HEMATIES

En el cuadro N^o 1 y en la gráfica I, se encuentran los datos que hemos obtenido referentes a las variaciones del número de hematies, en diez conejos que recibían diariamente 10 mgrs. de sulfato de cobalto por vía intramuscular. Consignamos solamente datos de dos semanas, ya que es el tiempo necesario para obtener máxima policitemia, pues si se prolonga la administración por más tiempo, no se observa mayor incremento del número de hematies, que aquel alcanzado den-



GRAFICA I.—Demuestra el incremento de hematies por efecto de la administración diaria de cobalto en 10 conejos de experiencia.

tro de los 12 o 14 días. Se nota, que desde los primeros días el aumento de hematies es apreciable, y en la totalidad de casos la policitemia se desencadena. Es de remarcar, que en algunos casos el número de hematies inicial se encontraba muy por debajo de lo normal, luego administrándoles el cobalto respondían con gran aumento de hematies, por ejemplo : el conejo N^o 2, antes de la administración de cobalto tenía 4.500,000, y a los pocos días del tratamiento se nota un in-

C U A D R O N° 1
INFLUENCIA DEL COBALTO SOBRE EL NUMERO DE HEMATIES

CONEJOS N°	HEMATIES (millones por mm ³ .)									
	Dias después de la administración del cobalto									
	Antes del Cobalto	2	3	4	6	7	8	9	10	13
1	5.5	—	5.8	—	—	7.2	—	—	—	—
2	4.5	6.4	—	—	6.6	—	—	6.4	—	—
3	5.8	6.6	—	—	7.7	—	—	7.8	—	7.8
4	5.9	—	—	—	—	6.4	—	—	—	7.8
5	5.6	—	—	—	—	6.0	—	—	—	6.9
6	5.6	—	—	6.0	—	—	6.9	—	7.2	8.0
7	6.6	—	—	7.3	—	—	8.9	—	8.4	—
8	6.2	—	—	—	—	6.8	—	7.4	—	7.9
9	5.6	—	5.8	—	6.2	—	—	—	6.6	7.4
10	6.1	—	6.6	—	6.8	—	—	—	7.2	7.6

cremento de casi dos millones; en tanto, que cuando la cifra inicial es mayor que lo normal, el alza de hematíes era moderada. En general, dentro de las dos semanas, hay un incremento del número de hematíes que varía entre uno y medio a dos y medio millones. Cuando cesa la administración del cobalto, la cifra de hematíes va descendiendo poco a poco, hasta alcanzar valores cercanos al inicial, o sea antes de la administración del cobalto, esto en los animales que comenzaban con seis millones o más; mientras que cuando aquellas cifras eran menores, no se lograba, al cesar el tratamiento, el retorno a las cifras iniciales, quedándose por encima de ellas, dato muy interesante cuando se trata de aplicar este hallazgo a la terapéutica humana.

En el grupo de animales que servían de control, los que estaban sometidos a igual régimen alimenticio y colocados en condiciones semejantes, no se llegó a observar, durante el mismo período, alteraciones en el número de hematíes.

Si bien es cierto que el incremento del número de hematíes, por efecto del cobalto, tiene una respuesta particular para cada individuo, en resumen podemos afirmar que el aumento del número de glóbulos rojos, observado en la totalidad de los animales, se debe exclusivamente a la acción del cobalto y cuando ésta cesa, al suprimirse la administración, las cifras de hematíes retornan a valores normales.

INFLUENCIA DEL COBALTO SOBRE LA HEMOGLOBINA

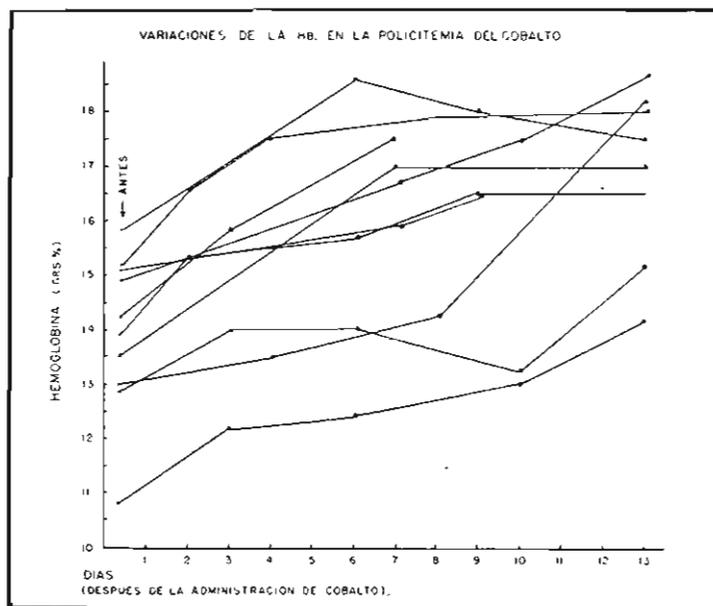
En los mismos conejos, utilizados para el estudio de la acción del cobalto sobre los hematíes, simultáneamente se llevaron a cabo determinaciones de la hemoglobina, cuyos resultados se encuentran en el cuadro N^o 2 y representados en la gráfica II. Observamos que el incremento de hemoglobina es real en todos los casos, desde los primeros días de la administración del cobalto, alcanzando cifras máximas en los días cercanos a la segunda semana, pero el alza no es uniforme en todos; hay pequeñas variaciones de un animal al otro, así en algunos casos el aumento es de 2.40 grs. %, mientras que en algunos alcanza 5.35 grs. %. Por otra parte, en algunos la respuesta es lenta, pero de todos modos, alrededor de la segunda semana el incremento es muy evidente. Cuando cesa

C U A D R O N° 2

VARIACIONES DE LA HEMOGLOBINA EN LA POLICITEMIA POR COBALTO

		HEMOGLOBINA (gramos por 100 cm ³ .)									
		Días después de la administración del cobalto									
CONEJOS N°	Antes del Cobalto	2	3	4	6	7	8	9	10	13	
		1	14.21	—	15.87	—	—	17.55	—	—	—
2	13.94	15.30	—	—	15.70	—	—	16.58	—	—	
3	15.11	16.58	—	—	18.65	—	—	18.08	—	17.55	
4	14.92	—	—	—	—	16.76	—	—	—	18.65	
5	13.58	—	—	—	—	17.05	—	—	—	17.55	
6	13.05	—	—	13.56	—	—	14.25	—	17.55	18.40	
7	15.81	—	—	17.55	—	—	17.92	—	18.08	—	
8	15.22	—	—	—	—	15.96	—	16.58	—	16.58	
9	10.89	—	12.23	—	12.47	—	—	—	13.08	14.25	
10	12.90	—	14.07	—	14.08	—	—	—	13.46	15.29	

la acción del cobalto, la regresión a los valores iniciales se realiza gradualmente. Sucede lo mismo que con los hematíes : cuando se iniciaban los experimentos con cifras bajas de hemoglobina, y luego se administraba cobalto hasta conseguir alza máxima, después al suspender el cobalto, no se lograba alcanzar las cifras iniciales, sino algo mayores. En los animales que servían de control no se llegó a observar variación alguna de la hemoglobina, durante el mismo período de experimentación.



GRAFICA II.—Incremento de hemoglobina, en conejos, por administración diaria de cobalto.

En resumen, la proporción de hemoglobina aumenta en el 100 % de los conejos sometidos a la administración del cobalto.

RELACION ENTRE AUMENTO DE HEMATIES Y HEMOGLOBINA

Con el fin de conocer si el aumento de la hemoglobina corre paralelamente al de los hematíes, hemos utilizado los índices hematológicos que relacionan en forma absoluta estos

C U A D R O N° 3

HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA EN LA POLICITEMIA POR COBALTO

(Valor medio en 23 conejos normales : 25.5 micromicrogramos)

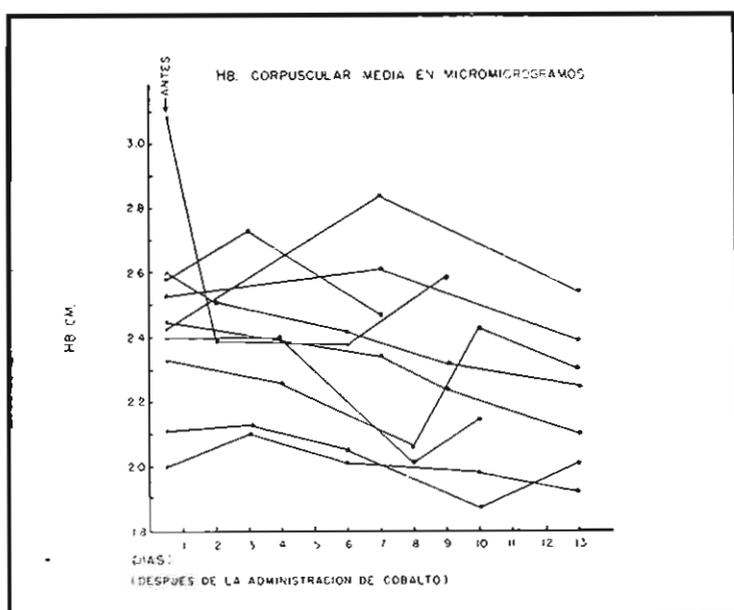
CONEJOS N°	Hemoglobina corpuscular media en micromicrogramos												
	Antes del Cobalto		Dias después de la administración del cobalto										
	2	3	4	6	7	8	9	10	13				
1	25.8	27.3	—	—	24.4	—	—	—	—	—	—	—	—
2	30.0	—	—	23.8	—	—	25.9	—	—	—	—	—	—
3	26.0	25.1	—	24.2	—	—	23.2	—	—	—	—	—	22.5
4	25.3	—	—	—	26.1	—	—	—	—	—	—	—	23.9
5	24.3	—	—	—	28.4	—	—	—	—	—	—	—	25.4
6	23.3	—	22.6	—	—	20.6	—	—	—	24.3	—	—	23.0
7	24.0	—	24.0	—	—	20.1	—	—	—	21.5	—	—	—
8	24.5	—	—	—	23.4	—	—	—	—	—	22.4	—	21.0
9	20.0	21.0	—	20.1	—	—	—	—	—	—	—	19.8	19.2
10	21.1	21.3	—	20.5	—	—	—	—	—	—	—	18.7	20.1

C U A D R O N° 4

INDICE DE COLOR EN LA POLICITEMIA OCASIONADA POR EL COBALTO

N° CONEJOS	INDICE DE COLOR												
	Dias después de la administración del cobalto												
Antes del Cobalto	2	3	4	6	7	8	9	10	13				
1	0.98	1.03	--	--	0.92	--	--	--	--	--	--	--	
2	1.15	--	--	0.90	--	--	0.95	--	--	--	--	--	
3	0.98	--	--	0.91	--	--	0.88	--	--	--	0.82	--	
4	0.97	--	--	--	1.00	--	--	--	--	--	0.90	--	
5	0.92	--	--	--	1.07	--	--	--	--	--	0.92	--	
6	0.88	--	0.85	--	--	0.78	--	0.92	0.87	--	--	--	
7	0.90	--	0.91	--	--	0.77	--	0.81	--	--	--	--	
8	0.93	--	--	--	0.88	--	0.85	--	0.78	--	--	0.73	
9	0.74	0.79	--	--	0.75	--	--	0.75	0.73	--	--	--	
10	0.80	0.81	--	0.78	--	--	--	0.70	0.76	--	--	--	

dos valores, expresando los pesos medios de hemoglobina por hematíes y el llamado índice de color o valor globular; en realidad, ambos índices aportan datos similares y cuyo resumen se encuentra en los cuadros N° 3, N° 4 y en la gráfica III; para el cálculo del valor de hematíes y hemoglobina con relación a lo normal y expresado en tanto por ciento, se han utilizado los datos que aparecen en los cuadros N° 5 y N° 6, preparados de acuerdo a cifras medias de hematíes y hemoglobina en conejos normales.



GRAFICA III.—Variaciones que se producen en la hemoglobina corpuscular media por efecto de administración diaria de cobalto. (Experimentos con 10 conejos).

Con el auxilio de estos recursos, observamos que no hay estrecho paralelismo entre el incremento de los hematíes y el de la hemoglobina, aunque las diferencias son muy pequeñas, y a veces no existe variación; el alza de la hemoglobina es menor que el de los hematíes en 70 % de los casos, mientras que en el 30 % restante no hay tal variación al finalizar los experimentos. Por consiguiente, podemos decir que la administración de cobalto ocasiona ligera tendencia hacia la hipocromía. Es de advertir que en la policitemia vera y

C U A D R O N° 5

HEMATIES — % DE LO NORMAL — EN LA POLICITEMIA POR COBALTO

HEMATIES en % de lo normal

CONEJOS N°	Antes del Cobalto	Días después de la administración del cobalto												
		2	3	4	6	7	8	9	10	13				
1	87	—	92	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	71	101	—	—	104	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	92	103	—	—	122	—	—	—	—	—	—	—	—	123
4	93	—	—	—	—	101	—	—	—	—	—	—	—	123
5	88	—	—	—	—	95	—	—	—	—	—	—	—	109
6	88	—	—	95	—	—	—	—	109	—	—	—	—	126
7	104	—	115	—	—	—	—	—	140	—	—	—	—	—
8	98	—	—	—	—	108	—	—	—	—	—	117	—	125
9	88	—	92	—	98	—	—	—	—	—	—	—	104	117
10	96	—	104	—	108	—	—	—	—	—	—	—	114	120

Promedio de hematies en 23 conejos normales : 6.31 mill. p. mm³.

C U A D R O N° 6

HEMOGLOBINA — % DE LO NORMAL — EN LA POLICITEMIA POR COBALTO

CONEJOS N°	HEMOGLOBINA en % de normal											
	Antes del Cobalto	Dias después de la administración del cobalto										
		2	3	4	6	7	8	9	10	13		
1	85	—	—	—	—	105	—	—	—	—	—	—
2	82	91	—	94	—	—	—	—	—	—	—	—
3	90	99	—	111	—	—	—	—	—	—	—	105
4	90	—	—	—	—	100	—	—	—	—	—	111
5	81	—	—	—	—	102	—	—	—	—	—	105
6	78	—	81	—	—	—	85	—	—	—	—	110
7	94	—	105	—	—	—	108	—	—	—	—	—
8	91	—	—	—	—	95	—	—	—	—	99	—
9	65	73	—	74	—	—	—	—	—	—	—	85
10	77	84	—	84	—	—	—	—	—	—	—	80

(Promedio de Hb. en 23 conejos normales : 16.74 grs. p. 100 cm³.)

otras, el aumento de hematíes no corre paralelo al de hemoglobina, existiendo ligera disminución de estos índices, es decir, tendencia a la hipocromía.

INFLUENCIA DEL COBALTO SOBRE LA LEUCOCITOSIS

Prosiguiendo nuestros estudios, en los mismos animales utilizados para la policitemia por cobalto, se llevaron a cabo determinaciones de los leucocitos para observar las variaciones cuantitativas y cualitativas que pudieran presentarse. Una primera dificultad radica en la diversidad de cifras que como normales dan algunos autores (60 a 75). Nosotros, en los diez conejos estudiados, encontramos valores que oscilan entre 6,000 y 14,500 leucocitos por mm³., es decir, antes de la administración de cobalto, tal como puede apreciarse en el cuadro N^o 7.

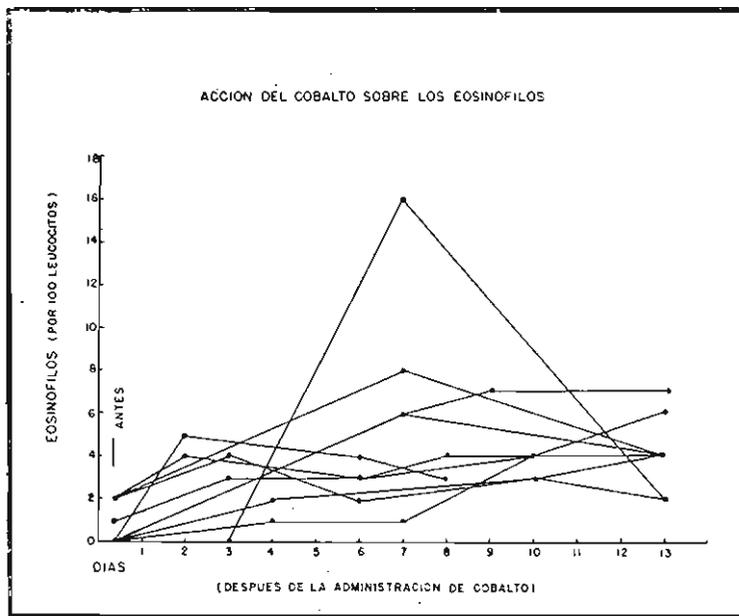
La acción del cobalto sobre los leucocitos en manos de diversos investigadores ha dado resultados discordantes, dependientes muchas veces de la especie animal utilizada; así Sutler (50) no halla variaciones apreciables en ratas y en cobayos, en tanto que la rana presenta una leucocitosis apreciable después de la administración de cobalto. Otros (14, 46) no encuentran variaciones en la rata. Kleimberg (49) señala resultados variables en los conejos, y Nicastro (76) halla leucocitosis apreciable.

En el cuadro N^o 7 están consignados los resultados que hemos obtenido de la acción del cobalto sobre el número de leucocitos. Observamos que no hay respuesta uniforme; así, mientras en algunos se produce una moderada leucocitosis, en otros se presenta ligera leucopenia, y por último, en cierto número de casos no existe variación apreciable, durante los días de experimentación. Es de advertir que las muestras de sangre se tomaban en las mañanas, a la misma hora, tanto antes como durante la administración del cobalto, para eliminar así las influencias extrañas que pudieran alterar el número de leucocitos.

En resumen, podemos decir que el cobalto no ejerce influencia sobre la cifra de leucocitos de la sangre circulante, por lo menos, en los conejos que son animales de experimentación utilizados por nosotros.

LA EOSINOFILIA POR EFECTO DEL COBALTO

Las alteraciones que experimenta la fórmula leucocitaria por acción del cobalto, han sido estudiadas por los autores indicados anteriormente, y en general, los datos no son concluyentes; así, mientras algunos señalan monocitosis, otros hallan linfocitosis, pero casi todos ellos han constatado eosinofilia. Los estudios llevados a cabo por nosotros, revelan que efectivamente las variaciones de neutrófilos, monocitos y linfocitos no son apreciables, en tanto que la eosinofilia se



GRAFICA IV.—Demuestra, en conejos, el incremento de la eosinofilia por efecto de administración diaria de cobalto.

presenta en la totalidad de casos tal como puede verse en la gráfica IV, donde se observa que desde los primeros días la eosinofilia hace su aparición y se acentúa posteriormente; en la mayoría de casos, las cifras apenas alcanzan el 6 % de eosinófilos, aunque un caso logra el 16 % y luego desciende al 2 %.

En resumen, los conejos presentan eosinofilia constante y moderada por acción del cobalto administrado.

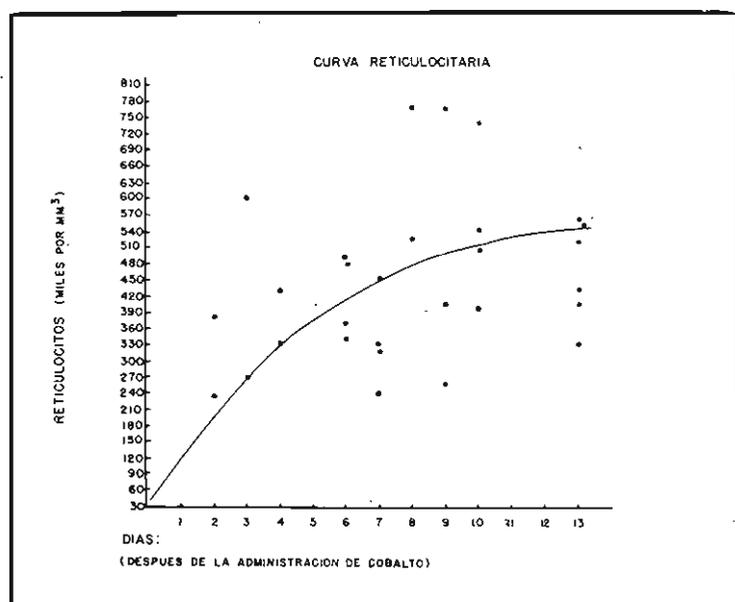
La interpretación de la eosinofilia es bastante difícil, ya que la misma función de los eosinófilos en el organismo es desconocida, así mismo se desconoce el mecanismo que explique su incremento por efecto de una serie de procesos de diverso origen. Kirk (77) sostiene que la eosinofilia tiene siempre una base alérgica; pero lo cierto es que una serie de autores (78, 79, 80, 81, 82, 83) han señalado eosinofilia con la llegada al organismo de sustancias simples, no proteicas, como el alcanfor, el fósforo, el cobre, el mercurio, etc. y también por efecto de estados de asfixia parciales. Estudios recientes de Landsteiner (84) demuestran que sustancias simples pueden ser convertidas en alérgenos o antígenos cuando se unen a proteínas del propio organismo. La fácil unión del cobalto a ciertas proteínas del organismo es evidente (véase Capítulo III), y así nos es factible admitir que tal sería el mecanismo por el cual se explica la eosinofilia ocasionada por administración de cobalto. Es también verdad que en la policitemia vera y otras existe una moderada eosinofilia.

INFLUENCIA DEL COBALTO SOBRE LOS RETICULOCITOS

El estudio de las alteraciones morfológicas del hematíe circulante, es un medio excelente para investigar el grado de actividad de la médula ósea. Entre estas alteraciones, la más frecuente e importante, es la reticulocitosis. En condiciones fisiológicas normales la proporción de reticulocitos es reducida, tanto en el hombre como en los animales, pero puede aumentar debido a una serie de factores, indicando por lo general una hematopoyesis acelerada. En algunos estados patológicos, la reticulocitosis es la respuesta a ciertos estímulos representados por sustancias que hacían falta para una adecuada elaboración de hematíes, así, se observa reticulocitosis en la anemia perniciosa, en las anemias por déficit de hierro; en el primer caso previa administración de extracto hepático, y en el segundo la de hierro. En estados hemorrágicos también es posible el aumento de reticulocitos, pero siempre que exista material adecuado para la producción de hematíes. Pero en tanto que suben los hematíes, el número de reticulocitos baja, salvo en ciertos casos con destrucción crónica de eritrocitos como sucede en la anemia hemolítica congénita de larga

duración. La reticulocitosis elevada puede presentarse no solo en estados anémicos, sino también cuando el número de hematíes es normal, debido a la acción, sobre la médula ósea, de ciertas sustancias químicas como el arseniato de potasio, cuyo mecanismo verdadero se desconoce (85).

Por consiguiente, la reticulocitosis no siempre es una respuesta ordenada, específica y necesaria para el organismo. Cuando el aumento de reticulocitos es pequeño, no tiene influencia apreciable en el alza de elementos rojos de la san-

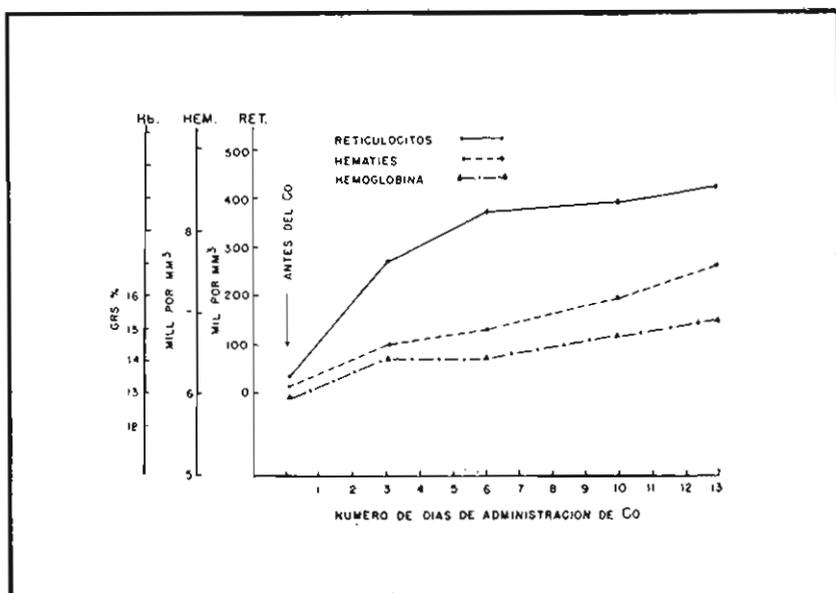


GRAFICA V.—Demuestra, en conejos, el aumento de reticulocitos por administración diaria de cobalto. La curva representa la media dinámica del incremento de reticulocitos en 10 conejos de experiencia.

gre circulante. En ciertos casos, el número de células y hematíes inmaduros puede ser muy grande en la médula ósea, debido a la acción de determinadas sustancias irritantes del tejido eritroblástico, lo que puede causar la salida a circulación, de reticulocitos y hasta de elementos nucleados de la serie roja.

El estudio de la reticulocitosis en la policitemia por el cobalto, ha sido efectuado por algunos investigadores, ya ci-

tados en el Capítulo I; algunos consideran útil su investigación para apreciar el grado de hematopoyesis en esta clase de experimentos (86). Nosotros hemos realizado tal estudio, como complemento a las otras investigaciones efectuadas en los mismos animales que se utilizaron para la determinación de hematíes, hemoglobina, etc.; de tal modo, que para lo referente a detalles de los experimentos nos remitimos a la primera parte de este Capítulo. El número de reticulocitos lo hemos expresado en miles por milímetro cúbico de sangre,



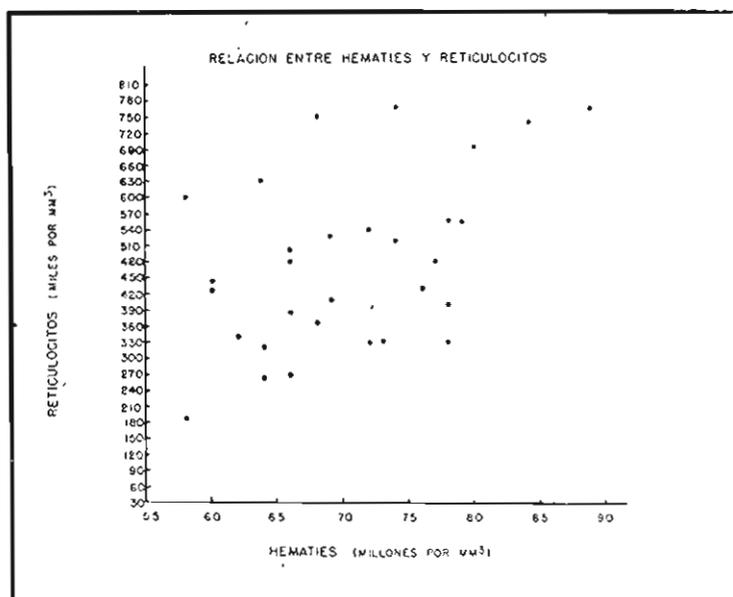
GRAFICA VI.—Relación que guardan entre sí las variaciones de reticulocitos, hematíes y hemoglobina por efecto de la administración de cobalto en conejos.

porque así apreciamos mejor las variaciones cuantitativas. Previamente se determinaron los valores normales.

En el cuadro N^o 8 y en la gráfica V están resumidos nuestros datos. Se observa, que desde los primeros días de la administración de cobalto, el incremento de reticulocitos es muy apreciable, a tal extremo que nosotros lo utilizamos, en el Laboratorio, como un medio para la enseñanza, pues bastan dos inyecciones de diez miligramos de sulfato de cobalto

al conejo, o cantidades menores a la rata, para obtener una buena proporción de reticulados en la sangre circulante.

En los primeros días de administración del cobalto, cuando el aumento de hematíes aún es discreto, la reticulocitosis se halla ya acentuada, para luego, en los días subsiguientes, correr casi paralelamente a los hematíes, tal como puede apreciarse en la gráfica VI, que representa el incremento de hematíes, hemoglobina y reticulocitos; se vé la curva de los reticulocitos que tiene un ascenso más acentuado que en los hematíes.



GRAFICA VII.—Indica la relación que guardan entre sí las variaciones de reticulocitos y hematíes, durante la policitemia desencadenada en conejos por efecto del cobalto.

y éste mayor que la hemoglobina. Sin embargo, no siempre se encuentra una relación tan estrecha. La gráfica VII representa la relación entre aumento de reticulocitos y hematíes en la policitemia por cobalto, que corresponde a los diez conejos; observamos que los reticulocitos aumentan en mayor proporción que los hematíes.

La reticulocitosis alcanza, en ciertos casos, cifras considerables, cerca de un millón por mm³. Esta elevación persiste durante el tiempo en que los conejos reciben cobalto; cuan-

do cesa tal administración, las cifras disminuyen paulatinamente.

LOS NORMOBLASTOS EN LA POLICITEMIA POR EL COBALTO

Kleinberg (49), en conejos policitémicos por el cobalto, a partir de la segunda semana, había constatado en la sangre circulante ciertas alteraciones cromáticas de los hematíes, y la presencia de normoblastos en división. Los investigadores que se han ocupado de esta policitemia en otros animales, señalan la frecuencia con que se presentan alteraciones de los hematíes, tales como punteado basófilo, policromasia y aparición de elementos nucleados de la serie eritrocítica, aumento de reticulocitos que ya hemos estudiado.

En nuestros experimentos, ha sido posible constatar la presencia, sobre todo, de normoblastos ortocromáticos, en la sangre circulante de los conejos policitémicos, siendo su aparición precoz en unos, y algo tardía en otros, pero siempre constante dentro de las dos semanas que duraban los experimentos. En el cuadro N^o 9 se consignan los resultados obtenidos; los normoblastos se han expresado en miles por mm³. Se observa, en la mayoría de casos, que el incremento de los normoblastos es progresiva, de acuerdo al grado de policitemia; pero, en otros, la relación no es tan estrecha, para lo que basta hacer la comparación con los datos del cuadro N^o 1, que corresponde a los mismos conejos.

Respecto a la magnitud de la normoblastosis, se observa que en algunos casos es moderada, mientras en otros alcanza cifras considerables.

Es indudable, que estas alteraciones corresponden a una hiperactividad de la médula ósea, que permite la salida de células inmaduras a la circulación general, representando la normoblastosis, en este caso, un esfuerzo menos fisiológico y ordenado, si lo comparamos con la reticulocitosis. En los estudios histopatológicos de la médula ósea, que luego describiremos, se observa que la hiperactividad medular es sobre todo de la serie normoblástica, sin sufrir mayores alteraciones la serie mieloide; y ya hemos indicado en lo que respecta a los leucocitos, que la influencia del cobalto es casi nula, así co-

CUADRO Nº 9

NORMOBLASTOS CIRCULANTES POR INFLUENCIA DEL COBALTO

		NORMOBLASTOS (miles por mm ³ .)									
		Días después de la administración del cobalto									
CONEJOS Nº	Antes del Cobalto	2	3	4	6	7	8	9	10	13	
1	0	—	58	—	—	288	—	—	—	—	—
2	0	0	—	—	198	—	—	192	—	—	—
3	0	132	—	—	539	—	—	156	—	—	156
4	0	—	—	—	—	64	—	—	—	—	156
5	0	—	—	—	—	60	—	—	—	—	69
6	0	—	—	0	—	—	69	—	72	160	160
7	0	—	—	0	—	—	178	—	84	—	—
8	0	—	—	—	—	136	—	296	—	395	395
9	0	—	58	—	62	—	—	—	132	74	74
10	0	—	66	—	136	—	—	—	144	152	152

mo la imposibilidad de hallar en la sangre circulante elementos jóvenes de esta serie.

LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS EN LA POLICITEMIA POR EL COBALTO

La determinación de las proteínas en el plasma sanguíneo, es un recurso que nos permite medir en general los estados de deshidratación del organismo, los que van acompañados de una baja del volumen sanguíneo y plasmático, pérdida del peso corporal, alza relativa de hematíes, hemoglobina y hematocrito. En estas circunstancias, como sólo ha habido pérdida de agua y sales inorgánicas, en especial cloruro de sodio, la proporción de proteínas aumenta en forma marcada. Es bien sabido, que dichos estados, pueden ser producidos por múltiples causas, entre las que se citan la introducción al organismo de sustancias tóxicas que ocasionan diarreas, vómitos, sudores, etc., originando pérdida de líquidos del organismo. En el caso de la administración de cobalto, sólo a altas dosis se han señalado los trastornos indicados; sin embargo, cuando la administración se prolonga por 4 o más semanas, es frecuente observar diarreas profusas, como lo hemos indicado anteriormente. Es cierto que en la policitemia por el cobalto, se ha demostrado aumento real del volumen sanguíneo, con aparición de elementos jóvenes de la serie roja, caracteres éstos que no existen en los estados de deshidratación y anhidremia; con todo, hemos creído conveniente que la determinación de las proteínas plasmáticas, nos podría dar una prueba más para asegurar que los datos hematológicos hallados, no corresponden a tales circunstancias. Por otra parte, los estados de anhidremia son siempre pasajeros, ya que el fluido extracelular, que encierra el más alto porcentaje de agua en el organismo, es capaz de reponer el volumen sanguíneo; aún más si se tiene en cuenta en estas condiciones, que al perder agua el plasma la presión oncótica aumenta.

La determinación de las proteínas plasmáticas las llevamos a cabo en ocho conejos sometidos al tratamiento por cobalto. En el cuadro N^o 10 se hallan los resultados obtenidos. Observamos que la cifra media de proteínas, antes de

la administración del cobalto, es de 5.81 gr. %; a los diez días, cuando la policitemia se va acentuando, alcanza a 5.83 grs. %; a las dos semanas, es decir cuando la policitemia se ha estabilizado, las proteínas llegan a 6.01 grs. %. Si se observan las cifras aisladamente, se nota que en algunos no existe la pequeña variación señalada en los promedios, en tanto que en otros se ve muy ligero y casi imperceptible incremento.

CUADRO N° 10

LA PROTEINEMIA EN LA POLICITEMIA POR COBALTO

CONEJOS N°	PROTEINAS PLASMATICAS (grs. p. 100 cm ³ .)		
	Antes del Co	Dias después de administrar Co	
		10	14
1	5.85	5.83	5.83
2	5.52	5.54	6.00
3	5.20	5.25	5.20
4	5.83	5.90	5.90
5	5.60	5.42	5.65
6	6.12	6.41	6.70
7	5.94	5.83	5.94
8	6.41	6.58	6.90
Promedios :	5.81	5.85	6.01

En verdad, existe un ligerísimo aumento de las proteínas plasmáticas en el curso de la policitemia por el cobalto, pero de ningún modo podemos tener razón para pensar que nos encontramos frente a estados de anhidremia o deshidratación, ya que en estas condiciones el incremento de proteínas sería muy marcado, es decir, alcanzaría a 7 y 8 grs. %. En nuestros experimentos, la diferencia entre el promedio inicial, y el décimo día de tratamiento es de 0.02 grs. %, valor tan pequeño que puede considerarse como cero; a las dos semanas de la administración del cobalto, la diferencia es de 0.18 grs. %, cifra también muy baja que no se presta a mayores consideraciones.

Los resultados obtenidos, nos permiten concluir diciendo que la policitemia por el cobalto no es ocasionada por estados de anhidremia o concentración plasmática, ya que se podía pensar en el posible efecto tóxico del cobalto.

OTRAS INVESTIGACIONES

También hemos llevado a cabo una serie de investigaciones hematológicas complementarias, cuyo resultado final será materia de una publicación posterior, tanto porque en algunos falta mayor número de casos, como porque su interpretación está en estudio. Pero sí podemos señalarlos sin mayores comentarios.

El estudio del volumen globular por el hematocrito, utilizando micro-hemopipetas de Kato, nos revela aumento de las cifras en forma progresiva, de acuerdo con el grado de policitemia. El diámetro de los hematíes también aumenta progresivamente, durante la administración del cobalto. Con estos datos estamos en condiciones de estudiar todas las constantes hematológicas según Wintrobe. La determinación de la bilirrubinemia, en casos de policitemia por cobalto en conejos, indica que en ningún momento la reacción de Van den Bergh se hace positiva (reacción directa e indirecta); el índice icterico no sufre alteraciones. En su oportunidad estudiaremos detenidamente estos hallazgos y les daremos la interpretación que juzguemos adecuada.

CAPITULO III

EL BAZO EN LA POLICITEMIA POR COBALTO

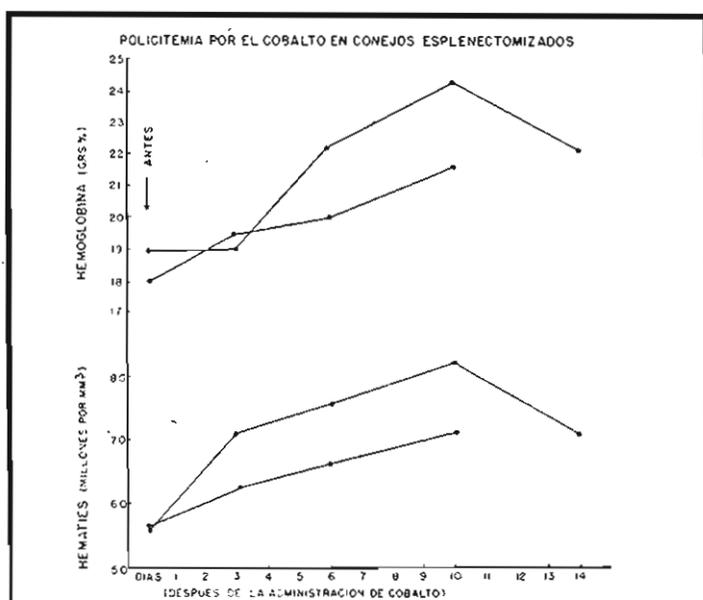
Uno de los problemas discutidos en hematología, es el relacionado con la función que desempeña el bazo en la formación de hematíes. Hay quienes piensan que el bazo ejercería una acción inhibitoria sobre la médula ósea, pero la anemia que se presenta luego de extirparlo, va acompañada de hematíes jóvenes, lo que haría suponer de algún papel que desempeñaría el bazo en la perfecta maduración de glóbulos rojos (87). Estudios realizados por Cruz y colaboradores (88) parecen confirmar esta última idea, observándose que la nor-

moblastosis en ratas anemizadas por carencia de hierro, es más notable en las esplenectomizadas; así mismo, estos hematíes nucleados, aumentan con mayor intensidad en casos humanos que se acompañan de alteraciones esplénicas. Barcroft y otros (89) han sostenido que el bazo, en ciertos animales (perro, caballo, gato), sería un reservorio de hematíes para satisfacer necesidades pasajeras, pero no así en el hombre. En realidad, parece que otros tejidos, en especial el linfoide, podrían suplir la función del bazo, cuando éste no existe o se le extirpa; así, en la literatura médica se constata, como hecho extraordinario, el caso indicado por nuestro Prof. el Dr. Max Gonzales Olaechea (90) de un paciente fallecido de tífus exantemático, y que a la autopsia se constató ausencia del bazo e hipertrofia del tejido linfoide. En conejos, la extirpación de este órgano trae consigo semejante transformación, sin mayor alteración de la médula ósea (91).

Por lo que antecede, nos encontramos ante un punto difícil, puesto que la vida se hace posible aún en ausencia del bazo, que su función en la hematopoyesis no está definida, aunque su rol antifeccioso parece probable de acuerdo con estudios de Perla (91), haciendo resaltar el hecho de que el bazo jugaría rol importante en la utilización del cobre por el organismo. Otros autores (92, 93) han confirmado este punto de vista; parece que el cobre facilitaría el depósito de hierro en el bazo, que el hierro por acción del cobre sería más fácilmente utilizado para la formación de hemoglobina, y que el hierro resultante de la destrucción de hematíes iría entonces al bazo (94); la extirpación del bazo, según Asher y Smith (91), traería aumento del depósito del hierro en el hígado así como de su excreción, aunque en los conejos, Lauda (91) no halla tal aumento de eliminación.

En lo referente a la relación del bazo con los síndromes policitémicos, debemos citar los trabajos de Cannon e Izquierdo (95), quienes sostuvieron que los estímulos emocionales, que la adrenalina y los estimulantes del simpático, hacen contraer el bazo liberando hematíes; esto en ciertos animales, pero no en el hombre (96). Lamson (97) había demostrado, hace muchos años, que en la policitemia ocasionada por la adrenalina, el bazo no jugaba rol alguno, ya que en los animales esplenectomizados los resultados eran similares, cre-

yendo por esto que el hígado sería el que actuaba como reservorio de hematies. Barcroft y otros (98, 99) señalan que la policitemia producida por varios agentes (adrenalina, baja tensión de oxígeno, etc.), era de menor grado en los animales esplenectomizados. Recientemente, este discutido punto, ha sido estudiado por Bock y Frenzel (100), quienes por ligadura de las venas esplénicas lograron baja de hematies, leucocitos y plaquetas. Llegando a recomendarlo en la policitemia vera, aunque desde hacía varios años, la esplenectomía había dado resultados desastrosos en dicha enfermedad (101).



GRAFICA VIII.—Demuestra que el incremento de hemoglobina y hematies, por efecto de administración diaria de cobalto en conejos, no es influenciado por la esplenectomía.

Sobre el papel que pudiera desempeñar el bazo en la policitemia por el cobalto, debemos señalar los experimentos de Bernald (102), quien empleando ratas, observó que la policitemia se presentaba solamente en algunos casos mientras en otros aparecía anemia. Orten, citado por Perla (91), sostiene que la esplenectomía puede retardar la aparición de la policitemia por el cobalto, pero no la impide, salvo en las ratas que presentaban *Bartonella muris* en los hematies, las

C U Á D R O N° 11

ACCIÓN DEL CÔBALTÓ SOBRE LOS HEMATIES Y HEMOGLOBINA, EN CONEJOS ESPLENECTOMIZADOS

CONEJOS N°	HEMATIES (millo. p. mm ³). HEMOGLOBINA (grs. p. 100 cm. ³)												
	Antes del Cobalto		Dias después de la administración del cobalto									Hb.	
	Hm.	Hb.	3			6			10				14
Hm.	Hb.	Hm.	Hb.	Hm.	Hb.	Hm.	Hb.	Hm.	Hb.	Hm.	Hb.	Hm.	Hb.
1	5.65	18.95	7.20	19.05	7.63	22.22	8.40	24.24	7.16	22.12			
2	5.72	17.97	6.44	19.47	6.72	20.00	7.24	21.62	—	—			

que hacían cuadros anémicos. Por ser la rata un animal que previa extirpación del bazo presenta anemia por Bartonella muris, resulta difícil la interpretación de los resultados obtenidos en esta clase de experimentos. Por tal razón, hemos creído conveniente utilizar conejos a fin de observar si la esplenectomía era capaz de inhibir la aparición de la policitemia por cobalto, ya que de esta manera obtendríamos un indicio del rol que juega este órgano en los fenómenos de hematopoyesis. Con tal finalidad, se procedió a la esplenectomía de los conejos, y luego de una observación hematológica hasta lograr estabilizar el número de hematíes y cantidad de hemoglobina para descartar la ligera anemia que sobrevie-

CUADRO N° 12

LEUCOCITOS EN LA POLICITEMIA POR EL COBALTO. DE CONEJOS ESPLENECTOMIZADOS

		LEUCOCITOS (miles por mm ³ .)			
CONEJOS N°	Antes del Co	Días después de administrar el Cobalto			
		3	6	10	14
1	8.0	11.5	12.0	8.0	16.0
2	6.5	7.5	7.0	8.5	8.5

ne después de estas intervenciones quirúrgicas, administramos el cobalto de igual manera que en los experimentos anteriores. Nuestros resultados se encuentran en el Cuadro N° 11 y en la gráfica VIII. Al comparar las curvas de hematíes y de hemoglobina con aquellas obtenidas en animales con bazo (gráficas I y II), notamos que en realidad no existen diferencias en la respuesta, y que la policitemia se desencadena en ambos casos; por consiguiente, podemos decir que la esplenectomía no ha interferido en lo absoluto la acción del cobalto. En los conejos no se ha demostrado la aparición de bartonellas después de la extirpación del bazo, y esta es la razón por la que los resultados son más ostensibles y apreciables.

Estos estudios nos llevan a descartar, una vez más, cualquier rol que se quiera asignar al bazo en la producción de la policitemia por cobalto.

En lo que respecta a las alteraciones de los leucocitos, en los conejos esplenectomizados (cuadro N^o 12), se observa alza de estos elementos, marcada en un caso y moderada en el otro; pero, como hemos dicho en otra oportunidad, estas variaciones pueden corresponder a las fisiológicas, ya que no son de tal magnitud como para pensar en una influencia efectiva del cobalto sobre los leucocitos. Sabemos también que la extirpación del bazo provoca hiperplasia del tejido linfoide, y la elevación moderna que se observa puede ser una manifestación que acompaña a dicha hiperplasia en su inicio.

CAPITULO IV

ACCION DEL EXTRACTO HEPATICO EN LA POLICITEMIA POR EL COBALTO

En 1926 Minot y Murphy (103) demostraron el efecto benéfico que la administración de hígado ejercía en el tratamiento de la anemia perniciosa; desde entonces se han sucedido una serie de investigaciones, que revelan la importancia de este método curativo en otras anemias macrocíticas, especialmente en las que se originan por carencia del factor intrínseco de Castle. El tratamiento a base de hígado en otros tipos de anemia, nunca ha dado resultados satisfactorios. En sujetos normales se ha estudiado también la acción de preparados hepáticos; así, Watking (104) obtiene ligeros estados de policitemia, mientras que otros investigadores (105, 106, 107) señalan efectos pasajeros o negativos. Stephan (108) emplea hígado en ciertos estados de policitemia y poliglobulia sintomáticos, logrando disminución de los hematíes y hemoglobina hasta alcanzar valores normales, sosteniendo que el hígado contendría un principio activo, el cual ejercería acción inhibitoria sobre la hematopoyesis exagerada. Su empleo en la policitemia vera dió resultados negativos en manos de Mayor (109). Años antes, Hanson y Marshall (110) habían demostrado, que el extracto de hígado era capaz de hacer disminuir el número de hematíes en las ratas policitémicas por el sulfato de cobalto, no encontrando igual acción

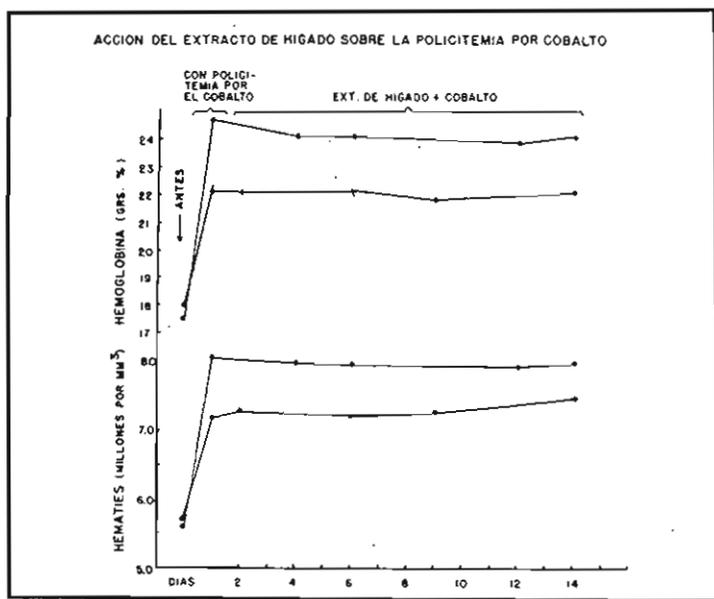
cuando empleaban hígado fresco; mientras tanto, Anderson y colaboradores (11) sostienen que la adición de hígado (extracto o polvo) a la leche interviene en el mantenimiento de la policitemia. Davis (112, 113, 114, 115), en la misma clase de policitemia, pero empleando perros a los que además administraba hígado de cerdo a razón de 75 grs. por día, había conseguido una reducción del número de hematíes en el espacio de dos a cuatro días; semejante efecto había obtenido también con el extracto hepático (0.5 cm.³ equivalente a 165 grs. de hígado fresco). Este autor sostiene que existía una hormona diferente del principio antianémico, capaz de inhibir la exagerada actividad hematopoyética de la médula ósea, y, que igual facultad de inhibir ejercerían también algunos derivados de la colina, especialmente el clorhidrato de colina, el nitrito de sodio, no sólo en la policitemia por cobalto, sino también en la ocasionada por bajas presiones barométricas; el autor cree que esta acción inhibidora sería consecuencia de una vasodilatación en la médula ósea, lo que permitiría un mayor aporte de oxígeno. El empleo de la colina o del hígado, en pacientes con policitemia vera, ha dado resultados negativos (116).

La afinidad del cobalto por el tejido hepático ha sido demostrada por varios investigadores (117, 118), quienes sostienen que el cobalto se uniría a las proteínas hepáticas, y además se favorecería su eliminación por la bilis y por la orina (*). Esta demostración podría en parte explicar el posible efecto depresor de los preparados hepáticos en la policitemia por cobalto.

Pero realmente, hay datos contradictorios en lo referente al modo de acción del extracto hepático en la policitemia por cobalto, si bien es cierto que su poder nulo frente a la

(*) Los estudios de Greenberg y colaboradores, han demostrado que una de las vías de eliminación del Co es la orina. Posteriormente Ccpp y Greenberg (Nat. Acad. Sci., Vol. 27 : 448; 1941) señalan : que cuando se administra Co por vía oral, solo en parte es absorbido por el tracto digestivo, pues la otra se excreta con las heces. La porción que se absorbe es fijada por el hígado en gran proporción, lo que hace sospechar de algún rol importante que debe desempeñar este órgano. Su eliminación se realiza por la bilis y la orina. Cuando se le administra por vía parental suceden fenómenos semejantes de fijación y se elimina por las mismas vías indicadas.

policitemia vera no admite discusión. Por estas razones hemos practicado algunos experimentos, utilizando conejos, ya que estos animales aún no se han ensayado en estudios de tal naturaleza. Nuestros trabajos se dirigieron hacia dos finalidades : primero, ver si el extracto hepático, una vez producida la policitemia por el cobalto, era capaz de hacer disminuir el número de hematíes; y segundo, observar, si adminis-

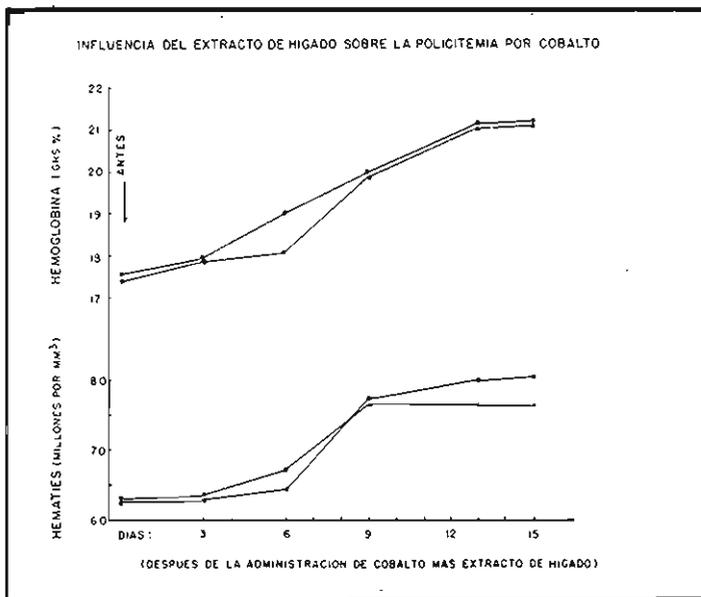


GRAFICA IX.—El extracto hepático no altera el curso de la policitemia por cobalto. se observa que tanto la Hb como los hematíes se mantienen al mismo nivel antes y después de la administración de extracto hepático, en conejos previamente hechos policitémicos por cobalto.

trando hígado más cobalto, se lograba impedir la aparición de la policitemia.

I. El cobalto era inyectado en las mismas condiciones que cuando realizamos los experimentos anteriores y se llevaban a cabo determinaciones hematológicas hasta conseguir la policitemia, para en ese momento iniciar la diaria administración de extracto hepático Lilly (1 cm.³ igual a una Unidad, de acuerdo con las especificaciones de la U. S. Pharm. Antianemic Preparation and Advisory Board (119)) a la vez que se continuaba administrando el sulfato de cobalto. En la

gráfica IX consignamos los resultados obtenidos. Se observa que la cifra de hematíes, en la primera y segunda parte de los experimentos, no sufre prácticamente variación alguna, es decir, que la policitemia continuaba inalterable a pesar del tratamiento hígado más cobalto durante dos semanas. En lo referente a la hemoglobina, si bien es cierto que hay ligeras variaciones, podemos decir que en realidad las cifras no varían entre la policitemia previa y las obtenidas durante la administración del extracto de hígado. Podemos concluir diciendo que



GRAFICA X.—Demuestra que el extracto hepático no tiene influencia sobre la acción policitémica del cobalto, en lo que respecta a Hb y hematíes.

el extracto hepático no tiene influencia sobre la policitemia ocasionada por cobalto en los conejos, animales que hemos empleado en nuestros estudios.

II. Con el objeto de investigar si el extracto de hígado era capaz de inhibir la acción del cobalto en la producción de policitemia, procedimos a la administración diaria de extracto hepático más sulfato de cobalto a conejos normales; los resultados están representados en la gráfica X. Observamos que la policitemia se inicia todavía a partir del noveno día, aun-

que en los días anteriores se nota un pequeño aumento del número de hematíes, pero muy moderado si comparamos con resultados obtenidos en la administración de cobalto puramente (ver gráfica I); pero, a partir del noveno día la policitemia se mantiene constante hasta el final de los experimentos que fueron de 15 días. En la misma gráfica se halla la respuesta de la hemoglobina al tratamiento hígado más cobalto; notamos que el alza de hemoglobina es algo más apreciable, aún el tercer día, para ir acentuándose en los subsiguientes días y luego estabilizarse a partir del penúltimo día de experimentación. Podemos admitir que existe una respuesta más precoz, si comparamos con la obtenida en los hematíes, pero en ningún momento se observa la acción inhibitoria del extracto hepático. Probablemente el rápido aumento de la hemoglobina se debe al gran incremento de reticulocitos, que se observa desde los primeros días, reticulocitosis no solo ocasionada por el cobalto sino también por el extracto de hígado, que es capaz, según algunos autores, de aumentar dichos elementos aún en animales normales.

La pequeña influencia que ejerce el extracto hepático, retardando en forma muy moderada la aparición de la policitemia, tal vez, podría explicarse si admitimos la posibilidad de que dicho extracto formaría con el cobalto ciertos complejos, susceptibles de ser eliminados más fácilmente por las vías biliares y aún por la orina. Pero, esta acción es pasajera ya que a partir del noveno día la policitemia por el cobalto se establece inalterablemente, a pesar de que se continúa administrando extracto hepático junto con el cobalto; por lo menos, así sucede en los conejos, que son animales con los que hemos realizado nuestros experimentos.

CAPITULO V

ESTUDIOS ANATOMOPATOLOGICOS EN LA POLICITEMIA POR EL COBALTO

La investigación anatomopatológica, tanto macroscópica como microscópica, en los órganos de los conejos sacrificados en pleno estado policitémico por cobalto, ha tenido doble finalidad; en primer lugar, constatar si existían lesiones que pudieran explicar el mecanismo de dicha policitemia; en se-

gundo lugar, era interesante estudiar la aparición posible, de lesiones histológicas de naturaleza tóxica por efecto del cobalto, ya que podíamos pensar en la utilización de este elemento, en el tratamiento de ciertos estados anémicos en el hombre. Estudios de tal naturaleza no se han llevado a cabo por otros investigadores, salvo los practicados en la médula ósea. Es de advertir, que la anatomía patológica de las policitemias de otro origen, ha sido también poco estudiada; sin embargo, en la enfermedad de Vaquez o policitemia vera existen datos más o menos completos, entre los que señalamos los siguientes : respecto a los trastornos circulatorios, se ha observado distensión de los vasos sanguíneos, ocasionada por el gran volumen de sangre, la que es capaz de producir aumento del tamaño de ciertos órganos como el hígado, además puede provocar verdaderos estados cirróticos (120); en el bazo se ha demostrado, además del aumento de su volumen, infartos que constituyen uno de los caracteres más saltantes de dicha enfermedad (121); la plétora sanguínea se manifiesta también por hemorragias masivas en la tráquea, estómago e intestinos, explicables no por discrasia sanguínea, sino por distensión vascular, representando una de las causas más frecuentes de muerte (122); existe gran hiperplasia de la médula ósea, que se manifiesta por un color rojo oscuro o negro rojizo, de tal intensidad que hay conversión de la médula grasosa en roja como dice Hissfeld, citado por Harrop (122); la hiperplasia medular no solo es de la serie eritroblástica, sino también de la mieloide, notándose a veces la presencia de actividad eritropoyética en tejidos como el bazo, hígado, ganglios y pulmones; en las fases avanzadas se añade esclerosis especialmente de los huesos (123); Reznikoff (124), luego de estudiar 135 casos de policitemia vera, encuentra engrosamiento de los capilares de la médula ósea, llegando en ciertas ocasiones a la fibrosis que puede alcanzar hasta las arteriolas y arterias, lo cual le sugiere la posibilidad de un estado de anoxemia en la médula ósea que provocaría su hiperactividad y, por consiguiente, la policitemia; Jaffe (125), al realizar un estudio crítico de éste y otros trabajos similares, cree que en la enfermedad de Vaquez existe una hiperplasia de todos los elementos de la médula ósea (panmielopenia de Askanazi), pero falta comprobarse si todos los casos de po-

licitemia vera mostrarían fibrosis y, sobre todo, cómo se explicaría el no raro cambio de la policitemia en leucemia mielóide. En la policitemia tipo enfermedad de Ayerza, la lesión predominante es la esclerosis de la arteria pulmonar con hipertrofia del corazón derecho. La policitemia hipertónica de Gaisbock, se caracteriza por arterioesclerosis con hipertensión y nefritis (126). En la policitemia de la altura, Hurtado (127, 123), refiriéndose a los trabajos realizados por Weiss, encuentra en la anatomía microscópica del pulmón las alteraciones siguientes : fibrosis arterio-capilar con esclerosis del parénquima pulmonar y congestión difusa de los capilares; Mori Chávez (129, 130), en cobayos transportados a la altura, encuentra en el pulmón : trastornos de tipo congestivo y exudativo generalizado, llegando en los casos extremos al infarto y la esplenización, mientras que en conejos no halla alteraciones apreciables.

En la policitemia por el cobalto, debemos señalar los estudios de Mascherpa (133), quien administrando cobalto a perros normales obtiene policitemia, pero no llega a observar alteraciones de la médula ósea, mientras que en perros previamente anemizados por medio de sangrías repetidas sin hierro, la administración de cobalto, no sólo hace la recuperación de hematíes y hemoglobina, sino que existe hiperplasia de la médula ósea, aumento de tamaño del bazo, y ninguna alteración en el tejido retículo endotelial. Marshall (131) no encuentra alteraciones microscópicas en el hígado de ratas policitémicas por cobalto. Kato (132) consigue policitemia con la administración de hierro y cobalto en ratas hechas anémicas por dieta láctea exclusiva, observando marcada hiperplasia de los elementos hematopoyéticos de la médula ósea, con abundantes normoblastos, y disminución de las células adiposas. Mascherpa (133), estudiando la marcha que sigue el cobalto administrado a conejos, encontró que su depósito se llevaba a cabo de preferencia en los pulmones, muy poco en el hígado, bazo, riñones, y sin ocasionar lesiones patológicas, estudios que han sido confirmados por Cannava (134).

ANATOMIA PATOLOGICA DE LA POLICITEMIA POR EL COBALTO EN CONEJOS

Vamos a hacer una somera descripción de datos, obtenidos en nuestros estudios, del examen macroscópico y microscópico de los órganos de conejos en pleno estado de policitemia por el cobalto, refiriéndonos en especial a lesiones que pueden interesar en nuestras investigaciones. En este resumen consideramos : datos de los animales policitémicos sacrificados y autopsiados hallándose en buenas condiciones de salud, y también de aquellos conejos que fallecieron espontáneamente estando en plena policitemia; estos últimos presentaban días antes de morir, ciertos trastornos diarreicos y se notaba desmedro de la salud en forma acentuada; en la autopsia se constataba como causa inmediata de la muerte, hemorragia peritoneal.

Examen macroscópico.—En el abdomen de los animales sacrificados y autopsiados, encontramos congestión marcada de los vasos mesentéricos, zonas de necrosis particularmente en el intestino grueso; en los conejos fallecidos espontáneamente, además había hemorragia peritoneal con coágulos organizados en la cavidad peritoneal, zonas de hemorragia en el intestino delgado, y en los días que precedían a la muerte, dichos animales, presentaban baja del número de hematíes y de hemoglobina, aumento de la viscosidad sanguínea que dificultaba la toma de muestras, así como tendencia a la aglutinación de hematíes en la solución de Hayem. El riñón e hígado se encontraban muy congestionados, en algunos también el pulmón y el bazo; en la mayoría de casos, estos dos últimos órganos, se encontraban normales macroscópicamente. La médula ósea estaba muy roja, y a veces de un rojo oscuro notable, comparada con la de animales normales.

La autopsia de los conejos previamente esplenectomizados y que luego hicieron policitemia por el cobalto, presentaba alteraciones semejantes a las descritas en animales con bazo.

En general, la dilatación vascular es constante, ya sea en los animales fallecidos espontáneamente, o en los que eran sacrificados para realizar la autopsia.

Examen microscópico.—Estas investigaciones las hemos realizado con auxilio del Dr. Bloom, profesor de la Universidad de Chicago, y del Dr. Jiménez Franco, Jefe de la Sección Anatomía Patológica —Hospital Dos de Mayo— de la Facultad de Medicina de Lima. Como los resultados son casi idénticos, me limitaré a la descripción de las lesiones halladas en diferentes órganos de los conejos policitémicos por el cobalto.

Hígado.—La arquitectura del órgano en general con caracteres normales, inclusive las vías biliares. Marcada sobrecarga de glucógeno en las células hepáticas, especialmente en la porción central del lobulillo. No hay evidencia de hematopoyesis. Existen pequeños y discretos focos de congestión centro-lobulillar. No se constatan señales de estados inflamatorios ni tóxicos.

Bazo.—Folículos linfoides normales, un poco hiperplásticos. Sinusoides dilatados y repletos de hematías. En diferentes porciones del parénquima, se observan focos de metaplasia mielode, sin mostrar eritrocitopoyesis. No hay sobrecarga pigmentaria.

Riñón.—Discreta tumefacción turbia a nivel de los tubos contorneados. Glomérulos, tejido conjuntivo y vascular normales. No existe evidencia de hematopoyesis.

Pulmones.—Enteramente normales.

Médula ósea.—El corte muestra muy poca granulocitopoyesis, presentando en cambio gran predominio de la serie roja, particularmente en sus últimos estadios. Buena proporción de pigmento ferruginoso en los fagocitos. Prácticamente, casi todos los megacariocitos se encuentran degenerados. Los cortes no muestran lesiones inflamatorias ni tóxicas, demostrables morfológicamente. Los mielogramas “impronta” de dos de los conejos son como sigue :

	Conejo N° 1	Conejo N° 2
Mieloblastos	35 %	49 %
Mielocitos neutrófilos	158	86
Mielocitos eosinófilos	27	12
Mielocitos basófilos	16	9
Metamielocitos neutrófilos	62	48
Metamielocitos eosinófilos	87	4
Metamielocitos basófilos	2	0
Cayados	45	141
Segmentados	43	145
Eosinófilos	30	35
Basófilos	3	0
Linfocitos	14	22
Monocitos	0	0
	48	104
Normoblastos	423	341
Megacariocitos	7	4
	1,000	1,000

En resumen, como datos anormales en el estudio anatómo-patológico de los órganos de conejos policitémicos por el cobalto, se encuentra ciertos focos de metaplasia mieloide en el bazo. El estudio de la médula ósea "impronta", denota que estamos en presencia de una hiperplasia mieloide, con tan marcado predominio de la serie roja, que casi se podría hablar de una hiperplasia selectiva de esta serie. Por último, debemos señalar que hay cierta alteración degenerativa en el protoplasma de los megacariocitos.

Es de notar que en ningún caso, aún en los fallecidos como consecuencia de la policitemia, se llegó a observar alteraciones tóxicas ni de otro orden en los diversos órganos examinados.

SEGUNDA PARTE

CAPITULO VI

CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA INFLUENCIA DEL ACIDO ASCORBICO EN LA HEMATOPOYESIS

Los estados de avitaminosis debidos a pobreza de ácido ascórbico en la alimentación, como el escorbuto, se hallan aso-

ciados a trastornos sanguíneos, siendo una de sus manifestaciones la anemia que puede ser debida a hemorragias o, según algunos, a carencia misma del ácido ascórbico. El papel que desempeña, esta vitamina, en la hematopoyesis es un asunto muy discutido; se ignora si es o no indispensable en la formación de hematíes.

En 1920, Hess (135) sostuvo que en el escorbuto no existían estados anémicos, y que en algunos casos había encontrado policitemia. Meltier y colaboradores (136), luego de estudiar cuidadosamente varios casos de escorbuto en el hombre, creen que hay anemia asociada a esta enfermedad, con alteraciones de la médula ósea, que sería capaz de ser curada con alimentos ricos en ácido ascórbico, es decir, que éste tendría efectos especiales en la eritropoyesis. El mismo autor (137), en el escorbuto experimental, utilizando cobayos, señala anemia progresiva, con falta de maduración de hematíes en la médula ósea, que indicaría retardo de la eritropoyesis y corregible con la administración de ácido ascórbico. Ohata (138), en experimentos similares, constata baja de hematíes y de hemoglobina, junto con otros trastornos de orden químico especialmente de los lípidos. Otros autores (139, 140) llegan a resultados semejantes.

La posible relación existente entre el ácido asbórbico y la eritropoyesis, ha sido investigada desde diversos puntos de vista. Así Kreitmair (141), en gatos amenizados por la saponina, observó que el ácido ascórbico ejercía una acción regeneradora de hematíes, con aumento de hemoglobina y reticulocitos. La administración diaria de 60 miligramos de esta vitamina a individuos escorbúticos, trajo consigo alza de hematíes y de hemoglobina (142). Hay quienes sostienen que la hematopoyesis no se realiza en ausencia del ácido ascórbico (143), aunque otros creen que no existiría relación entre éste y la hematopoyesis (144), siendo ineficaz en el tratamiento de las anemias y leucemias. Por otra parte, en las leucemias se ha señalado influencia favorable con la administración de fuertes dosis de ácido ascórbico (145), a la vez que se han indicado resultados dramáticos en el tratamiento de la agranulocitosis (146). En los conejos se ha obtenido aumento de leucocitos, mediante la administración de Vitamina C (147); también semejante efecto se ha observado sobre los he-

matías (148), y un efecto estimulante sobre el sistema retículo endotelio (149).

Realmente no hay uniformidad en lo que respecta a la precisa acción ejercida por el ácido ascórbico sobre la hematopoyesis. Es cierto que estudios cuidadosos, realizados en el cobayo que es el animal más sensible al escorbuto, parecen demostrar que juega algún papel en la regeneración de hemáties y hemoglobina (150), pero esto en el hombre no ha sido comprobado de manera definitiva, ya que la regeneración sanguínea puede ser espontánea o estimulada por la administración de hierro (151). Hay todavía quienes piensan que su papel no sería el de incrementar la producción de hemáties, sino que su función sería simplemente la de liberar a la circulación los reticulocitos de la médula ósea (152). La acción en el conejo parece manifestarse por un cierto estímulo sobre la médula ósea, traducida por aparición de pseudoeosinófilos en la sangre (153).

Parece bastante admisible la conclusión obtenida por ciertos investigadores (154), de que el ácido ascórbico es necesario en la hematopoyesis del cobayo, aunque el mecanismo de su acción sea desconocido.

El empleo del ácido ascórbico asociado al hierro o al extracto hepático en el tratamiento de diferentes tipos de anemias secundarias y aún en la anemia perniciosa, parece haber dado resultados alentadores (155 a 160).

En las intoxicaciones por el plomo acompañadas de anemia y otras alteraciones morfológicas de los hemáties, se ha constatado el efecto benéfico del ácido ascórbico; así mismo, se ha observado que la acción nociva del plomo es mayor cuando existe deficiencia de esta vitamina (161).

La existencia de ciertos estados anémicos que pueden atribuirse a déficit del ácido ascórbico (alimentación inadecuada, absorción defectuosa, rápido consumo en el organismo), parecen tener fundamento. En estos casos es lógico pensar que el mayor aporte de dicha vitamina va a producir efectos benéficos. En la mayoría de casos, las anemias obedecen a causas múltiples; por esto, el tratamiento combinado de hierro, extracto hepático y vitamina C, ha dado buenos resultados.

Hemos creído conveniente estudiar la acción del ácido ascórbico en relación a la policitemia ocasionada por el cobal-

to, ya que el rol que desempeña dicha vitamina en la hematopoyesis es bastante discutido, y desprender de los estudios que hemos reseñado algunos resultados que aclaren el problema. Al igual que algunos trabajos consignados en capítulos anteriores, hemos publicado una nota preliminar sobre estas investigaciones, las que han sido ampliadas con posterioridad, y el trabajo que ahora presentamos representa un estudio detallado.

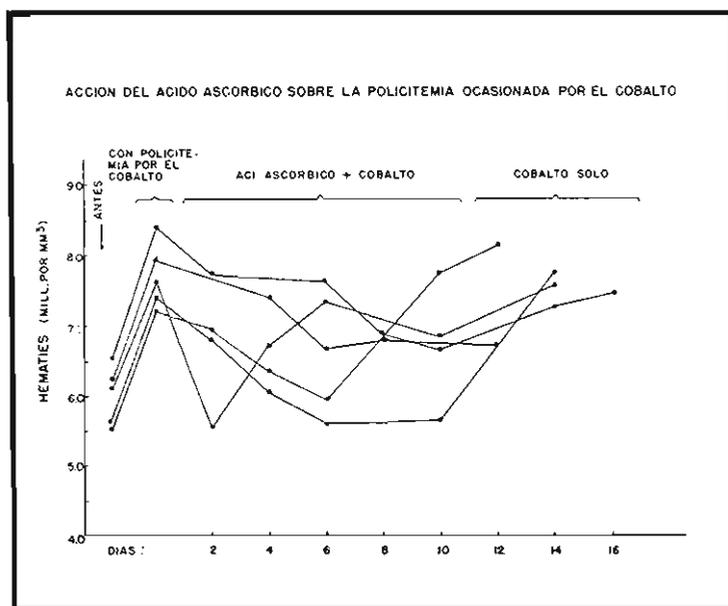
Las investigaciones se orientaron bajo dos puntos de vista: En primer lugar, estudiar el papel que desempeña el ácido ascórbico en la policitemia ocasionada por el cobalto. Y en segundo término, constatar el efecto que produciría la administración conjunta del ácido ascórbico y cobalto.

ACCION DEL ACIDO ASCORBICO EN LA POLICITEMIA POR EL COBALTO

Método.—Se procedió en primer lugar a conseguir la policitemia por cobalto en los conejos, utilizando exactamente el mismo método empleado en los experimentos anteriores; lograda ésta y constatada por los exámenes hematológicos, se iniciaba la administración intramuscular diaria de 50 miligramos de ácido ascórbico en solución acuosa, a la vez que se continuaba con el tratamiento de sulfato de cobalto a igual dosis que la empleada en producir la policitemia, es decir, 10 miligramos diarios. Esta doble administración, de ácido ascórbico más cobalto, duraba diez días, y luego se continuaba sólo con el cobalto; las determinaciones hematológicas correspondientes se llevaron a cabo durante ese tiempo. Estudiaremos separadamente la acción del ácido ascórbico sobre los hematíes, hemoglobina, reticulocitos, etc.

Acción sobre los hematíes.—En la gráfica XI hemos representado el resultado de nuestros experimentos. Observamos que la acción del ácido ascórbico se ejerce de manera notable, pues la reducción de la policitemia es muy apreciable en la totalidad de los experimentos, en algunos en forma tan acentuada que los hematíes disminuyen considerablemente desde los primeros días de administración del ácido ascórbico, en otros la disminución es moderada, pero en todos los casos:

la policitemia desaparece, y la numeración de hematíes retorna a sus valores iniciales, es decir, aquellos obtenidos antes de la policitemia. Es de anotar que dicha acción no es duradera, sino inmediata, ya que cuando se suspende la administración del ácido ascórbico y se continúa solamente con la de cobalto, la policitemia reaparece con rapidez. En uno de los conejos se observó el mismo comportamiento que en los demás, pero al noveno día había hecho cierta policitemia, a pesar del ácido ascórbico, lo que hace pensar en el predominio



GRAFICA XI.—Se observa que el ácido ascórbico frena la acción policitémica del cobalto, desapareciendo la policitemia, a pesar de continuarse administrando cobalto.

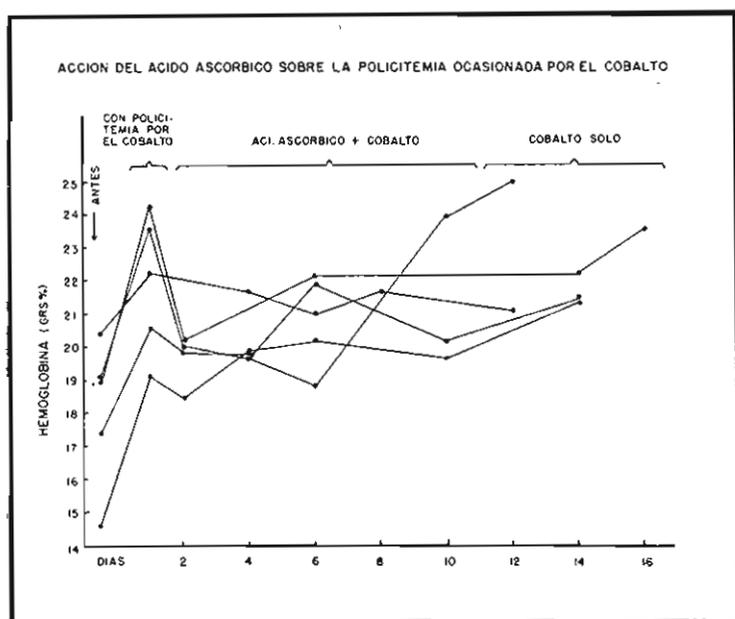
de la acción policitémica del cobalto. En la mayoría de los experimentos la reducción del número de hematíes es notable, mientras el animal recibe vitamina C.

Por lo tanto, podemos decir que el ácido ascórbico elimina la acción policitémica del cobalto, pero dicho efecto no es duradero, pues cuando se suspende la vitamina y se continúa sólo con cobalto, la policitemia reaparece.

Debemos anotar que uno de los conejos, utilizados en estos estudios, fué previamente esplenectomizado y en la gráfi-

ca vá marcado con * ; se observa que su comportamiento fué semejante al de los animales con bazo.

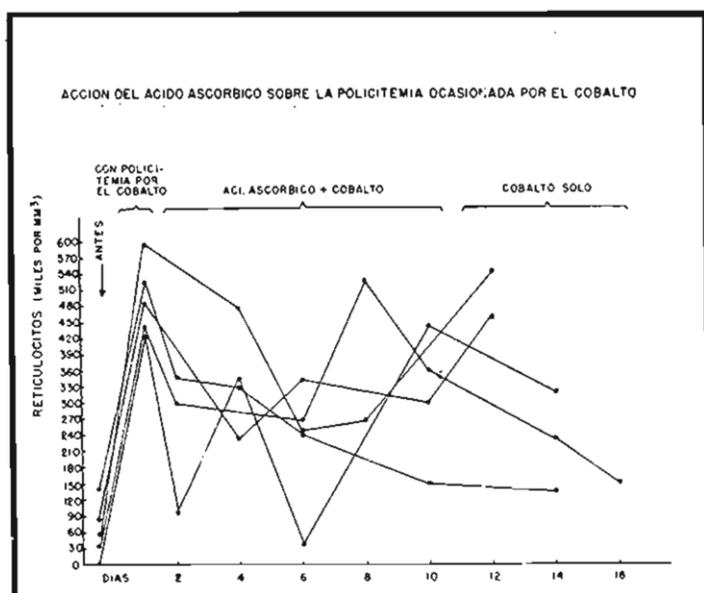
Acción sobre la hemoglobina.—La determinación de la hemoglobina en los animales policitémicos y luego tratados con ácido ascórbico más cobalto, nos proporciona datos que no son muy equivalentes a los hallados en los hematíes. Así vemos en la gráfica XII que las cifras de hemoglobina se re-



GRAFICA XII.—Demuestra la acción del ácido ascórbico que frena la policitemia desencadenada por el cobalto. se observa la disminución de la Hb.

ducen en todos los casos, pero no tanto como para alcanzar los valores iniciales, antes de la policitemia; sin embargo, en algunos la reducción es acentuada aunque no alcanza las cifras iniciales. Es muy interesante observar que uno de los conejos antes de recibir cobalto tenía solo 14.59 grs. % de hemoglobina, después en plena policitemia alcanza 19.10 grs. %; con la administración de ácido ascórbico más cobalto, se nota moderada reducción al segundo día, no así en los subsiguientes, en que se observa alza apreciable.

Cuando se suspende la administración del ácido ascórbico y se continúa sólo con el cobalto, se observa que la hemoglobina vuelve a subir de manera pronunciada, y en la mayoría de casos las cifras sobrepasan a aquellas obtenidas en la primera parte de los experimentos o sea en la policitemia provocada por el cobalto únicamente, salvo en el conejo esplenectomizado en que no se alcanzan cifras tan elevadas, lo que hablaría en favor de cierto papel que pudiera desempeñar el bazo en el abastecimiento de material para la elaboración de hemoglobina.



GRAFICA XIII.—Acción del ácido ascórbico disminuyendo la reticulocitosis típica de la policitemia por cobalto en conejos.

Acción sobre los reticulocitos.—El resumen de estos experimentos se halla en la gráfica XII. Observamos, de un modo general en los conejos policitémicos, que hay una disminución del número de reticulocitos desde los primeros días del tratamiento ácido ascórbico más cobalto, y permanece en esta forma durante los días de experimentación, es decir, mientras reciben la vitamina. La citada disminución del número de reticulocitos no es tan acentuada, y no llega a alcanzar las cifras iniciales que se habían obtenido antes de la polici-

C U A D R O N° 13

ACCION DEL ACIDO ASCORBICO SOBRE LOS LEUCOCITOS, EN LA POLICITEMIA POR COBALTO

LEUCOCITOS (miles por mm³.)

CONEJOS Dias después de la administración de :

N°	Antes del Cobalto	Policitemia por Co	Dias después de la administración de :									
			2	4	6	8	10	12	14	16	20	
			Aci. Ascórbico + Cobalto									
			Cobalto solo									
1	11.5	14.5	10.5	6.5	12.5	—	—	15.5	13.0	—	—	16.0
2	8.0	12.0	8.0	—	16.0	11.5	11.0	11.0	—	11.5	6.0	15.5
3	9.5	14.0	—	15.0	16.0	14.5	—	—	13.0	—	—	8.0
4	7.5	6.5	4.5	5.5	11.5	—	—	6.0	—	7.0	—	7.0
5	11.0	7.5	9.5	8.5	9.5	—	—	5.0	—	6.5	—	9.0

C U A D R O N° 14

ACCION DEL ACIDO ASCORBICO SOBRE LA EOSINOFILIA, EN LA POLICITEMIA POR EL COBALTO

EOSINOFILOS (en % de leucocitos)

CONEJOS N°	Antes del Cobalto	Policitemia por Co	Dias después de la administración de:								
			Aci. Ascórbico + Cobalto			Cobalto solo					
			2	4	6	8	10	12	14	16	
1	0	16	2	0	1	—	—	1	0	2	1
2	0	2	0	—	0	0	0	1	—	1	2
3	0	7	—	7	4	4	4	—	7	—	3
4	1	6	2	1	1	—	—	0	—	2	4
5	2	3	3	2	0	—	—	0	—	6	5

temia por cobalto, lo cual es lógico, ya que los reticulocitos puestos en circulación deben permanecer cierto tiempo, más o menos variable, para luego ser englobados como tales por el sistema retículo endotelio, o según otros autores, para seguir el ciclo y transformarse en hematíes maduros en la propia sangre circulante. La baja se explicaría por influencia del ácido ascórbico que detendría la salida a circulación de estos elementos inmaduros.

Resumiendo, podemos decir que en los conejos policitémicos por cobalto, la reducción del número de reticulocitos por efecto del tratamiento ácido ascórbico más cobalto es siempre constante, con variaciones marcadas en algunos casos, aunque no llegan a cifras tan bajas como las obtenidas antes de la policitemia.

Acción sobre los leucocitos.—En el cuadro N^o 13 resumimos los datos referentes al estudio de la determinación cuantitativa de los glóbulos blancos. Observamos que no existe influencia alguna del ácido ascórbico sobre los leucocitos de conejos policitémicos por cobalto. Las variaciones son tan irregulares que no es posible deducir conclusión alguna.

Por lo tanto, podríamos decir que en los conejos policitémicos por cobalto, los leucocitos no se hallan influenciados por el tratamiento de vitamina C más cobalto.

Acción sobre los eosinófilos.—En la policitemia por el cobalto, como ya lo hemos indicado, se presenta una eosinofilia más o menos marcada y siempre constante. La administración del ácido ascórbico más cobalto, en estas condiciones, ocasiona marcada disminución del número de eosinófilos, desapareciendo rápidamente en algunos casos, mientras que en otros la disminución es lenta. Estos datos están consignados en el Cuadro N^o 14. Cuando se suspende la administración del ácido ascórbico y se continúa solo con la de cobalto, los eosinófilos vuelven a aumentar. La interpretación de tales variaciones la haremos posteriormente.

Acción sobre la relación hemoglobina y hematíes.—Con el objeto de estudiar la influencia del ácido ascórbico sobre los índices de color y la hemoglobina corpuscular media, en co-

C U A D R O N° 15

ACCION DEL ACIDO ASCORBICO SOBRE EL INDICE DE COLOR EN LA POLICITEMIA POR COBALTO

CONEJOS N°	Antes del Cobalto	Policitemia por Co	INDICE DE COLOR										
			Días después de la administración de :										
			Aci. Ascórbico + Cobalto					Cobalto solo					
	2	4	6	8	10	12	14	16					
1	1.29	1.23	1.17	1.19	—	1.16	—	—	—	—	—	—	—
2 (i)	1.08	1.08	—	1.09	1.15	1.13	—	—	—	1.15	—	—	1.19
3	1.21	1.06	1.10	1.18	1.17	—	—	—	—	1.18	—	—	—
4	0.99	0.97	1.23	1.36	—	1.12	—	—	—	1.04	—	—	—
5	1.07	1.02	1.09	1.12	—	1.10	—	—	—	1.01	—	—	—

(i) Esplenectomizado.

C U A D R O N° 16

ACCION DEL ACIDO ASCORBICO SOBRE LA HEMOGLOBINA CORPUSCULAR
MEDIA EN LA POLICITEMIA POR COBALTO

		HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA (micromicrogramos)									
		Dias después de la administración de :									
CONEJOS N°	Antes del Cobalto	Policitemia por Co	Aci. Ascórbico		Cobalto		Aci. Ascórbico + Cobalto		Cobalto solo		
			2	4	6	8	10	12	14	16	
1	34.1	32.7	28.9	31.4	31.6	—	—	30.8	30.8	—	—
2 (i)	28.9	28.9	28.6	—	29.0	30.8	29.9	—	—	30.5	31.6
3	32.7	28.1	—	29.3	31.4	31.0	—	31.2	—	—	—
4	26.1	25.8	27.1	32.8	36.0	—	29.6	—	—	27.7	—
5	28.5	27.1	35.7	29.1	29.7	—	29.3	—	—	27.6	—

(i) Esplenectomizado.

nejos policitémicos por cobalto, hemos preparado los cuadros N^o 15 y N^o 16. Constatamos que estos índices por efecto de la vitamina C, en la mayoría experimentan moderada alza desde los primeros días de administración, siendo en algunos casos algo acentuada. Sabemos que el cobalto, al producir la policitemia, ocasiona moderada baja de estos índices; lo contrario sucede cuando se administra ácido ascórbico más cobalto a conejos policitémicos. Cuando se suspende el tratamiento de ácido ascórbico y se sigue con cobalto, observamos que los índices tienden a bajar nuevamente en algunos casos, y en otros persiste el alza señalada.

La interpretación de estos hechos se podría hacer si comparamos los datos obtenidos de la reticulocitosis en estas mismas condiciones, cuestión ya estudiada anteriormente. En efecto, hemos constatado que los reticulocitos bajan moderadamente por efecto del ácido ascórbico, pero no tanto como para alcanzar valores iniciales, es decir, antes de la policitemia, mientras que los hematíes sí bajan hasta las cifras iniciales, lo que se nota claramente en la gráfica XI. Si admitimos que los reticulocitos y otras formas de hematíes jóvenes en circulación son más ricos en hemoglobina, es fácil comprender que estamos frente a una disminución de hematíes en proporción más acentuada que la de reticulocitos ricos en hemoglobina; de allí que los citados índices tengan tendencia a subir. Es posible que el ácido ascórbico inhiba la salida, desde la médula ósea, de hematíes maduros, menos ricos en hemoglobina, cuestión sobre la que insistiremos al ocuparnos del mecanismo de acción del ácido ascórbico en la policitemia por cobalto.

INFLUENCIA DEL ACIDO ASCORBICO SOBRE LA ACCION DEL COBALTO EN LA PRODUCCION DE POLICITEMIA

El segundo problema que nos habíamos planteado consistía en observar si el ácido ascórbico era capaz de controlar la acción del cobalto de aumentar el número de hematíes, hemoglobina, reticulocitos, etc. Con tal finalidad, luego de realizar los exámenes hematológicos preliminares, los conejos recibían diariamente 50 miligramos de ácido ascórbico por vía intramuscular, durante 12 días, a la vez que se hacía también

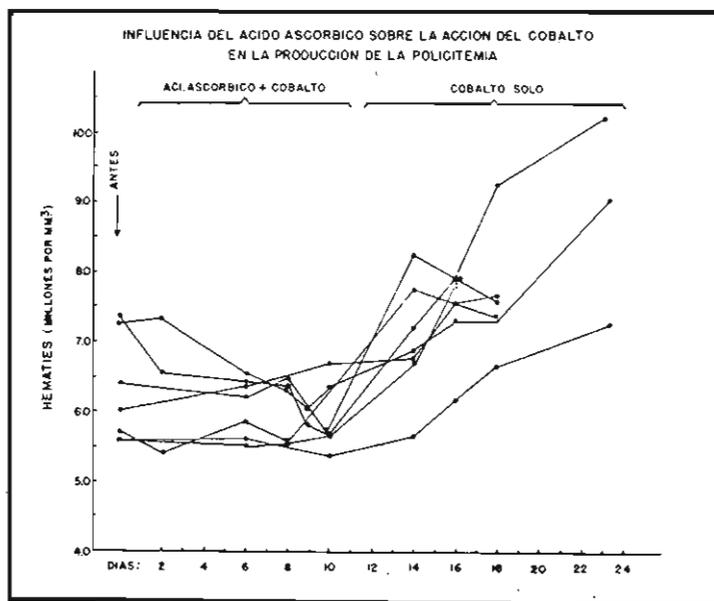
la administración diaria del cobalto a la dosis de 10 miligramos. Los resultados obtenidos van a continuación.

Influencia sobre los hematíes.—Ya hemos demostrado que el cobalto es capaz de provocar policitemia, desde los primeros días de su administración, pero en los experimentos que ahora tratamos, se observa que dicha acción queda inhibida durante el tiempo en que además se administra el ácido ascórbico. En la gráfica XIV se hallan los resultados obtenidos en lo que respecta a hematíes. Notamos, en la totalidad de casos, que las cifras de hematíes se conservan sin variación y en algunos hay ligera disminución, si comparamos con los valores iniciales. Es interesante anotar los casos en que la cifra inicial se encontraba alrededor de los 6 millones, que es normal en conejos, la proporción de hematíes casi no sufre alteración por efecto del ácido ascórbico más cobalto, en tanto que cuando las cifras eran superiores a los 7 millones, se observaba un descenso indefectible hacia valores normales, algo así como si el ácido ascórbico tuviera el poder de regular la cifra de hematíes manteniéndola dentro de los límites normales. Pero también observamos que esta acción inhibidora, no se ejerce de manera permanente, ya que al décimo día, en algunos, se presentan alzas del número de hematíes, pero que no alcanzan a los 7 millones. En cuanto se suprime la administración del ácido ascórbico y se continúa sólo la de cobalto, la policitemia hace su aparición; en estas condiciones el cobalto ejerce todo su poder policitémico y en algunos con tal intensidad, que nunca se había alcanzado en anteriores experimentos, algo comparable al retiro de un freno que hubiera contenido y acumulado tal poder.

En resumen, el ácido ascórbico inhibe la acción del cobalto elevadora del número de hematíes. Cuando se suprime dicha vitamina y se continúa con cobalto, entonces éste retorna a su acción policitémica con mayor intensidad.

Influencia sobre la hemoglobina.—El estudio de la influencia del ácido ascórbico sobre la hemoglobina, en los mismos animales, se encuentra resumido en la gráfica XV. Observamos que, con el tratamiento de ácido ascórbico más cobalto, en la mayoría de los casos, las cifras de hemoglobina.

suben ligeramente, pero no en grado tan marcado como lo obtenido en animales que reciben cobalto solamente. Se nota también que aquellos animales en los que se comenzaba el experimento con cifras de hemoglobina muy superiores a la normal, hacen un ligero descenso a los pocos días del tratamiento con vitamina C. En algunos casos, la cifra de hemoglobina, luego de aumentar ligeramente, desciende casi hasta los valores iniciales, excepto en uno que parece no obedecer a la influencia del ácido ascórbico. En general el alza no

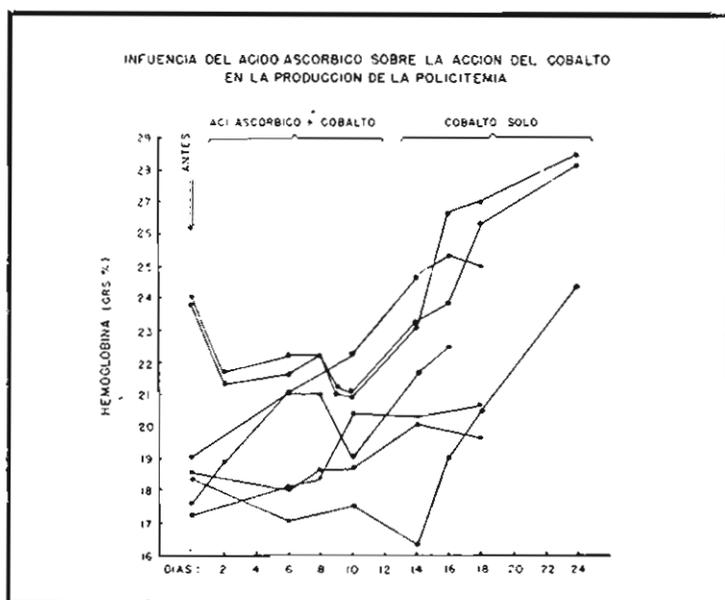


GRAFICA XIV.—Variaciones de los hematíes por acción neutralizante del ácido ascórbico sobre el efecto policitémico del cobalto.

es tan marcada como la que se observa cuando se administra sólo cobalto. Una vez suspendida la administración del ácido ascórbico y continuada únicamente con cobalto, notamos que las curvas de hemoglobina suben en todos los casos, alcanzando cifras tan elevadas que nunca se habían presentado en los experimentos señalados para la policitemia por cobalto.

En conclusión, podemos decir que el ácido ascórbico es capaz de impedir la acción del cobalto elevadora de hemoglobi-

na, pero no en forma absoluta como lo observado en el caso de los hematíes. Por lo tanto, con la hemoglobina encontramos ciertas variaciones en el sentido de que el ácido ascórbico no anula totalmente la acción del cobalto, explicable tal vez por el hecho de que hay cierta liberación de hematíes ricos en hemoglobina (reticulocitos, hematíes basófilos, etc.), no sucediendo lo mismo con los hematíes maduros, cuestión que tiene fundamento con los estudios que a continuación describimos.

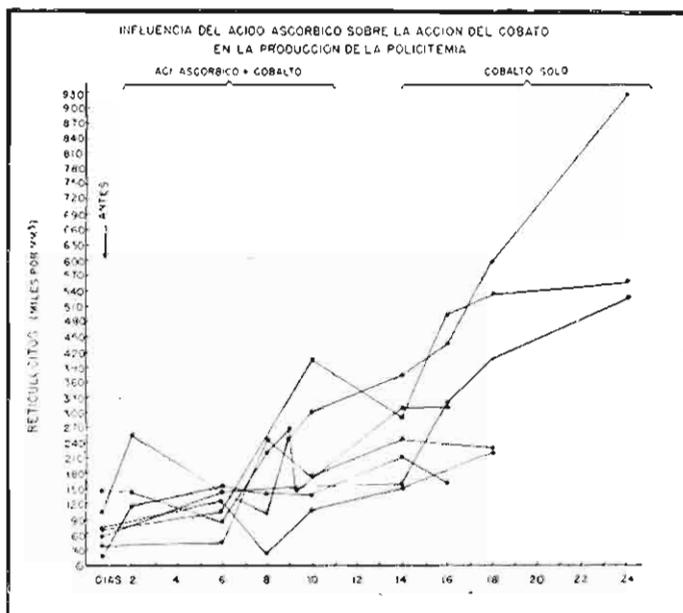


GRAFICA XV.—Variaciones de la hemoglobina por el efecto neutralizante del ácido ascórbico sobre la acción policitémica del cobalto en conejos.

Influencia sobre los reticulocitos.—En la gráfica XVI se halla el resumen de estos experimentos. Notamos que durante la administración del ácido ascórbico más cobalto, durante la primera semana las cifras de reticulocitos casi no sufren variación, salvo algunos que presentaban un ligero aumento, en tanto que durante la segunda semana se observa alza en todos los casos, y en algunos algo acentuada. Cuando se suspende la administración del ácido ascórbico y se continúa con

el cobalto, las cifras de reticulocitos llegan a cantidades considerables, hasta casi un millón en uno de los casos.

Podemos decir que el ácido ascórbico ejerce una acción inhibitoria sobre el poder del cobalto de liberar grandes cantidades de reticulocitos, pero esta acción es sólo temporal, ya que prolongando el tratamiento de ácido ascórbico más cobalto, la reticulocitosis se presenta es grado moderado. Cuando se suprime el tratamiento con vitamina C y se continúa con cobalto, la reticulocitosis se desencadena en grado muy elevado.



GRAFICA XVI.—La reticulocitosis típica de la policitemia por cobalto no se manifiesta debido a la acción neutralizante del ácido ascórbico.

Influencia sobre la relación hemoglobina y hematíes.—Las variaciones que experimentan los índices de color y la hemoglobina corpuscular media, por efecto del tratamiento ácido ascórbico más cobalto, se encuentran en los cuadros N^o 17 y N^o 18. Observamos, de acuerdo con los datos obtenidos en lo que respecta a hemoglobina, que existe moderada alza de dichos índices, en algunos desde los primeros días de administración del ácido ascórbico más cobalto, en los otros después de los

CUÁDR O N° 17

INFLUENCIA DEL ACIDO ASCORBICO SOBRE LA ACCION POLICITEMICA DEL COBALTO

CONEJOS N°	Antes del Cobalto	INDICE DE COLOR																
		Días después de la administración de:																
		Aci. Ascórbico + Cobalto						Cobalto solo										
2	4	6	8	10	14	16	18	24	2	4	6	8	10	14	16	18	24	
1	1.23	—	1.15	—	—	—	—	1.23	1.09	1.16	1.16	1.16	1.26	1.16	1.16	1.16	1.26	1.26
2	1.20	—	1.28	—	—	—	—	1.25	1.38	1.26	1.26	1.26	1.23	1.38	1.26	1.23	1.23	—
3	1.21	1.24	1.27	1.32	1.36	1.32	1.36	1.39	1.21	1.27	1.27	1.27	1.10	1.21	1.27	1.10	1.10	1.05
4	1.25	1.12	1.28	1.32	1.32	1.32	1.32	1.25	1.27	1.23	1.23	1.23	1.18	1.27	1.23	1.36	1.36	1.18
5	1.15	1.32	1.36	1.46	—	—	—	1.26	1.20	1.07	1.07	1.07	—	1.20	1.07	—	—	—
6	1.16	—	1.24	1.25	—	—	—	1.22	0.94	—	—	—	—	0.94	—	1.06	1.06	—
7	1.09	—	1.10	1.08	—	—	—	1.33	0.92	—	—	—	—	0.92	—	0.98	0.98	—

C U A D R O N° 18

INFLUENCIA DEL ACIDO ASCORBICO SOBRE LA ACCION POLICITEMICA DEL COBALTO

		HEMOGLOBINA CORFUSCULAR MEDIA (micromicrogramos)											
CONEJOS N°	Antes del Cobalto	Días después de la administración de :											
		Aci. Ascórbico + Cobalto						Cobalto solo					
		4	6	8	9	10	14	16	18	24			
1	32.8	—	30.5	—	—	—	32.7	—	28.9	—	30.9	—	33.6
2	31.8	—	33.2	—	—	—	33.3	—	36.5	—	33.5	—	32.6
3	32.2	32.8	33.8	34.9	36.0	—	36.9	—	32.1	—	33.7	—	29.2
4	33.2	29.7	34.1	34.9	35.1	—	33.2	—	33.8	—	32.6	—	36.1
5	30.7	34.9	36.0	37.9	—	—	33.5	—	32.0	—	28.4	—	—
6	30.7	—	32.9	33.1	—	—	32.3	—	26.2	—	—	—	28.1
7	29.0	—	29.1	28.7	—	—	32.7	—	24.4	—	—	—	25.9

6 días, pero de todos modos al llegar al décimo día se nota que los índices han subido apreciablemente en todos los casos. Cuando cesa la administración de la vitamina C y seguimos con el cobalto, se observa que los índices bajan ligeramente; lo mismo sucede en los casos tratados por cobalto solamente y que se ha demostrado en capítulos anteriores.

TERCERA PARTE

CAPITULO VII

ESTUDIOS DE RESPIRACION CELULAR Y LA INFLUENCIA DEL COBALTO

El estudio de la respiración de los hematíes es un recurso de técnica fina para juzgar la presencia de elementos jóvenes de la serie roja en la sangre circulante, ya que los eritrocitos maduros son incapaces de respirar. Es así como Warburg (162), en 1909 estudiando la respiración de los hematíes en conejos normales, demostró que el consumo de oxígeno era casi nulo. Otros autores (163, 164) confirmaron estas observaciones, llegando Wright (165) a creer que no respiraban. Recientemente Ramsey y Warren (166), utilizando también hematíes de conejos, demostraron que existía cierta relación entre el número de reticulocitos y la magnitud de respiración, requiriendo por lo menos un 0.5 % de reticulocitos para que se aprecie el fenómeno. Los hematíes ortocromáticos tienen una velocidad respiratoria de 8.44 mm.³ de oxígeno gramo por hora. Harrop y Guzmán Barrón (167) (168), demostraron, en el hombre y otros mamíferos, que la respiración de los hematíes era muy reducida, excepto cuando existen células jóvenes o restos nucleares en circulación; sostenían que en los eritrocitos adultos, desaparecía una sustancia esencial para el mecanismo respiratorio, ya que la adición de ciertos colorantes vitales, como el azul de metileno, hace recobrar a dichos hematíes su capacidad respiratoria, al igual que los elementos nucleados. Kempner (169), utilizando aparatos de Barcroft-Warburg, ha estudiado la influencia de los hematíes nucleados en la respiración de la sangre, demostrando en un caso de anemia eritroblástica, que los hematíes nucleados tenían una capacidad

respiratoria 200 veces mayor que los hematíes maduros y 100 veces más que los reticulocitos.

MÉTODOS.—En el estudio de la respiración de hematíes, médula y riñones, hemos utilizado el aparato de micro-respiración según Barcroft-Warburg modificado por Winterstein (170), en cuyo depósito interior y sin contacto con la muestra cuya respiración se trata de investigar se pone 0.15 cm.³ de Solución N de Hidróxido Potasio para que absorba el CO₂ desprendido durante la respiración. En el pequeño vasito lateral, se coloca 0.2 cm.³ solución acuosa conteniendo 0.1 milígramo sulfato de cobalto. En el vasito de Warburg se coloca la emulsión de hematíes u otros tejidos cuya respiración se trata de medir. El líquido utilizado para la emulsión era el de Ringer, con 0.2 % de glucosa y tampón de fosfatos para pH 7.4.

Para los estudios de respiración de hematíes en los conejos, la sangre era recogida, por punción cardíaca, en un frasco que contenía heparina como anticoagulante; en el caso de sangre humana, se punzaba una vena de la flexura del codo. La sangre era centrifugada, se eliminaba el plasma con gran parte de leucocitos, y luego los hematíes eran emulsionados en la solución de Ringer indicada. Con el objeto de eliminar la mayor cantidad posible de leucocitos que hubieran quedado en la emulsión, se filtraba a través de una columna de algodón, y luego se ajustaba el pH por medio del potenciómetro. En la emulsión resultante se llevaban a cabo los exámenes hematológicos siguientes : numeración de hematíes, leucocitos, reticulocitos y hematíes nucleados.

En el vasito de Warburg se colocaba 2 cm.³ de esta emulsión de hematíes, cuya respiración se trataba de mediar antes y después de la adición del cobalto colocado en el vasito lateral. Los experimentos para hematíes se realizaban utilizando un baño perfectamente regulado a 37° C. La lectura del consumo de oxígeno se verificaba cada cinco minutos, durante una hora.

El estudio comparativo de la respiración de hematíes, se llevó a cabo en conejos normales y en conejos policitémicos por cobalto. En primer término se determinaba el consumo de oxígeno sin la adición in-vitro del cobalto, durante una ho-

ra. En segundo lugar, a la misma muestra, se añadía el cobalto, y determinábamos el consumo de oxígeno, cada cinco minutos durante una hora.

En lo que respecta a la respiración de la médula ósea, bazo, etc., la técnica varía. En primer lugar, todas las operaciones se practicaban en una habitación cuya temperatura era mantenida a 37° C. Para estudiar la respiración en la médula ósea, ésta se obtenía del hueso fémur y era colocada directamente, cantidad adecuada, en el vasito de Warburg que de antemano contenía 2.5 cm.³ de solución Ringer. Para tejidos como el bazo y riñón, se procedía a recibirlos en una solución de cloruro de sodio al 0.9 %; y utilizando una hojita de mano se procedía a practicar cortes muy delgados, y de una superficie aproximada de un cm.²; tres de estos cortes se collocaban en cada vasito de Warburg conteniendo 2.5 cm.³ de solución Ringer. Al igual que para los hematíes, se estudiaba la respiración antes y después de la adición de cobalto, verificando las lecturas cada cinco minutos por espacio de 30 a 60 minutos, y siempre en la habitación de 37° C mencionada.

De este modo se estudiaba la influencia del cobalto en la respiración de cada uno de los tejidos indicados, obtenidos de conejos normales y de policitémicos por cobalto.

RESPIRACION DE LOS HEMATIES

INFLUENCIA DE LOS RETICULOCITOS Y NORMOBLASTOS

De acuerdo con la técnica que acabamos de indicar hemos estudiado la respiración de los hematíes, tanto en conejos normales como en los policitémicos por cobalto.

En el cuadro N° 19 se halla el resumen de los resultados obtenidos. Cada cifra representa el promedio de tres o más experimentos en la misma muestra, que por lo general acusaba valores casi idénticos. Las cifras de la segunda columna, corresponden al número de hematíes por mm.³ de emulsión preparada de acuerdo a la técnica, en la que por medio de las diluciones y filtraciones, se ha logrado casi eliminar los leucocitos y el plasma; por estas razones, la cuenta no representa el número real de hematíes por mm.³ de sangre; así, en conejos policitémicos se obtenían de 7 a 8 millones de hematíes por mm.³ de sangre, cifra que después de las operaciones

mencionadas se reducía a valores que pueden verse en el cuadro mencionado. En la columna 5ª se halla el consumo de oxígeno, expresado en mm.³ por hora, y se observa que no existe relación entre el número de hematíes y el consumo de oxígeno, lo que confirma una vez más que la respiración de los hematíes maduros es casi nula.

En el mismo cuadro, se consignan las cantidades de reticulocitos y normoblastos por mm.³ de emulsión. Si comparamos las cifras de reticulocitos, con el consumo de oxígeno, se observa que no existe relación estrecha, aunque en algunos ca-

C U A D R O N° 19

INFLUENCIA DE LOS NORMOBLASTOS Y RETICULOCITOS EN LA RESPIRACION SANGUINEA DE CONEJOS POLICITEMICOS POR COBALTO

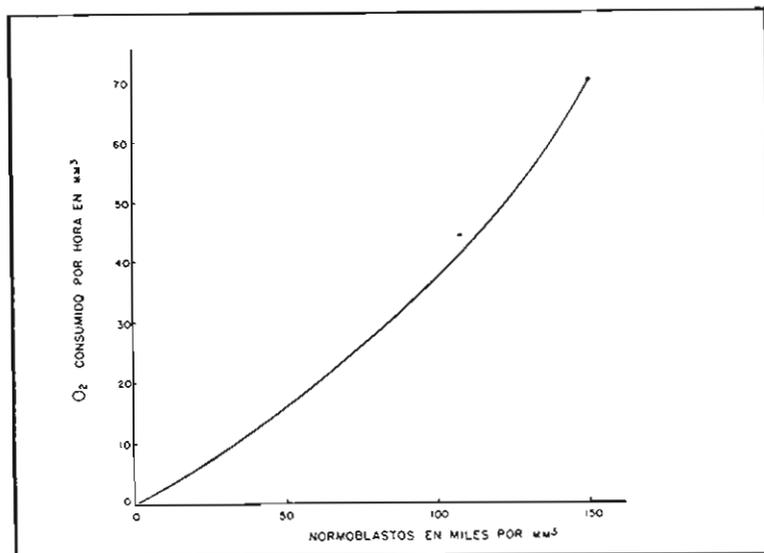
CONEJOS N°	HEMA- TIES por mm. ³	RETICU- LOCITOS por mm. ³	NORMO- BLASTOS por mm. ³	mm. ³ . de O ₂ por hora
Control	5'200.000	31.200	0	4.5
Policit. 1	4'600.000	426.000	0	11.0
Policit. 2	3'320.000	166.000	99.600	12.8
Policit. 3	2'300.000	98.000	46.000	23.6
Policit. 4	3'630.000	159.000	108.000	92.0
Policit. 5	7'500.000	495.000	150.000	44.6
Policit. 6	4'600.000	25.6	276.000	68.1

sos se ve que a mayor número de reticulocitos existe mayor cantidad de oxígeno respirado.

En cuanto al número de normoblastos, por lo general se ve claramente que existe relación directa bastante estrecha con la cantidad de oxígeno consumido; así, la sangre del conejo control, sin normoblastos, registra la menor cantidad de oxígeno respirado en esa serie, mientras que el policitémico N° 5 con 150,000 normoblastos, que es lo más alto en el grupo, acusa también el máximo consumo de oxígeno, o sea 68.1 mm.³ por hora; el policitémico N° 2 carece de normoblastos, pero a la vez tiene una mínima cantidad de consumo del oxígeno. En

la gráfica XVII se puede apreciar mejor esta relación directa entre el número de normoblastos y la magnitud respiratoria.

Al comparar los resultados del conejo control con el policitémico N° 1, observamos que ambos carecen de normoblastos, pero el policitémico ocasiona doble consumo de oxígeno, lo que podría atribuirse a la gran cantidad de reticulocitos que posee (420,000 p. mm.³).



GRAFICA XVII.—Relación directa entre número de normoblastos circulantes y consumo de oxígeno (capacidad respiratoria celular) en la policitemia por cobalto.

En un caso humano de policitemia vera, se estudió la capacidad respiratoria sanguínea, observándose que el consumo de oxígeno por hora era de 5.3 mm.³ pero no presentaba normoblastos, y el número de reticulocitos era de 10,000 p. mm.³, cifra más baja que la del conejo control empleado en la serie de nuestros experimentos.

Por las razones anotadas, podemos decir que existe incremento de la capacidad respiratoria sanguínea de los conejos policitémicos por cobalto, lo que se debe en gran parte a la presencia de hematíes nucleados, y en menor cuantía a la intervención de los reticulocitos; no tiene ingerencia el aumento del número de hematíes adultos.

ACCION DEL COBALTO SOBRE LA RESPIRACION DE LOS HEMATIES

SU RELACION CON LOS NORMOBLASTOS

Con el objeto de conocer el papel que pudiera tener el cobalto in-vitro sobre la capacidad respiratoria de los hematíes, reticulocitos y normoblastos, estudiamos la respiración antes y después de la adición del cobalto, utilizando el aparato de Barcroft-Warburg. Se medía la respiración de la emulsión durante una hora, luego se añadía el cobalto y continuábamos midiendo el consumo de oxígeno por otra hora.

CUADRO N° 20

ACCION DEL COBALTO SOBRE LA RESPIRACION SANGUINEA.

SU RELACION CON LOS NORMOBLASTOS

CONEJOS N°	Reticuloci- tos p. mm ³ .	Normoblas- tos p. mm ³	mm ³ de O ₂ por hora		Inhibición %
			Antes del Co	Después del Co	
Control	31.200	0	4.5	4.8	0
Policit. 1	426.000	0	11.0	3.9	64.5
Policit. 2	166.000	99.600	12.8	0.8	93.7
Policit 3	98.000	46.000	23.6	5.3	77.5
Policit. 4	159.000	108.000	44.6	4.1	90.8
Policit. 5	495.000	150.000	68.1	11.6	85.3
Policit. 6	276.000	92.000	25.6	11.4	55.5

Los resultados de estas investigaciones están resumidas en el cuadro N° 20. Se han utilizado muestras de sangre de un conejo normal, y de varios policitémicos. El consumo de oxígeno está expresado en mm.³. Se consigna también el número de reticulocitos y de normoblastos en las emulsiones utilizadas, a fin de observar si existía relación entre el poder inhibitor del cobalto y el número de dichos elementos. Observamos, en el conejo normal sin normoblastos y con pequeña proporción de reticulocitos, que la capacidad respiratoria, antes y después de la adición de cobalto, es casi la misma, es de-

cir, que el cobalto no ejerce acción inhibitoria de la respiración sanguínea en conejos normales. Pero, no sucede lo mismo en la sangre de los conejos policitémicos, pues en éstos se advierte una inhibición respiratoria que varía de 55.3 % a 93.7 %, con una media de 83 % de inhibición.

Si ahora tratamos de estudiar la correlación entre esta capacidad inhibitoria del cobalto, y la cantidad de reticulocitos y normoblastos en las muestras, observamos en el conejo policitémico N^o 1, sin normoblastos y con fuerte proporción de reticulocitos, que la inhibición alcanza al 64.5 %, mientras que en los policitémicos N^o 4 y 5 con fuerte proporción de normoblastos, la inhibición alcanza al 90.8 % y 85.3 % respectivamente. Sin embargo, no se puede hablar de un estrecho paralelismo, ya que en el policitémico N^o 2, con moderado número de reticulocitos y regular proporción de normoblastos, la inhibición alcanza la cifra máxima de la serie que es de 93.7 %.

Podemos concluir diciendo que el cobalto in-vitro, es capaz de inhibir la capacidad respiratoria de la sangre, pero en el caso que las muestras contengan elementos jóvenes de la serie roja, que son como acabamos de ver los que poseen mayor poder respiratorio.

INFLUENCIA DEL COBALTO EN LA RESPIRACION DE ALGUNOS TEJIDOS

Con el fin de averiguar si la acción del cobalto inhibitoria de la respiración celular, era capaz de manifestarse en otros tejidos, procedimos de acuerdo con el método señalado en la primera parte de este capítulo, a estudiar la respiración en la médula ósea y en el bazo, antes y después de la adición del cobalto. Hemos elegido estos dos órganos, porque el examen histológico revela trastornos marcados en la médula ósea, y muy moderados en el bazo.

Lo mismo que en los casos anteriores, las cifras consignadas representan la media de tres experimentos en cada uno de ellos.

Influencia del cobalto en la respiración de la médula ósea

Los resultados se encuentran en el cuadro N^o 21. En la médula ósea, observamos que la inhibición es en general mo-

derada, si hacemos la comparación con lo hallado en la sangre. Dicha inhibición varía de 23.1 % a 64.5 %, con una media, para los conejos policitémicos, de 37.4 % de inhibición, en tanto que para el conejo normal es de 24.1 %. Se nota pues mayor influencia del cobalto en la médula ósea de los conejos policitémicos, lo que se podría atribuir al gran incremento de elementos celulares, especialmente de la serie roja, como lo indicado al ocuparnos de su histología. Esto no quiere decir que la inhibición se ejerce en forma específica para la serie indicada, ya que no se ha estudiado la influencia del cobalto sobre la serie blanca, en forma aislada, que nos hubiera servido de comparación.

CUADRO N° 21

INFLUENCIA DEL COBALTO SOBRE LA RESPIRACION DE LA MEDULA OSEA

CONEJOS N°	mm ³ . de O ₂ por hora		Inhibición %
	Antes del Co	Después del Co	
Normal	32.4	24.6	24.1
Policit. 1	41.7	14.8	64.5
Policit. 2	26.8	18.9	29.5
Policit. 3	41.8	28.2	32.5
Policit. 4	20.7	15.9	23.1

Inhibición en el conejo normal. de control 24.1 %

Inhibición en conejos policitémicos. media 37.4 %

Influencia del cobalto en la respiración del bazo.—Siguiendo la misma técnica, hemos estudiado el efecto que ejerce el cobalto in-vitro en la respiración del bazo de conejos normales y policitémicos. Los resultados se consignan en el cuadro N° 22. Se observa en general que la inhibición es moderada; sin embargo, se advierte que la inhibición del bazo en el conejo normal alcanza la cifra de 17.9 %, en tanto que en bazos de conejos policitémicos las cifras son más bajas, variando la inhibición de 3.1 % a 9.1 % con una media de 6.1 %. La explicación de este fenómeno tal vez la podríamos hallar en

el hecho señalado cuando nos ocupamos de los estudios histopatológicos, pues vimos que el bazo presentaba folículos linfoides un poco hiperplásticos, sinusoides repletos de hematies y además dilatados; en diferentes porciones del parénquima, se observa focos de metaplasia mieloide sin mostrar eritro-

CUADRO N° 22

INFLUENCIA DEL COBALTO SOBRE LA RESPIRACION DEL BAZO

N° CONEJOS	mm ³ . de O ₂ por hora		Inhibición %
	Antes del Co	Después del Co	
Normal	31.2	25.6	17.9
Policit. 1	27.5	25.0	9.1
Policit. 2	34.2	33.0	3.5
Policit. 3	32.2	29.4	8.7
Policit. 4	41.5	40.2	3.1

Inhibición en el conejo normal. de control 17.9 %

Inhibición en conejos policiténicos. media 6.1 %

CUADRO N° 23

INFLUENCIA DEL COBALTO SOBRE LA RESPIRACION
DEL BAZO DE RATA

RATAS N°	mm ³ . de O ₂ por hora		Inhibición %
	Antes del Co	Después del Co	
1	37.0	38.8	0
2	48.0	48.8	0
3	25.0	26.8	0
4	28.9	30.0	0

citopoyesis. Es posible que esta hiperplasia linfoide junto con la metaplasia mieloide, hayan influido para que la acción inhibitoria del cobalto se haya mostrado en pequeño grado, ya que tal vez estos elementos han resistido al cobalto y han continuado respirando. Sin embargo, esta acción que ejerce el

cobalto no es igual a lo que sucede en la rata, como puede verse en el cuadro N^o 23, en donde se resumen los experimentos realizados con el bazo de ratas normales, donde puede observarse que el cobalto no ejerce acción inhibitoria de la respiración. Ya anteriormente, al estudiar la policitemia en los conejos sin bazo, habíamos indicado que estos animales desarrollaban la policitemia en la misma forma que los conejos con bazo, lo que no sucede en las ratas, las que después de la extirpación de dicho órgano no presentan policitemia con la administración del cobalto, probablemente por la aparición de un síndrome anémico por la bartonella muris.

Con todo, este asunto se presta a futuras investigaciones.

CUARTA PARTE

D I S C U S I O N

CAPITULO VIII

MECANISMO DE LA POLICITEMIA POR EL COBALTO

Consideraciones generales.—El cobalto es uno de los elementos que se halla en el organismo como trazas. Sus propiedades biológicas son poco conocidas. Es interesante anotar algunas que pudieran ser de interés para nuestro estudio.

El cobalto llega al organismo con los alimentos, sea de origen animal o vegetal o con el agua de bebida, en cantidades muy pequeñas; se absorbe solo en parte a nivel del intestino, ingresando a la circulación para incorporarse en los diversos tejidos del organismo, de preferencia en el tejido hepático. La excreción de cobalto, sea del que ha ingresado por la vía oral o parenteral, se efectúa rápidamente en la siguiente proporción : 90 % por el riñón y el resto por la bilis y mucosa intestinal. No se conoce la cantidad de cobalto que el organismo humano puede retener, pero en la rata se ha hallado que es de 0.01 mgr. (171, 172, 173, 174 y 10).

El cobalto, al igual que el níquel y el manganeso, tiene la propiedad de restablecer la actividad enzimática de la arginasa, desviando el pH de su actividad de 9 a 7.7; posiblemente formaría complejos cobalto-arginasa (175). Si bien es cierto que esta acción, así como su papel activante de enzi-

mas como las fosfatasas, peptidasas, carboxilasas, ha sido observada *in vitro*, pero en el organismo no está demostrado si juega algún rol en los sistemas enzimáticos (175 a). El cobalto es incapaz de actuar como catalista en la oxidación de la cisteína, pero unido a ésta, en forma de complejo, puede actuar como poderoso agente reductor a pH 7.5 a 8 (176). Esta capacidad del cobalto de unirse a la cisteína, parece que le permite a ésta, neutralizar la acción tóxica del cobalto. Además el cobalto podría unirse a otros radicales sulfhidrúlicos en el organismo, pudiendo así traer interferencias en el mecanismo de los sistemas enzimáticos respiratorios en los cuales intervienen dichos radicales. Es interesante observar que uno de los efectos tóxicos del cobalto es la inhibición del desarrollo en las ratas, pero tal efecto puede ser neutralizado por la cisteína (177). Se supone que la toxicidad del cobalto se debería a su gran conductibilidad (178). La acción tóxica del cobalto se ejerce entre otros tejidos, sobre el timo; a dosis fuertes favorece la carioclasia y a débiles, la carioquinesis (179). Su efecto dañino para la fertilidad en las ratas es admitido (183). La acción farmacológica del cobalto ha sido estudiada desde hace mucho tiempo, siendo la más importante la vasodilatadora; puede durar cincuenta minutos y si la administración es por vía venosa se presentan trastornos nerviosos variados: tremor, corea, convulsiones, parestias, etc. Y sólo a dosis elevada logra ocasionar lesiones de índole tóxica en los órganos (180, 181).

Su relación con la formación sanguínea.—Desde que Walter (13) observó el aumento de hematíes y hemoglobina por efecto de la administración de cobalto en las ratas, se ha tratado de buscar la explicación de este fenómeno. La posibilidad de que el cobalto pudiera intervenir en la constitución de la hemoglobina está descartada. *In-vitro* el cobalto es capaz de formar cobalto-porfirinas, cuya existencia en el organismo animal o vegetal no está comprobada, en tanto que las porfirinas del hierro, cobre, magnesio, tales como la hemoglobina, citocromo, catalasa, peroxidasa, turacina, clorofila, etc. juegan rol importante en la respiración celular. El espectro de las cobalto-porfirinas es característico, lo que ha permitido su identificación (182). Aún en los animales con policitemia por

cobalto, no es posible identificarlo y su acción probable se ejerce en cantidades mínimas, sin tendencia a acumularse en los tejidos; sus propiedades biológicas se manifiestan sin el concurso de otros elementos, dependiendo el efecto de las características metabólicas de cada animal (10, 51, 183). Así la teoría de Mascherpa (45) de que el cobalto pudiera reemplazar al hierro en la formación de la hemoglobina no tiene fundamento.

Una cuestión interesante que merece atención, es lo referente al rol del cobalto en lo que respecta a génesis de la hemoglobina. Es bien sabido que el cobre parece tener rol esencial en la formación de hemoglobina, aunque no es constituyente de su molécula; en las ratas, una alimentación exenta de cobre ocasiona anemia severa, sólo curable con la administración de cobre; pero sucede algo particular con este metal, puesto que en el organismo se halla bajo la forma de cupreínas; en los hematíes y células hepáticas se encuentra formando parte de la oxidasa del citocromo, por lo que su rol podría explicarse más fácilmente. Se sugiere también que el cobre actuaría como catalizador permitiendo la mejor utilización de la hemosiderina (compuesto de hierro que se almacena en los tejidos), favoreciendo de esta manera la regeneración de la hemoglobina (184, 185). Pero también tratándose del cobalto no sucede tal cosa, pues no ha sido posible hallarlo en el organismo bajo forma de complejo alguno; tampoco lo encontramos en la constitución de las enzimas. Pero existen ciertos hechos relacionados con este problema; así, en los carneros sometidos a régimen carente de cobalto, se origina una anemia marcada, y es frecuente la hemosiderosis del hígado, bazo, páncreas, etc.; la administración de cobalto hace desaparecer la anemia (186). Kato (183) ha demostrado en ratas, que la administración de hierro y cobalto trae consigo poca acumulación de hierro en el hígado, sugiriendo que la médula ósea sería el lugar donde el cobalto ejerce mayor actividad, facilitando la mejor utilización del hierro. El cobalto aceleraría la actividad de los procesos oxidativos de la respiración celular, tal vez bajo la forma de peroxidasa, jugando rol de preferencia sobre el complejo hierro-porfirina. Ortén y otros investigadores (187, 188, 189) sostienen que el cobalto

tiene efecto estimulante en la regeneración de la hemoglobina y hematíes de ratas que padecen estados anémicos provocados con dieta pobre en proteínas, o en perros con régimen lácteo exclusivo. Pero en recientes investigaciones Robscheit y Wipple (190) no están de acuerdo con estas consideraciones; aún más, sostienen que el cobalto a altas concentraciones puede inhibir la regeneración de la hemoglobina que se consigue con la terapia de hierro exclusivamente. Otros investigadores creen que muchos de los resultados discrepantes, pueden ser debidos a las dosis de cobalto empleadas, las vías de administración, especie animal utilizada para los experimentos, etc.; la mayoría de investigadores sostienen que con dosis adecuada el efecto policitémico es fácil de conseguir y que el aumento de esta dosis no es capaz de incrementar paralelamente el grado de policitemia; así, al emplear dosis altas se acarrearán trastornos tóxicos al animal (191, 192, 193, 194). Podemos decir que está probado que, la carencia de cobalto en la alimentación del carnero, ocasiona estados anémicos curables con administración de cobalto; pero, estudios similares llevados a cabo en perros, ratas, conejos, etc. no reportan iguales conclusiones. Posiblemente las dosis que requieren estos animales, para su correcta nutrición, sean tan pequeñas que no permiten verificarlas por medio de procedimientos analíticos habituales; por tanto, no se podría asegurar que el cobalto es innecesario en la hematopoyesis (186, 196, 197) (198, 198 a). Recientes trabajos parecen demostrar que el cobalto es efectivo en la curación de los estados cobalto-carenciales del carnero, pero sólo cuando se administra por vía bucal, y como tales estados se presentan sólo en los rumiantes, habría que suponer que el cobalto actuaría sobre algún microorganismo localizado en el tubo digestivo, y no en la intimidad de los órganos del rumiante; que allí intervendría en los procesos enzimáticos, y así explicaríamos por qué animales de otras especies no sufren de dichos estados de deficiencia (198 a). Indudablemente este problema de nutrición, en lo que respecta al hombre, carece de importancia, ya que en nuestra alimentación deben llegar con exceso, pequeñísimas cantidades de cobalto suficientes para las necesidades del organismo, tal como debe suceder con la mayoría de animales. En ciertas ane-

mias de los niños, la administración de cobalto puede traer incremento del número de hematíes y nada de la cantidad de hemoglobina (206, 198 b), en tanto que en el adulto los resultados han sido negativos (198 c, 198 d). Pero el problema que nos interesa es cómo el cobalto logra provocar policitemia. Naturalmente que la mayoría de investigadores dicen que hay estímulo de la hematopoyesis, pero cuál es el mecanismo de tal acción? El tejido donde se ejercería esta acción, para muchos investigadores, es la médula ósea. Ya Mascherpa (45) había señalado alteraciones regenerativas en la médula ósea y órganos linfáticos, inclusive el bazo, en las policitemias por cobalto. Shultze, Myers, Marshall, Orten, etc. (204, 199, 110, 200) creen que el estímulo se llevaría a cabo en la médula ósea, favoreciendo la producción de hemoglobina y el metabolismo de los hematíes. Es indudable que a nivel de la médula ósea se pueden verificar alteraciones regenerativas, sobre todo de la serie eritropoyética, en la policitemia por el cobalto, hecho también constatado por nosotros y señalado por Kato y Kleimberg (55, 132). Las causas que expliquen estos trastornos no han podido ser señaladas en forma satisfactoria. La posibilidad de que pudiera haber aumento de hemólisis, con hiperbilirrubinemia correspondiente, que estimularía a la vez la eritropoyesis (201, 202), no es posible admitirla al menos en lo que respecta al conejo; ya hemos indicado nosotros, que no hay hiperbilirrubinemia en el curso de la policitemia por cobalto en dichos animales.

Si ahora revisamos las teorías que tratan de explicar el mecanismo de las policitemias de otro origen, con el fin de dar explicación al mecanismo de la policitemia por cobalto, notamos que muchas de tales teorías no tienen fundamento que satisfaga ampliamente. Se admite que las policitemias pueden ser relativas, transitorias y absolutas. En la primera hay baja del volumen plasmático, no hay aumento del volumen sanguíneo, ni signos de superproducción sanguínea; la transitoria es ocasionada por estímulos conocidos, que arrojan a la circulación hematíes de los depósitos del organismo (bazo, hígado, etc.). Existen sustancias como la adrenalina, efedrina, anfetamina, etc. que en conejos, perros, y en el hombre, son capaces, por vasoconstricción en la médula ósea, de acarrear estados de hipoxia o anoxia y ocasionar policitemias con reticu-

locitosis y signos de regeneración sanguínea en la médula ósea. La administración de sustancias vaso-dilatadoras puede corregir estos trastornos (203, 204, 205). En las policitemias absolutas, con aumento de la masa total sanguínea, tenemos : a) la eritremia, b) la eritrocitosis. En la primera el estímulo es desconocido, hay signos de hiperplasia de todos los elementos de la médula ósea (enferm. de Vaquez-Osler), su causa se ignora, aunque hay quienes sostienen que se debería a fibrosis de los vasos, en especial de las arterias y capilares de la médula ósea, ocasionando anoxia en dichos tejidos y la consiguiente respuesta compensadora; otros autores dudan de que en todos los casos de enfermedad de Vaquez-Osler existan tales lesiones vasculares (124, 125). El segundo grupo de policitemias absolutas está representado por las llamadas eritrocitosis, cuyo estímulo verdadero es conocido aunque variado. En todos los casos hay anoxia y esfuerzo compensador para contrarrestar la reducción de la capacidad de oxigenación de la sangre y tejidos, originada sea por causas mecánicas que dificultan la oxigenación sanguínea (enfermedad congénita del corazón, enfermedad de Ayerza, lesiones de esclerosis pulmonar) o las originadas por sustancias químicas diversas (fósforo, manganeso, mercurio, bismuto, arsénico, diversos colorantes, óxido de carbono, etc.) (122), traducidos en la mayoría por aumento del número de hematíes, moderado incremento de la cantidad de hemoglobina, algunas veces alteraciones regenerativas de la médula ósea del tipo eritropoyético. En ciertos casos de anoxia como en la ocasionada por cianuro, no habría defecto de oxigenación sanguínea, la saturación por oxígeno de la sangre venosa se aproxima a la arterial, el defecto radica en los tejidos que están incapacitados de tomar el oxígeno (anoxia histotóxica), habría incapacidad del citocromo de unirse al oxígeno, porque el citocromo-oxidasa que cataliza esta oxidación se halla inhibido por el cianuro. En otras ocasiones las sustancias pueden estabilizar al citocromo ya oxidado, no cediendo fácilmente su oxígeno el substrato oxidable (es el efecto del alcohol, formol, acetona, etc.) (206, 207, 208). En la eritremia de la "altura" ocasionada por baja presión barométrica, en cuyo estudio han contribuido en forma brillante los investigadores peruanos, muy en especial Monge, Hurtado y colaboradores, el déficit de oxígeno provoca una policitemia

con aumento del volumen sanguíneo y signos de hiperactividad de la médula ósea (209 a 215 a). Recientemente se ha observado en el cobayo sometido a bajas presiones barométricas, que la recuperación a cifras normales de los hematíes depende del grado de disminución de la hiperactividad de la médula ósea, sin signos de destrucción hemática (216). En las ascensiones bruscas a grandes alturas, se presenta con frecuencia un síndrome especial, el soroche, cuya causa primordial es la falta de oxígeno, pero al discutir la forma en que este déficit actúa, E. Guzmán Barrón y colaboradores (217) creen que habría disminución de la capacidad de utilizar oxígeno por parte de los tejidos, ya que el transporte vascular del oxígeno está correcto, pero es probable que el transporte tisular (mio-hemoglobina, complejo citocromo) estaría alterado, cuya eficacia es regulada por la corriente sanguínea y el estado de los capilares. La participación del mecanismo tisular es también apoyado por Hurtado (218).

Como se ve, hay una serie de sustancias y condiciones que pueden originar la eritrocitosis, aún la supresión de elementos inorgánicos en la dieta, pero de allí a pensar que cada uno de estos, por ese sólo hecho, pudiera desempeñar algún papel en la eritropoyesis resulta difícil de admitir, mucho menos tratándose de sustancias que se hallan en el organismo en cantidades pequeñísimas, ya que faltan pruebas experimentales que favorezcan este modo de pensar (219, 220).

DISCUSION

Los estudios que hemos llevado a cabo, utilizando conejos como animales de experimentación, confirman el efecto policitémico del cobalto que se manifiesta por incremento del número de hematíes y de la cantidad de hemoglobina, esta última en menor proporción que los hematíes, por consiguiente los índices hematológicos indican moderada hipocromía; como en los animales testigo no se observaron alteraciones hemáticas de ninguna clase, se puede admitir que el efecto se debía exclusivamente al cobalto. También hemos confirmado que no existen variaciones del número de leucocitos durante los experimentos, lo que no sucede con la policitemia vera en que la leucocitosis está siempre presente y con variadas alte-

aciones morfológicas de los leucocitos; más bien, existe cierta similitud con la policitemia de la "altura" en la que no se presentan variaciones leucocitarias. La única alteración cualitativa observada en la policitemia por cobalto es la eosinofilia moderada y constante en todos los casos, pero la interpretación, al igual que la de otras eosinofilias, es difícil; sin embargo, es posible que su origen radique en la acción tóxica del cobalto sobre la médula ósea, sea sólo o unido a una proteína que así lo convertiría en un verdadero alérgeno.

La proporción de los reticulocitos está aumentada, de manera constante, en la policitemia por cobalto; también se encuentran normoblastos en la sangre circulante; esto es prueba de la hiperactividad regenerativa de la médula ósea, comprobada por el examen histológico de dicho tejido, que muestra marcada hiperplasia eritropoyética del tipo normoblastico. Estudios realizados por otros autores demuestran que la policitemia es verdadera. Durante el curso de la policitemia, nosotros hemos realizado determinaciones de las proteínas totales plasmáticas, habiendo observado que no existen alteraciones significativas, descartando así la posibilidad de una hemoconcentración. Pero, la finalidad esencial de nuestro estudio ha consistido en buscar la explicación del mecanismo de dicha policitemia, ya que la revisión de la bibliografía al respecto, no proporciona una teoría satisfactoria.

Pensamos que el estudio de la respiración celular, utilizando el aparato de Warburg-Barcroft, podría proporcionar alguna luz. Por eso, estudiamos la respiración de los hematíes en conejos normales y policitémicos, constatándose el casi nulo consumo de oxígeno por los hematíes normales, en tanto que los glóbulos rojos de conejos policitémicos por cobalto mostraban acentuada respiración. Este diferente comportamiento, en lo que respecta a consumo de oxígeno, se relaciona con la incapacidad respiratoria de los hematíes maduros, mientras que los inmaduros (normoblastos) y aún los reticulocitos acusan capacidad respiratoria que se manifiesta por un acentuado consumo de oxígeno. En esta forma, demostramos de manera fehaciente que la regeneración medular es intensa en la policitemia por el cobalto. Estos indicios de hiperactividad medular no es posible hallarlos en la policitemia de la "altura", tampoco en la ocasionada por adrena-

lina, ni en policitemia vera (97, 122), esto último, confirmado por nosotros.

Luego estudiamos la influencia del cobalto in-vitro sobre la respiración de los hematíes en conejos normales y policitémicos; de esta manera observamos que el cobalto inhibe la respiración celular, que tal inhibición alcanza un promedio de 85 % y que el grado de inhibición respiratoria está en razón directa de la cantidad de elementos nucleados presentes en la muestra, tal como sucede con la sangre de animales policitémicos. Estudios similares utilizando la médula ósea de conejos normales y policitémicos, demuestran que en los normales la inhibición alcanza un promedio de 24.1 %, y en los policitémicos 37.4 %. Esta diferencia puede explicarse por el hecho de que la médula ósea de los policitémicos presenta hiperplasia eritropoyética exclusivamente, por consiguiente es más rica en elementos nucleados. Por otra parte, si comparamos la inhibición respiratoria ocasionada por el cobalto sobre la sangre y sobre la médula ósea, observamos que la intensidad es menor en la médula ósea debido probablemente a la presencia, en ésta, de elementos celulares leucocitarios y tisulares, los que posiblemente son influenciados por el cobalto. Aún más, los mecanismos inhibidores que posee el cobalto deben estar escasos en dicho tejido. Este punto de vista queda confirmado por el hecho de que la inhibición que ejerce el cobalto sobre la respiración del bazo en conejos policitémicos alcanza apenas 6.1 %, en tanto que en el bazo de ratas normales la inhibición es nula. Por eso, parece que hubiera cierta especificidad del cobalto para inhibir a los elementos jóvenes de la serie roja, tanto en la sangre circulante como en la médula ósea. Por otro lado, los estudios histológicos de diversos órganos, nos han demostrado que, exceptuando la médula ósea, no es posible hallar trastorno morfológico alguno por efecto tóxico del cobalto a dosis utilizada por nosotros. No es posible hallar cobalto en cantidades apreciables, en ningún órgano, incluyendo médula ósea y sangre; esto induce a pensar en que su acción se ejerce en cantidades pequeñísimas, comparadas a lo que sucede con los catalizadores, inhibidores, etc. Cabe decir que su acción debe ejercerse sobre algún sistema enzimático de la respiración de los elementos nucleados de la serie roja. El mecanismo de la policitemia por cobal-

to se diferencia claramente de las otras policitemias; así en la policitemia por anoxia, los signos de regeneración eritropoyéticas no son acentuados, y la poliglobulia se explica, en parte, por estar en juego las reservas de hematíes almacenados; pero hemos demostrado que la policitemia por el cobalto puede producirse en animales sin bazo; por otra parte, la policitemia por cobalto es influenciada por el ácido ascórbico, mientras que la policitemia por baja tensión de oxígeno no es influenciada por esta vitamina. En la policitemia por cobalto no hay disminución del aporte de oxígeno hacia los tejidos; tampoco existen lesiones vasculares como lo hallado en la policitemia vera que tampoco es influenciada por el ácido ascórbico. También se diferencia de la policitemia ocasionada por los vaso-constrictores (adrenalina, efedrina, etc.), que es influenciada por los vaso-dilatadores, en tanto que la policitemia por cobalto no se modifica mediante estos vaso-dilatadores.

Cabía la posibilidad de que la acción del cobalto podría ejercerse sobre el principio hematínico que regula la maduración de los eritrocitos; con esta mira realizamos experimentos administrando altas dosis de extracto hepático, pero no obtuvimos influencia alguna sobre esta policitemia. En efecto, el extracto de hígado, que es capaz de corregir las anemias por déficit del principio hematínico, no impidió la aparición de la policitemia por el cobalto, ni fué capaz de corregirla una vez desencadenada.

Cabría revisar la posibilidad de que el cobalto pudiera ejercer acción similar al cianuro que también acarrea, en dosis adecuadas signos de regeneración medular y policitemia, pero en dosis altas es de efecto contrario, tóxico y mortal. También sabemos que el cianuro ejerce su acción sobre la enzima citocromo-oxidasa de capital importancia en la respiración celular, es decir, incapacitando la unión del oxígeno al citocromo. Por otro lado, en este grupo de anoxias histotóxicas, tenemos las ocasionadas por el alcohol, formol, acetona, etc., pero estos compuestos no actúan sobre la enzima, sino directamente sobre el citocromo que se oxida de manera irreversible, es decir, se hace incapaz de ceder el oxígeno. Si analizamos la posibilidad de que el cobalto pudiera ejercer influencia sobre el sistema citocromo-oxidasa, debemos recordar, en

primer lugar, los trabajos de Schultz (325) quien ha demostrado que en las policitemias por cobalto la actividad de la enzima citocromo-oxidasa se halla incrementada, al igual que en otros casos de estímulo medular (hemorragia severa, baja tensión de O_2 , etc.), pero siempre que el suplemento de cobre sea adecuado, pues a déficit de este elemento la policitemia por cobalto no se produce, requiriendo, por lo tanto, que la actividad del citocromo-oxidasa esté a un nivel adecuado para una correcta hematopoyesis, que a su vez depende del suplemento de cobre. En resumen, nada induce a pensar que el cobalto pudiera ejercer alguna acción estimulante e inhibidora sobre la importante enzima citocromo-oxidasa de la respiración celular. Nosotros pensamos que el efecto del cobalto es alterar ciertos sistemas enzimáticos en los que se encuentra el grupo SH, y también a otros compuestos que poseen este radical sulfhidrilo. Existen una serie de enzimas que poseen radical -SH; así, tenemos en primer lugar las enzimas hidrolíticas que intervienen en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y grasas, y en segundo término las enzimas que intervienen en procesos de óxido-reducción celular. El efecto del cobalto sobre el glutatión, que posee radical -SH, sería de particular interés, ya que este tripéptido se halla ampliamente repartido y una de sus funciones es justamente mantener la actividad de las enzimas que poseen el grupo -SH, a la vez, debe jugar rol en la conservación del potencial óxido-reductor conveniente a la función celular. Los oxidantes inhiben la actividad enzimática de enzimas que poseen radical -SH; pues bien, si consideramos al cobalto como agente oxidante, por este mecanismo podríamos explicar su acción inhibidora sobre dichas enzimas y compuestos que poseen el grupo -SH. No podríamos especificar sobre que enzimas con radical -SH actúa el cobalto, tema que nos proponemos estudiar pronto, pero contamos con ciertas pruebas demostrativas de que actúa sobre los compuestos sulfhidrilados. Está demostrado que es posible la formación del complejo cobalto-cisteína; también la cisteína, la cistina y la metionina son capaces de neutralizar el efecto del cobalto sobre el desarrollo y fertilidad de las ratas. Es factible que estos compuestos puedan actuar restableciendo la actividad de las enzimas inhibidas por el cobalto, aunque por sí solos, dichos compuestos sulfhi-

drilados, en especial el glutation, juegan rol importante en el tejido hematopoyético, y recordemos la elevada concentración del glutation en los elementos de la serie eritropoyética. Por otro lado, la interferencia que ocasiona el Co en la respiración celular, podría explicarse en el sentido de alterar el potencial de oxido-reducción; en efecto, la célula para respirar correctamente, requiere una relación constante entre oxidantes y reductores electromotivamente activos, es decir, un potencial redox cercano a la neutralidad. Así Brooks (326) ha indicado que en la intoxicación por el cianuro, baja el potencial redox; la adición de sustancias de alto potencial redox, como el azul de metileno, logra restablecer el potencial óxido-reductor conveniente para la respiración celular, quedando neutralizada la acción tóxica del cianuro. Ahora bien, Swann (327), ha señalado que el sulfato de cobalto actúa como un oxidante enérgico y sería así factible que contribuyera a alterar el potencial óxido-reductor óptimo para que la célula respire; la llegada de reductores, como el ácido ascórbico, puede restablecer el equilibrio alterado, tal como sucede en las policitemias por el cobalto. Los experimentos que sobre respiración celular hemos realizado, demuestran el efecto inhibitorio acentuado que el cobalto ejerce sobre los hematíes circulantes (maduros, y en especial jóvenes), el que realiza sobre otros elementos celulares es nulo o moderado, excepción del bazo en el que se observan centros eritrogénicos en la policitemia por el cobalto. Esta especificidad no es estrecha, ya que a dosis elevadas su efecto se puede manifestar en otros órganos, y en los mismos centros hematopoyéticos en dichas dosis puede llegar a inhibir en tal forma que aún la formación de la hemoglobina se detiene. Inhibida la respiración de los hematíes jóvenes por el cobalto estos lograrían ser lanzados a la circulación general muy particularmente los elementos reticulados, ocasionando la policitemia con características peculiares, muy distintas de las ocasionadas por otros mecanismos. La intensa regeneración de la médula ósea representaría un esfuerzo compensador, dada la alteración que se ha ocasionado a los mecanismos respiratorios de las células que lo integran. En la discusión del probable mecanismo de acción del ácido ascórbico, completaremos nuestro pensamiento con relación a este tema. Pero debemos dejar establecido

que nuestra hipótesis; si bien tiene algunas bases experimentales, para ser sostenida en forma definitiva, necesitaría más amplia comprobación.

CAPITULO IX

MECANISMO DE LA ACCION DEL ACIDO ASCORBICO EN LAS POLICITEMIAS OCASIONADAS POR EL COBALTO

Consideraciones generales.—Antes de abordar el tema, creemos necesario hacer una somera revisión de las principales propiedades del ácido ascórbico. Sin embargo, debemos adelantar que a pesar de numerosísimas investigaciones, poco sabemos del rol efectivo que desempeña esta vitamina en el organismo animal.

En los tejidos y líquidos de origen animal, el ácido ascórbico se halla, sobre todo, bajo la forma reducida, debido a diversos mecanismos protectores que inhiben su oxidación, o también por reducción del ácido ascórbico oxidado. Entre estos protectores, los de mayor importancia son las proteínas, el glutatión, otros compuestos con radical sulfhidrilo, purinas, creatinina, etc. Los extractos de diversos órganos (hígado, riñón, cerebro, suprarrenales) a un pH 7.2, son capaces de inhibir el poder catalítico del cobre en la oxidación del ácido ascórbico. Esta acción del cobre, de la hemina y hemocromógenos, in-vitro, es inhibida por dichas sustancias protectoras, posiblemente formando complejos con dicho metal. In-vitro, la acción catalizadora de los metales en la oxidación del ácido ascórbico es variable, así el cobalto es uno de los menos activos, y en ningún caso la reacción es reversible (219, 224, 225). En la sangre, existiría una enzima capaz de reducir el ácido ascórbico oxidado (219, 220, 221, 222; 253, 284). El ácido ascórbico oxidado se denomina ácido dehidroascórbico. Si a un animal administramos ácido dehidroascórbico, se observa que parte de éste se excreta como tal, otra parte es reducido sobre todo en el hígado, y una parte se degrada formando ácido diketogulónico que no es reversible y se excreta como tal. Parece que in-vitro, no existen pruebas demostrativas de la reversibilidad de la reacción : ácido ascórbico \rightleftharpoons ácido dehidroascórbico, aunque hay quienes sostienen que el sistema es reversible. Por otra parte, parece demostrado que el ácido

ascórbico no interviene como grupo prostético de enzimas, pero su conexión potencial con ciertos sistemas enzimáticos está probada, sobre todo, de ciertas enzimas hidrolíticas y si la reversibilidad del sistema ácido ascórbico \rightleftharpoons ácido dehidroascórbico existe, podría funcionar como transportador de hidrógeno o como un regulador del potencial óxido-reductor en las células, aunque a altas concentraciones, dicha vitamina se ha demostrado incapaz de tal función, sobre todo, cuando los sistemas enzimáticos están en su actividad normal. Lo cierto es que sólo hay posibilidad de que actúe como agente protector de sistemas enzimáticos más importantes o de transportador de hidrógeno. Si bien es verdad, que experimentos in-vitro, realizados por investigadores de hace algunos años, parecían demostrar que el ácido ascórbico incrementaba los procesos de óxido-reducción y en general el metabolismo celular (236, 237, 238), y que los tejidos de animales escorbúticos, mostraban baja del consumo de oxígeno corregibles por la administración de dicha vitamina (233, 234, 235), experimentos más recientes niegan estas aseveraciones (250, 251). Así mismo la posible oxidación del ácido ascórbico por acción de alguna deshidrogenasa y la probabilidad de que actúe como un catalizador intermediario entre metabolitos y el oxígeno, no parecen ser ciertos (243, 244, 245).

Sin embargo, el papel que como activador posee el ácido ascórbico sobre ciertas enzimas es admitido, al menos en lo que respecta a la papaina, catalasa, ureasa, fosfatasa, deshidrogenasa, arginasa, citocromo-oxidasa, etc. En el escorbuto, disminuye la actividad de ciertas enzimas, en particular de la estearasa, pareciendo actuar como coenzima. King (241) ha demostrado que no hay posibilidad de que el ácido ascórbico actúe como coenzima o formando parte en alguna forma de las enzimas, pero en los animales escorbúticos se observa disminución de la estearasa hepática, deshidrogenasa, succinasa muscular y moderada del citocromo-oxidasa muscular. Es también interesante observar que la acción de ciertos inhibidores es neutralizada por el ácido ascórbico; así sucede con el oro y arsénico sobre la colino-estearasa; también protege a muchas enzimas (pepsina, fosfatasa, etc.) (241, 242, 296, 285) de su inactivación por los rayos ultravioleta.

Si bien es cierto, que en los vegetales existe una enzima (complejo proteína-cobre) capaz de oxidar al ácido ascórbico y también la poli-fenol-oxidasa y la peroxidasa (246, 247, 248), en los tejidos animales no parece existir tal enzima, pero se cree que en el bazo, la peroxidasa, en presencia del peróxido de hidrógeno, es capaz de realizar su oxidación, no sucediendo tal en otros órganos como el hígado, riñón, etc. Se ha demostrado que el sistema citocromo C-citocromo-oxidasa es capaz de catalizar la oxidación del ácido ascórbico, pero los componentes de dicho sistema, en forma aislada, no son capaces de tal acción (244).

El potencial de óxido-reducción de la sangre normal se halla entre -90 a -110 m. v., pero en sujetos enfermos alcanza a -60 y -70, en casos severos llega hasta -50 m. v. La inyección de ácido ascórbico, de cisteína más ácido glutámico o hiposulfito de sodio, es capaz de aumentar tal potencial (248 a). Así mismo se ha observado que después de la inyección de 50 mgs. de ácido ascórbico por Kg. de peso corporal, el potencial oxido-reducción de todos los órganos baja, pero el del hígado aumenta luego de una disminución ligera; la primera fase (baja) se debería a su fuerte acción reductora, y la segunda fase (aumento) a la acción protectora del ácido ascórbico sobre la oxidación, al actuar las enzimas respiratorias (248 b).

Parece confirmada la idea de que en el organismo (animal y vegetal) el ácido ascórbico no sólo se hallaría libre, sino en parte unido a proteínas, que así representaría una reserva, o a otras sustancias (el ascorbígeno), aunque la composición exacta de este compuesto se desconoce, y también la de cierta forma compleja que se elimina en parte por el riñón (266, 227, 286).

Hay que admitir, aunque sin explicación satisfactoria (228, 229) (286, 287), la acción catalizadora del ácido ascórbico en ciertas reacciones de síntesis (reducciones, polimerizaciones) ya intra o extracelularmente; acción que es reforzada por la disminución de glucógeno en las deficiencias de vitamina C, lo que previene la oxidación de la adrenalina, probablemente interviene en la formación de esta hormona en la médula suprarrenal; además juega rol importante en el mantenimiento del estado coloidal, etc.

Los estudios experimentales llevados a cabo por Wolbach y colaboradores (289) (290) demuestran que el ácido ascórbico juega rol efectivo en la síntesis del material intracelular, traduciéndose por la conversión en gel del producto líquido que pasa a través de las membranas celulares. Si falta vitamina C (como en el escorbuto grave) no hay gelificación, tampoco se deposita colágeno en los tejidos fibrosos, ni en la matriz del tejido óseo, dentina, cartilago, endotelio vascular, y por lo general en el cemento intercelular de las células no epiteliales; todos estos trastornos son corregibles con la administración de ácido ascórbico. Recientemente estos estudios han sido objeto de algunas objeciones, pero sin lograr modificar el rol fundamental en lo que respecta a depósito de colágeno (291).

RELACIONES DEL ACIDO ASCORBICO CON EL GLUTATION

Existen ciertas relaciones entre el ácido ascórbico y el glutatión que hacen necesario examinarlas, porque servirán para fundamentar nuestra hipótesis sobre el mecanismo de acción del ácido ascórbico en la policitemia por cobalto. Tanto el ácido ascórbico como el glutatión se encuentran en las células animales, bajo la forma reducida; el cobre, la hemina, los hemocromógenos, actúan como catalizadores para su oxidación por el oxígeno del aire; no son autooxidables en el aire, tampoco son sistemas electromotivamente activos, sino perezosos sistemas de oxido-reducción, pero que por su alto poder reductor podrían jugar algún rol en las óxido-reducciones celulares (252, 267). Ya hemos indicado que entre las sustancias protectoras, en lo que respecta a la oxidación del ácido ascórbico, se halla el glutatión, y esta propiedad se debe a la capacidad que posee de formar complejos con el cobre (243, 253). Los extractos de diversos órganos y también la sangre tienen la capacidad de evitar la oxidación del ácido ascórbico; tal propiedad parece depender particularmente de su riqueza en glutatión; las sustancias que inhiben la acción del glutatión (yodo-acetatos, arsenitos, etc.) también anulan su acción protectora en lo que respecta a la oxidación del ácido ascórbico (254, 255, 256). La inhibición que ejercen los me-

tales pesados, los yodo-acetatos, el ácido maleico, sobre ciertos fermentos (deshidrogenasas, fosforilasas, proteinasas) es debida a su combinación con los radicales sulfhidrúlicos de dichas enzimas, pero la adición de glutatión reducido, cisteína o tiosulfato, logra neutralizar dicha acción inhibitoria; los grupos SH insolubles en ácidos, poseen similar papel protector al del glutatión (292).

El ácido ascórbico, a su vez, parece intervenir en el mantenimiento de la proporción de glutatión reducido tisular, en tanto que las nafto-quinonas, del oxidado, como si ambas sustancias trabajaran acopladas en los procesos de oxidación-reducción; el ácido ascórbico disminuiría la capacidad de oxidación de los tejidos, haciendo lo contrario las nafto-quinonas (258, 293). La administración parental de ácido ascórbico a conejos, es capaz de bajar la cantidad de glutatión oxidado en la sangre y su acumulación en los tejidos (259, 260); a su vez, la administración de glutatión, no sólo acarrea aumento de su cantidad en los órganos especialmente en el hígado, sino también la del ácido ascórbico (257); pero algunos sostienen que aún con altas dosis de ácido ascórbico no se logra en el hombre hacer variar la proporción de glutatión (294). Sin embargo, estudios recientes tratan de aclarar esta discrepancia, demostrando que el ácido ascórbico ejercería su acción en dos fases : en la primera hay baja del glutatión oxidado y en la segunda aumento, pero en casos patológicos, donde existe disminución del glutatión, v. g. enfermedad de Basedow, sólo se notaría la segunda fase, o sea aumento, como si el ácido ascórbico ejerciera una acción normalizante entre las dos formas de glutatión (295).

Por otra parte, se sostiene que cuando el abastecimiento de oxígeno a los tejidos es inadecuado, el glutatión representa el mecanismo de emergencia en la respiración celular; así se podría explicar el aumento de su cantidad en los hemátios y tejidos durante las anemias, intoxicaciones por la fenil hidracina, etc. Cuando baja la presión barométrica y se presenta un estado de anoxemia, el aumento de glutatión es más acentuado en los tejidos que en los eritrocitos, suponiendo algunos que el glutatión total sanguíneo bajaría para aumentar en los tejidos y luego volvería a cifras normales al admi-

nistrarse oxígeno. En la asfixia por comprensión de la tráquea, aumenta el glutation sanguíneo, cardiaco, pulmonar; de esta manera el glutation reducido protegería el consumo de oxígeno tisular. Experimentalmente se ha demostrado que en las intoxicaciones y en ciertas lesiones hepáticas (cirrosis), el glutation baja, probablemente por incapacidad de sintetizar dicha sustancia en el hígado. En las leucopenias se nota baja de glutation; en la policitemia vera, aumento, lo que ha permitido suponer algún rol en la regulación hematopoyética. Es interesante notar que en ciertas discrasias sanguíneas, se observa una relación inversa entre el glutation y el ácido ascórbico (a una baja de ácido ascórbico corresponde alza de glutation, y a la inversa). Sin embargo, no se ha podido probar el poder de dichas sustancias en la regeneración celular de la médula ósea; pero, es posible suponer que actúen de alguna manera en los sistemas de óxido-reducción celular: sustrato, deshidrogenasa, glutation, reductasas, ácido ascórbico (oxidado y reducido) por medio del cual el oxígeno es transferido al sustrato (252, 261, al 266).

Amino ácidos azufrados como la cistina y cisteina, que acusan funciones químicas semejantes al glutation, poseen ciertas relaciones con el ácido ascórbico; así, el efecto inhibitor que ejercen los metales pesados, los yodo-acetatos sobre las deshidrogenasas, fosforilasas, proteasas, etc., es neutralizado por el glutation y también por la cisteina. Así mismo, la cisteina es capaz de anular el poder tóxico de los derivados del benceno y naftaleno que llegan al organismo; parece que el mecanismo radica en la formación de compuestos de conjugación mercaptánica que luego se eliminan. Además, la cisteina tiene capacidad de reducir al ácido dehidroascórbico regenerando el ácido ascórbico, lo que impide la degradación del primero en ácido diketogulónico que es irreversible (297). La acción catalizadora del cobre en la oxidación del ácido ascórbico es inhibida por la cisteina (298). Ya en 1929, Michaelis y Guzmán-Barrón demostraron que el cobalto era capaz de formar complejos con la cisteina (299); por otra parte, debemos recordar que el efecto inhibitor del cobalto, sobre el desarrollo de las ratas, logra ser neutralizado por la cisteina, cistina y metionina (177).

EL ACIDO ASCORBICO EN LOS PROCESOS DE DESINTOXICACION

El organismo posee diversos mecanismos destinados a neutralizar los efectos tóxicos de ciertas sustancias de naturaleza química y biológica (toxinas); entre tales mecanismos debemos citar los de conjugación, oxidación, reducción, etc. Al hígado corresponde especialmente el rol de la conjugación de elementos tóxicos, muchos de estos formados en el propio organismo, para lo que utiliza especialmente el azufre de los amino ácidos sulfurados. A ello se debe el efecto benéfico de la administración de tales sustancias, particularmente la cistina. Pero, también el ácido ascórbico es capaz de coadyuvar en los procesos de desintoxicación, mediante procesos de reducción de las sustancias tóxicas (300, 301, 302). El ácido ascórbico no sólo ejercería acción benéfica sobre tóxicos químicos, sino también sobre las toxinas bacterianas; por este mecanismo se explicaría la disminución del ácido ascórbico en la sangre durante los procesos infecciosos; el complemento que contribuye a la destrucción bacteriana, parece guardar relación con la proporción de ácido ascórbico del organismo, creyéndose que éste intervendría en el mantenimiento de su potencial de óxido-reducción (303, 304). Ha sido comprobada la acción benéfica del ácido ascórbico en las intoxicaciones por sustancias químicas que llegan al organismo como medicamentos o accidentalmente; entre los tóxicos de tal acción debemos citar a las sales de plomo, bismuto, hierro, mercurio, arsénico, zinc, etc. Se supone que el ácido ascórbico lograría unirse a dichos metales para eliminarse por la vía renal en forma de complejo (ascorbígeno); lo mismo sucede con las toxinas, virus y sustancias anafilácticas (305). Las sales de hierro, arsénico y bismuto lograrían, según ciertos autores, bajar la proporción de ácido ascórbico sanguíneo (306, 307), aunque no es aceptado por otros (308). Ruskin (309, 310), que ha hecho estudios interesantes al respecto, cree que el ácido ascórbico actuaría como un vehículo molecular del bismuto, antimonio, arsénico, oro, etc., manteniéndolos en forma reducida, lo cual incrementaría el poder terapéutico de dichas sustancias, disminuiría su poder tóxico y suprimiría en gran parte las manifestaciones de hipersensibilidad con efec-

tos espectaculares en ciertas ocasiones (311, 312). Otro grupo de sustancias medicamentosas, tales como el piramidón, el mentol, la antipirina y similares, son capaces de disminuir la cantidad de ácido ascórbico en los tejidos, particularmente en las glándulas suprarrenales, lo que podría atribuirse a similar mecanismo (313). Experimentalmente se ha comprobado que el shock producido por el aceite de chaulmoogra con colesterol, es posible evitarlo con la administración intraperitoneal de ácido ascórbico (314). En las intoxicaciones por el bicloruro de mercurio, la administración de ácido ascórbico dentro de los diez minutos actúa como antídoto; si se mezclan ambas sustancias, antes de inyectarlas, el bicloruro de mercurio no ejerce acción tóxica por sufrir su reducción previa (315). El ácido ascórbico, en forma notable disminuiría la toxicidad del cianuro de potasio. El benceno, el tolueno, la acetona, la trinitroglicerina, etc. pierden, en gran parte, su efecto nocivo para el hombre, cuando existe suficiente aporte de ácido ascórbico (316, 317, 318). Experimentalmente se ha demostrado en ratas que algunas de dichas sustancias, traen consigo incremento de la síntesis de ácido ascórbico para subvenir las necesidades de la desintoxicación (319).

Cuando se hace la ligadura del colédoco, se ha comprobado que en la intoxicación por la colamina, mejora la función hepática y las condiciones generales del animal cuando se le administra ácido ascórbico por vía endovenosa (320). El poder de conjugación que posee el hígado, aumenta con la llegada al organismo de dicha vitamina, por lo que es utilizada en clínica para tratar procesos tóxicos, mejor aún si se asocia al glutatión (321, 322). Sustancias benéficas, como el calcio, la benzedrina, adrenalina, para los estados alérgicos, refuerzan su acción si son administrados junto con el ácido ascórbico (323). El efecto tóxico que ejerce la hidracina sobre el hígado, es neutralizado por el ácido ascórbico; en los animales esccrbúticos las lesiones hepáticas son severas cuando se administra la hidracina, suponiéndose que el ácido ascórbico facilitaría el metabolismo de los hidratos de carbono y proteínas, aunque el mecanismo verdadero no se conoce con exactitud (324).

EL ACIDO ASCORBICO Y LA SANGRE

Como hemos indicado, en capítulos anteriores, hay opiniones diversas con respecto al rol del ácido ascórbico en la regeneración sanguínea y las funciones que desempeña en la sangre misma.

En el escorbuto, a parte de la anemia sobre cuyo origen no hay acuerdo, es posible hallar hematopoyesis extramedular, y la actividad eritroblástica de la médula ósea se incrementa en estos casos con la administración de ácido ascórbico (289). Esta vitamina, administrada a conejos normales es capaz de hacer aumentar ligeramente el número de hematíes, sin variación de la cifra de leucocitos; tal incremento es más notable en los animales con anemia experimental por sangrías repetidas, acompañándose, en este caso, de reticulocitosis y aún aparición de normoblastos (275). En los niños de la primera infancia, el ácido ascórbico es capaz de provocar leucocitosis y moderada reticulocitosis, con incremento de la actividad normoblastica de la médula ósea (276). En la policitemia vera no se han obtenido resultados satisfactorios con la administración de ácido ascórbico (277), pero con la adición de bicarbonato de sodio se ha logrado alguna mejoría, a la vez se incrementaba el dintel de excreción de dicha vitamina por la orina (278).

Los estudios de Deeny y colaboradores (279), con respecto a este asunto, son muy interesantes; estos autores fundándose en estudios realizados por nosotros sobre la acción del ácido ascórbico en las policitemias por cobalto, tratan con altas dosis de esta vitamina dos casos de cianosis familiar idiopática con metahemoglobina, disnea, etc., logrando hacer subir al dintel normal la capacidad de saturación por oxígeno de la sangre, y también la cantidad de ácido ascórbico sanguíneo, a la vez baja la poliglobulia, reticulocitosis y metahemoglobina, desapareciendo la cianosis y otros signos clínicos. Otros investigadores (280) han llegado a similares conclusiones. No se conoce el mecanismo de su acción, pero Vetling (279) ha demostrado que el ácido ascórbico es capaz de hacer reducir cuantitativamente soluciones de metahemoglobina a pH 7. Pero, habría que suponer que en la cianosis existe algún trastorno celular que mantiene a la hemoglobina en su

forma oxidada (férica o metahemoglobina), y el ácido ascórbico reduciría a los compuesto ferri-hem, a ferro-hem, para así facilitar la utilización de éste en la síntesis de la hemoglobina.

En el metabolismo del hierro parece que el ácido ascórbico juega algún rol, al menos se deduce del resultado de algunas investigaciones; así, en la anemia perniciosa y en la anemia del escorbuto, el ácido ascórbico logra hacer subir la cifra de hierro del suero sanguíneo; se piensa que su rol radicaría en favorecer la absorción del hierro, suponiéndose que el efecto benéfico de su administración, unido al extracto hepático, se deba a esta propiedad (281, 282). En el escorbuto experimental, sabemos que no hay alteraciones del hierro tisular, pero existe baja en el suero sanguíneo; sabemos también que el hierro del suero representa el medio de transporte para la fabricación de hemoglobina; entonces, existe razón para suponer que el ácido ascórbico intervendría en esta baja del hierro plasmático (283). In-vitro, trabajando en atmósfera de nitrógeno, el ácido ascórbico sanguíneo es transferido a los leucocitos; los hematíes inhiben la oxidación por el aire de la vitamina presente en el suero, sin ser capaz de tomar el existente en el suero en la citada atmósfera de nitrógeno (274). Cuando las ratas, que son animales capaces de sintetizar el ácido ascórbico, son sometidas a una atmósfera de nitrógeno, se observa disminución de la riqueza en ácido ascórbico de los tejidos especialmente del hígado, riñón; también decrece su capacidad para retenerlo (272). En los animales escorbúticos, sometidos a condiciones hipoxémicas, se observa aumento del ácido láctico sanguíneo, el que se puede corregir con la administración de ácido ascórbico y mejor aún de glutathion (273). En presencia del peróxido de hidrógeno, el ácido ascórbico transforma a la hemoglobina (oxidada o reducida), en cooglobina, la que puede disociarse en globina, hidróxido de hierro y biliverdina; éste pigmento es capaz de ser reducido a bilirrubina por la misma vitamina (271).

DISCUSION

En el capítulo VI hemos dado cuenta de nuestros estudios sobre acción del ácido ascórbico en la policitemia por co-

balto. La administración de dicha vitamina, cuando la policitemia alcanza su acmé trae consigo la reducción del número de hematíes, hasta alcanzar cifras normales, en tanto que la cantidad de hemoglobina, también disminuye, pero con menor intensidad. Así mismo la reticulocitosis disminuye moderadamente, lo cual es índice de que el exceso de reticulocitos circulantes deben haber cumplido su ciclo, y que la disminución obedece a regresión de la médula ósea, antes hiperplástica, que cesa de lanzar hematíes jóvenes a circulación. La ausencia de hiperbilirrubinemia, en todos estos casos, es prueba de que la baja de hematíes no se debe a exagerada hemólisis. El ácido ascórbico no ejerce acción sobre el número de leucocitos, pero logra disminuir y aún hace desaparecer la eosinofilia que acompaña a la policitemia por cobalto.

La administración conjunta de ácido ascórbico y cobalto, desde el comienzo de los experimentos, comprende la segunda parte de esta serie de estudios. Su objetivo era descubrir si dicha vitamina era capaz de inhibir el poder policitémico del cobalto. En efecto, la policitemia no se desencadena en estas condiciones, o lo hace en forma moderada y tardía; pero, cuando suprimimos el ácido ascórbico y se continúa con cobalto solo, la policitemia aparece en forma severa; es de anotar que el efecto inhibitor del ácido ascórbico se ejerce en forma más acentuada sobre los hematíes que sobre la hemoglobina; en lo que respecta a reticulocitosis, el ácido ascórbico logra inhibir su aparición durante la primera semana, luego los reticulocitos suben ligeramente; pero, si suspendemos la administración del ácido ascórbico, la reticulocitosis alcanza cifras elevadísimas.

Como indicamos en la introducción, una nota preliminar de los primeros resultados de nuestros experimentos fué publicada en EE. UU., habiendo aparecido después algunos trabajos que confirman nuestros resultados, muy especialmente los de Davis (328), quien utilizando perros como animales de experiencia y conseguida la policitemia por cobalto, logra con la administración de ácido ascórbico yugular la policitemia, no así tratándose de eritrocitosis por baja tensión de oxígeno, lo que nos indica el distinto mecanismo de producción de ambas; supone que el cobalto actuaría interfiriendo la función

respiratoria del ácido ascórbico. El empleo de esta vitamina en la policitemia vera, ha dado resultados negativos en manos de varios investigadores; también hemos hecho referencia de su efecto benéfico en casos de cianosis familiar con metaemoglobinemia y eritrocitosis; por ello, es interesante observar, que nuestros hallazgos, puramente experimentales, hayan sido utilizados, con éxito, por los clínicos en esta enfermedad. Para poder explicar el mecanismo de la acción del ácido ascórbico, hemos estudiado, tal vez in-extenso, los datos sobre el rol fisiológico de esta vitamina, con el fin de buscar apoyo a la hipótesis que planteamos. Como el efecto inhibitor del ácido ascórbico en la policitemia por cobalto fuera señalado por nosotros por primera vez, no hemos podido contar con la revisión de datos similares, como lo hicimos al ocuparnos del mecanismo de acción del cobalto. En la revisión a que hemos aludido, ha quedado demostrado que no existe nada positivo con respecto al rol del ácido ascórbico en la hematopoyesis, tampoco parece actuar como enzima, coenzima o transportador de H_2 . Más bien es factible que intervenga como protector o regulador de sistemas enzimáticos; su rol como activador de diversas enzimas, (catalasa, ureasa, fosfatasa, deshidrogenasa succinica, arginasa, citocromo-oxidasa, etc.) es cierto, así en el escorbuto, muchas de las citadas enzimas muestran disminución de su actividad, aunque moderada en lo que respecta al citocromo-oxidasa (329). También está probado que el ácido ascórbico es capaz de neutralizar el poder inhibitor que ciertos metales pesados ejercen sobre varias enzimas; también inhibe la acción que los rayos ultravioleta realizan sobre determinados sistemas enzimáticos. Pero, la acción inhibitor que ejercen los metales pesados, los yodoacetatos, el ácido maleico, sobre las enzimas, se lleva a cabo por la unión de dichas sustancias con el grupo -SH de las enzimas, interviniendo la cisteína, el glutation, como neutralizadores, los que hacen recuperar la actividad de dichas enzimas.

Una cuestión interesante que se relaciona con nuestro tema es la observación clínica del efecto benéfico del ácido ascórbico frente a una serie de sustancias (metales, metaloides, sustancias orgánicas, toxinas, etc.) que llegan al organismo en forma accidental o medicamentosa; algunos creen que su

rol sería, en lo que respecta a ciertas sales metálicas y arsenicales, el de mantenerlos en su forma reducida, lo que incrementa el efecto terapéutico y anula la toxicidad. Esta acción del ácido ascórbico logra ejercerse aún sobre sustancias tan venenosas como el bicloruro de mercurio y los cianuros. Naturalmente que no se conoce el verdadero mecanismo de acción. Aun el poder de sulfo conjugación que posee el hígado, logra beneficiarse con el ácido ascórbico.

Ya hemos indicado la estrecha relación del ácido ascórbico con el glutatión y otros compuestos sulfhidrilados; estos son capaces de proteger al ácido ascórbico de su oxidación, reemplazándose mutuamente en ciertas de sus actividades fisiológicas. En algunos casos hay una relación inversa de la concentración de ambas sustancias, como sucede en la sangre, así la cantidad de glutatión de los hematíes varía inversamente a la riqueza en ácido ascórbico del plasma; si baja esta vitamina, hay alza de glutatión, lo que intervendría en hacer más lenta la aparición del escorbuto (330).

En la interpretación del mecanismo de acción del cobalto, hemos admitido que su efecto sería inhibiendo los grupos -SH de las enzimas y de los compuestos sulfhidrilados, alterando así la función enzimática y rompiendo el equilibrio del potencial óxido-reductor al que las células subsisten. En estas condiciones, la llegada en exceso, del ácido ascórbico intervendría, por una parte, uniéndose con el cobalto para formar complejos fáciles de excretarse, y por otra, manteniéndolo en forma reducida; de esta manera, las enzimas y compuestos afectados por el cobalto, recobrarían su actividad y se normalizaría también el potencial óxido-reductor de la célula. Si el ácido ascórbico es capaz de neutralizar la acción tóxica que ejercen una serie de metales, compuestos orgánicos, etc., es fácil suponer que posea rol similar en lo que respecta al cobalto. Una prueba más, en favor de esta hipótesis, la tendríamos en los estudios de respiración celular realizados por nosotros. En efecto, los elementos jóvenes lanzados por la médula ósea a la circulación general, recuperan rápidamente su actividad respiratoria, debido a la acción del ácido ascórbico presente en el plasma, es decir que interviene neutralizando el efecto del cobalto. Hemos anctado la presencia del ácido ascórbico en

el plasma y los leucocitos; pues bien, si en la sangre, eliminamos plasma y leucocitos y lo ponemos en contacto del cobalto, la inhibición es casi total. El efecto inhibitor que ejerce el cobalto en la médula y otros tejidos, es de menor grado, porque aquellos tejidos mantienen su riqueza en ácido ascórbico, haciéndose casi nula en determinados tejidos.

CONCLUSIONES

Los estudios experimentales, que hemos llevado a cabo con respecto a la policitemia por cobalto y la acción del ácido ascórbico sobre dicha policitemia, nos permiten llegar a las conclusiones siguientes:

- 1.—La administración intramuscular de sulfato de cobalto en conejos, es capaz de ocasionar un cuadro policitémico, con incremento del número de hematias, de la cantidad de hemoglobina, marcada reticulocitosis, moderada eosinofilia; pero, sin variaciones del número de leucocitos, ni de la proporción de proteínas plasmáticas.
- 2.—Los estudios histológicos, en dicha policitemia, demuestran que existe hiperplasia de la médula ósea, exclusivamente de la serie eritropoyética tipo normoblástico; en lo que respecta a los otros órganos examinados, no existen alteraciones notables.
- 3.—La policitemia por cobalto se desencadena también en animales esplenectomizados. La administración de extracto hepático no tiene influencia en el desarrollo de dicha policitemia.
- 4.—El estudio de la respiración celular demuestra incremento del consumo de oxígeno por las células rojas de la sangre policitémica y la magnitud de consumo guarda relación con la cantidad de normoblastos y reticulocitos presentes.
- 5.—En experimentos in-vitro de respiración celular, el cobalto es capaz de inhibir el consumo de oxígeno, sobre

todo en la sangre que posee abundantes normoblastos y reticulocitos; en tanto, que la inhibición ejercida sobre la médula ósea es la más moderada, y es casi nula en los otros tejidos.

- 6.—El posible mecanismo de acción del cobalto se podría interpretar en el sentido de que inhibiría a ciertos sistemas enzimáticos que poseen el grupo -SH y otros compuestos que también poseen dicho radical, contribuyendo además a hacer variar el potencial oxido-reductor adecuado a la subsistencia de la célula. Inhibida la respiración de las células jóvenes de la médula ósea (normoblastos, reticulocitos), éstos serían lanzados a la circulación general, trayendo consigo el cuadro policitémico. La hiperplasia eritropoyética de la médula ósea representaría un esfuerzo compensador a la anoxia por alteración en los sistemas enzimáticos de la respiración celular.
- 7.—El ácido ascórbico o vitamina C es capaz de neutralizar la acción policitemiante del cobalto y cuando se le administra a los animales en plena policitemia, yugula las alteraciones hemáticas ya señaladas. Esta propiedad del ácido ascórbico, demostrada por nosotros en los conejos, ha sido confirmada por Davis en otros animales (perros) y aún lo han empleado con éxito en la clínica para el tratamiento de la cianosis familiar con policitemia.
- 8.—El posible mecanismo de acción del ácido ascórbico en las policitemias por cobalto, lo interpretamos en el sentido de que dicha vitamina formaría con el cobalto complejos fáciles de excretarse por la vía renal, al igual que parece hacerlo con otras sustancias tóxicas; además, los mantendría en forma reducida, protegiendo así a las enzimas y compuestos susceptibles de ser inhibidos por el cobalto y otros tóxicos; por otro lado, se restablece el potencial óxido reductor, lo que permite la normal actividad celular.
- 9.—Abogan a favor de esta hipótesis las múltiples experiencias clínicas, en lo que respecta al rol del ácido ascórbico.

co frente a los tóxicos y toxinas; también tenemos a favor, los estudios de respiración celular realizados por nosotros; así los hematíes jóvenes al llegar a la circulación recobran su capacidad respiratoria, por hallar en la sangre buena cantidad de ácido ascórbico, capaz de inhibir al cobalto que arrastraban, en tanto que si se hace actuar este catión sobre los hematíes sin leucocitos ni plasma, la inhibición es casi completa. En los demás tejidos la inhibición *in vitro* es moderada o nula porque se ha utilizado tejido íntegro con sus reservas de ácido ascórbico.

- 10.—Creemos, que para admitir en forma definitiva estas hipótesis, precisan algunos estudios, que esperamos realizarlos en su oportunidad.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Bertrand G., Mokraguatis M.; Bull. Soc. Chim., 31 : 940 (1922).
- (2) Bertrand G., Mokraguatis M.; Bull. Soc. Chim., 37 : 326 (1925)
- (3) Bertrand G., Mokraguatis M.; Bull. Soc. Chim., 37 : 556 (1925).
- (4) Bertrand G., Mokraguatis M.; An. Inst. Pasteur, 44 : 543 (1930).
- (5) Bertrand G., Macheboeuf M.; Bull. Soc. Chim., 37 : 934 (1925).
- (6) Bertrand G., Macheboeuf M.; Bull. Soc. Chim., 39 : 942 y 1646 (1926).
- (7) Hargue Mc.; Ind. Eng. Chem. (An. Ed.), 19 : 1 (1927).
- (8) Fox H. Ramage H.; Nature, 126 : 682 (1930), y Proc. of the Royal Soc. of London, 108 : 164 (1930).
- (9) Dutoil P., Ibinden Ch.; Com. Rend. Ac. Sci., 190 : 172 (1930).
- (10) Stare F. J., Elvehjem C. A.; J. Biol. Chem., 99 : 473 (1933).
- (11) Butkewitsch W. G.; Bioch. Z., 132 : 556 (1922).
- (12) Le Goff J. M.; Gaz. des Hosp., 99 : 1646 (1926).
- (13) Waltner K.; Arch. f. Exp. Pathol. Pharm., 141 : (1929).
- (14) Orten J. M., Aline F., Lewis R. C.; J. Biol. Chem., 96 : 1 (1932); id., 91 : 13 (1931).
- (15) Bertrand G., Nakamura H.; Bull. Soc. Chim. Bio., 16 : 1366 (1934).
- (16) Underwood E. J., Filmer F.; Austr. Veter. J., 11 : 89 (1935).
- (17) Marston y Lines; Counc. Sci. Ind. Res. Austr.; 8 : 111-117 (1935).
- (18) Askew. Dixon; New Zealand. J. Sci. Tech., 18 : 73-688 (1936); id., 19 : 317 (1937).
- (19) Denhan H. G.; Science, 85 : 383 (1937).
- (20) Neal W. M., Ahman C. F.; J. Daily. Sci., 20 : 741 (1937).

(*) La primera cifra después del nombre de la revista indica el N° del volumen; la 2ª el N° de la pág.; la última, entre paréntesis, el año de publicación.

- (21) Zepelin V., Glas W., Enhar. Pflauze, 34 : 189 (1938).
- (22) Corner H. H.: Agr. Progress, 16 : 181 (1939).
- (23) Kilham B. J.: J. Am. Veter. Med. Ass., 99 : 279 (1941).
- (24) Bennetsi H. W.: Dept. Agr. W. Austr., 17 : 41 (1940).
- (25) Clark A.: J. Trop. Med. Hyg., 43 : 52 (1940).
- (26) Fairbanks B. W.: N. Am. Veter., 20 : 33 (1939).
- (27) Mathews; Physiol. Chem., 1447 (1939).
- (28) Underwood E. J.; Elvehjem C. A.; Biol. Chem., 124 : 419 (1938).
- (29) Frost D. V., Elvehjem C. A., Hart E. B.; J. Nutr., 21 : 93 (1941).
- (30) Le Goff J. M.; J. Pharmacol., 38 : 51 (1930).
- (31) Untersteiner L.; Arch. Inter. Pharmacol., 41 : 410 (1931).
- (32) Simesen M.; Arch. Inter. Pharmacol., 62 : 347 (1939).
- (33) Villaret M., Bertrand L., Bezancon L. J. y Even R.; C. Rend. Soc. Biol., 108 : 956 (1931).
- (34) Schultze M.; Klin. Woch., 11 : 497 (1932).
- (35) Sheldon J. H.; Brit. Med. J., 1 : 47 (1934).
- (36) Kato K.; J. Pedriat., 11 : 385 (1937).
- (37) Penati F., Vigliani E. C., Ruata R.; Ras. Med. Inve., 10 : 458 (1939).
- (38) Bertrand G., Macheboeuf M.; C. Rend. Ac. Sci., 182 : 1504 (1936); id. 183 : 5-257 (1926).
- (39) RATHERI F., Ravina L.; C. Rend. Ac. Sci., 183 : 326 (1926).
- (40) Blatherwick, Sahyun M.; Am. J. Physiol., 81 : 560 (1927).
- (41) Azari; Orosi Helitap, 33 : (1879) (cit. por Mascherpa 45).
- (42) Stuard S.; Arch. f. Exper. Path. Pharm., 18 : 151 (1884).
- (43) Coppole A.; Sperimentale, 55 (1885) (Cit. por Mascherpa 45).
- (44) Waltner K.; Klin. Woch., 8 : 313 (1929).
- (45) Mascherpa P.; Arch. Ital. de Biol., 82 : 112 (1930).
- (46) Orten J. M., Aline F., Mugrave E. R., Lewis R. C.; Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 29 : 174 (1931).
- (47) Orten J. M., Aline F., Mugrave E. R., Lewis R. C.; J. Biol. Chem., 99 : 457 (1932).
- (48) Orten J. M., Aline F., Mugrave E. R., Lewis R. C.; J. Biol. Chem., 99 : 465 (1932).
- (49) Kleimberg W.; Am. J. Physiol., 108 : 545 (1934).
- (50) Sutter J.; Com. Rend. Soc. Biol., 116 : 994 (1934).
- (51) Beard H. H., Andes E. J.; Am. J. Physiol., 109 : 318 (1936).
- (52) Brand E., Stucky Ch.; Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 31 : 739 (1934).
- (53) Davis J. A.; Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 37 : 96 (1937).
- (54) Josland S. J., Mc. Naught K. J.; New Zealand. J. Sci. Tech., 19 : 536 (1938).
- (55) Kleimberg W., Gordon A. S., Charifer H. A.; Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 42 : 119 (1939).
- (56) Plonnski M., Briskas S.; Com. Rend. Soc. Biol., 130 : 1580-1590 (1939).
- (57) Baxter C. R.; Brit. Med. J., 534 (1939).
- (58) Cronin E.; Brit. Med. J., 643 (1939).
- (59) Schultz M. O.; Physiol. Rev., 20 : 37 (1940).
- (60) Brewer G.; Am. J. Physiol., 128 : 345 (1940).
- (61) Davis J. E.; Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 54 : 671 (1940).

- (62) Michelazzi A. M., Soriano M.; Arch. Sci. Biol., 26 : 515 (1940).
- (63) Wong S. Y.; J. Biol. Chem., 77 : 409 (1928).
- (64) Klett- Summerson; Klett Manufacturing Co., N. York.
- (65) Van Slyke D., Mc. Neill.; Cuant. Clinical Chemistry, Baltimore (1932).
- (66) Brunett; Bull. J. Hopking's Hosp., 37 : 14 (1925).
- (67) Buchrell, Bangs; J. Inf. Disease, 39 : 291 (1926).
- (68) Jackson, Stowall; J. Lab. Clin. Med., 16 : 82 (1930).
- (69) Wintrobe M.; Medicine, 9 : 175 (1930).
- (70) Cheng S. C.; Am. J. Hvg., 11 : 449 (1930).
- (71) Scarborough R. A.; Yale J. Biol. Med., 3 : 63 (1931).
- (72) Rosakn P. D., Pearce L.; J. Exper. Med., 60 : 687 (1934).
- (73) Wintrobe M., Schoemaker S., Schmidt A.; Am. J. Physiol., 114 : 502 (1936).
- (74) Casay A. E., Roshan P. D., Pearce L.; J. Exper. Med., 64 : 453 (1936).
- (75) Craige H. H. —citado por J. Kolmer y F. Boerner—; Aprobad Laboratory Tech., 62 (1941).
- (76) Nicastor G.; Hematólogica, 20 : 645 (1939).
- (77) Kirk R. C.; J. Lab. and Clin. Med., 23 : 1137 (1938).
- (78) Wintrobe M.; Clinical Hematology Philadelphia, 134 (1942).
- (79) Sternberg L.; Am. J. Med. Sci., 176 : 82 (1928).
- (80) Campell A. C., Drennan A. K., Rettie J. J.; J. Pathol. and Bact., 40 : 537 (1935).
- (81) Whitaker W. M.; Arch. Dis. Chil., 5 : 44 (1930).
- (82) Banerji N.; Am. J. Med. Sci., 186 : 689 (1933).
- (83) Chillingworth F. P., Helay J. C., Haskin F. L.; J. Lab. and Clin. Med., 19 : 486 (1934).
- (84) Landsteiner K.; New England J. Med., 215 : 1199 (1936).
- (85) Wintrobe M.; Clinical Hematology, Philad., 71 (1942).
- (86) Orten J. M.; J. Biol. Chem., 123 : XC (1938).
- (87) Krumbhaar E. B.; Am. J. Med. Sci., 184 : 215 (1932).
- (88) Cruz W. O., Robbins F. S.; Am. J. Med. Sci., 203 : 28 (1942).
- (89) Barcroft J.; Am. J. Med. Sci., 179 : 1 (1930).
- (90) Gonzales Olaechea M.; La. Crónica Médica, 13 : 447 (1896).
- (91) Perla D.; The Spleen and Resistance, Williams & Wilhins Co. (1935); cita a Yesas Cresole.
- (92) Cumingham J.; Bioch. J., 25 : 1267 (1931) .
- (93) Corfer H. J.; J. Infect. Disease, 15 : 518 (1914).
- (94) Cook C. F., Spilles N. M.; Am. J. Physiol., 98 : 629 (1933).
- (95) Izquierdo J. J., Cannon W. B.; Am. J. Physiol., 84 : 545 (1928).
- (96) Eberth R. V., Stead E. A.; Am. J. Med. Sci., 201 : 655 (1941).
- (97) Lamson P. D.; J. of Pharma. and Exp. Therap., 7 : 170 (1915).
- (98) Barcroft J.; J. Physiol., 58 : 138 (1923); id., 60 : 79 y 443 (1925); id., 64 : 1 (1927); id., 66 : 231 (1928).
- (99) Drastich L.; Bioch. Z., 195, 189 (1928).
- (100) Bock H., Frenzel B.; Klin. Woch., 17 : 1315 (1938).
- (101) Harrop G. A.; Wintrobe M. M.; Hematology, 4 : 2366 (1938).
- (102) Bernald W., Arsenau J. H., Dooley E. Pmc. Soc. Exp. Biol. Med., 32 : 430 (1934).

- (103) Minot G. R., Murphy W. P.; J. Am. Med. Ass., 87 : 470 (1926).
- (104) Watking, Johnson y Bergland; Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (Sci. 175 : 581), 25 : 720, 835 (1928).
- (105) Minot G., Murphy W. P. Stetson S. Am. J. Med. Sci., 175 : 581 (1928).
- (106) Cornell G. Canad. Med. Asos. J., 441 (1928).
- (107) Crane M., Howard I., Murphy W.; J. Am. Med. Sci., 180 : 803 (1930).
- (108) Stephan P.; Klin. Woch., 9 : 1068 (1930)
- (109) Mayor R.; J. Lab. Clin. Med., 24 : 109 (1938).
- (110) Hanson y Marshall; Am. J. Physiol., 114 : 194 (1935).
- (111) Anderson H. D., Underwood E. J., Elvehjen C. A.; Am. J. Physiol., 130 : 373 (1940).
- (112) Davis J. E.; Am. J. Physiol., 122 : 397 (1938).
- (113) Davis J. E.; Am. J. Physiol., 127 : 322 (1939).
- (114) Davis J. E.; Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 40 : 445 (1939).
- (115) Davis J. E.; J. Pharmacologic., 70 : 408 (1940).
- (116) Meyer O., Thewlis E.; Lab. Clin. Med., 26 : 1137 (1941).
- (117) Mascherpa P., Callegari L.; Arch. Exp. Pathol. Pharmac., 169 : 206 (1933).
- (118) Sannié C., Verne J.; Com. Rend. Soc. Biol., 199 : 389 (1934).
- (119) J. Am. Pharm. Asos., 27 : 174, 629 (1938).
- (120) Brown G. E., Griffin H. Z.; Am. J. Med. Sci., 166 : 489 (1923).
- (121) Beathie J. M., Carnegie, Dickson W. E.; Text. Book of Pathology, C. B. Mosby (1926).
- (122) Harrop G. A.; Medicine, 7 : 291 (1928).
- (123) Hirsch E. F.; Arch. of Pathol., 19 : 91 (1935).
- (124) Resnikoff, Chandlern; Bethea J. Am. J. Med. Sci., 189 : 753 (1935).
- (125) Jaffe R. H.; J. Am. Med. Asos., 107 : 124 (1936).
- (126) Pack G., Craver L.; J. Am. Med. Sci., 180 : 609 (1930).
- (127) Hurtado A.; Rev. Med. Peruana, 2 : 335 (1930).
- (128) Hurtado A.; Am. J. Phys. Anthropol., 17 : 137 (1932).
- (129) Mori Chávez P., Anales de la Fac. de Medicina, Lima, 19 : 137 (1936).
- (130) Mori Chávez P.; Manifestaciones pulmonares del cuy en el soroche agudo : Tesis, Lima, Perú (1936).
- (131) Marshall H.; Am. J. Physiol., 122 : 397 (1938).
- (132) Kato K.; Science, 85 : 2193 (1937).
- (133) Mascherpa P.; Boll. Soc. itali. Biol. Sperim., 13 : 741 (1938).
- (134) Cannava A.; Orch. Sci. Biol., 25 : 309 (1939).
- (135) Hess A. F.; Scurvy, Past and Present- J. B. Lippincot. Philadelphia (1920).
- (136) Minot G., Mettier S., Townsend W.; Amer. J. Med. Ass., 95 : 1089 (1930).
- (137) Meltier S., Chew W. C.; J. Exper. Med., 55 : 971 (1932).
- (138) Ohata S.; J. of Biochem., 10 : 16-191 - 207 (1932).
- (139) Diblisk B., Cucera C.; Com. Rend. Soc. Biol., 113 : 638 (1933).
- (140) Presnell A. K., J. of Nutrition, 8 : 69 (1934).
- (141) Kreitmair S.; Arch. fur Exper. Pathol. Pharm., 2 y 3 : 176 (1934).
- (142) Dunlop L. G., Scarborough H.; Edinburg Med. J., 42 : 476-82 (1935).
- (143) Parson L. M., Hawsksley J. C.; Arch. Dis. Childhood, 8 : 117 (1933).
- (144) Gingol N.; Sang., 11 : 392 (1937).

- (145) Eufinger H., Gaethgens G.; *Klin. Woch.*, 15 : 150; (1936).
- (146) Halk H.; *Deutch. Med. Woch.*, 65 : 1624 (1939).
- (147) Carrié C., Schnettler O.; citado por *Am. Rev. of Physiol.* 3 : 283 (1941).
- (148) D'Alessandro R.; *Minerva Médica*, 2 : 273 (1939).
- (149) Giaugrasso G.; *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 14 : 528 (1939).
- (150) Hans C., Aron S., *J. Nutrition*, 18 : 375 (1939).
- (151) Lozner E. L.; *New England J. Med.*, 224 : 265 (1941).
- (152) Seyderhelm R., Gebe H.; *Vitamine and But- Monografia- J. A. Barth. Leipzig* (1935).
- (153) Naccari A., *Giorn. Bacteriol. Inmun.*, 20 : 1042; (1938).
- (154) Rohmer P., Bezssonoff N., Schneegans S.; *Com. Rend. Soc. Biol.*, 127 : 1279 (1938).
- (156) Pijoan M.; *Science*, 86 : 80 (1937).
- (156) Heilmeyer H.; *Deutch Arch. F. Klin Med.*, 179 : 216 (1936)
- (157) Glanzman E.; *Schwei. Med. Woch.*, 67 : 436 (1937).
- (158) Friend Dale., *New England J. Med.*, 219 : 910 (1938).
- (159) Stoia J., Stanculesco P.; *Romania Médica*, marzo I : 67 (1938).
- (160) Thiele W.; *Klin. Woch.*, 17 : 150 (1938).
- (161) Holmes H. N., Campell N., Amberg E. J.; *J. Lab. Clin. Med.*, 24 : 119 (1939).
- (162) Warburg O.; *Zeit. Physiol. Chem.*, 160 : 112 (1909).
- (163) Morawitz P., Itami S.; *Deutch Arch. Klin. Med.*, 100 : 191 (1910).
- (164) Michaelis L., Salomón J.; *J. Gen. Physiol.*, 13 : 683 (1930).
- (165) Wright P. G.; *J. Gener. Physiol.*, 14 : 201 (1930).
- (166) Ramsey R., Warren C. O.; *Quart. Exper. Physiol.*, 22 : 49 (1932).
- (167) Harrop S. A.; *Arch. Int. Med.*, 23 : 745 (1919).
- (168) Harrop G. A., Guzmán Barrón E. S.; *J. Exper. Med.*, 48 : 207 (1938).
- (169) Kempner W.; *J. Clin. Invest.*, 15 : 679 (1936).
- (170) Winterstein H.; *J. Bioch. Zeit.*, 46 : 440 (1912).
- (171) Shohl A.; *Mineral Metabolism* : pg. 237, New York (1939).
- (172) Copp D. H., Greemberg D. M.; *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 26 : 448 (1940).
- (173) Kent L. N., Mc. Came R. A.; *Bioch. J.*, 35 : 877 (1941).
- (174) Greemberg D. M., Copp D. H.; *Nat. Acad. Sci. U. S.*, 27 : 153 (1942).
- (175) Hellerman L., Perkins M. E.; *J. Bio. Chem.*, 112 : 175 (1935).
- (175a) Shills M., Mc. Collum E. V.; *Handbook of Nutrition*, pg. 161 (1943).
- (176) Michaelis L., Guzmán Barrón E. S.; *J. Biol. Chem.*, 83 : 191 (1929).
- (177) Griffith W. H., Parcek P. L., Mulford D. J.; *J. Nutr.*, 23 : 603 (1942).
- (178) Starkenstein E.; *Chem. Wekblad.* 37 : 106 (1941).
- (179) Korricz M.; *Ann. d. Anat. Path.*, 12 : 501 (1935).
- (180) Snllman; *Farmacölogy*, pg. 1117 (1942).
- (181) Goodman, Silman; *The pharmacological Basis of Therapeutic*, pg. 762 (1942).
- (182) Holden H. F.; *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 19 : 89 (1941).
- (183) Kato K., Iob V.; *Am. J. Clin. Path.*, 10 : 763 (1940).
- (184) Shohl T.; *Mineral Metabolis*, pg. 204 (1939).
- (185) Potter V. R., Elvhjem C. A., Hart E. B.; *J. Biol. Chem.*, 126 : 155 (1938).
- (186) Marston H. R.; *Australian Counc. Sci. Research Bull.*, 113 : 14 (1938).

- (187) Orten J. M.: Proc. Soc. Biol. Chem., 35 : 9 (1941).
- (188) Frost D. V., Elvehjem C. A., Hart E. B.: J. Nutrition, 21 : 93 (1941).
- (189) Frost D. V., Spitzer E. H., Elvehjem C. A., Hart E. B.: Am. J. Physiol. 134 : 7116 (1941).
- (190) Robscheit, Robbins F. S., Wipple S. H., J. Exp. Med.: 75 : 481 (1942).
- (191) Brewer G.: Am. J. Physiol., 118 : 207 (1937).
- (192) Davis J. E.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 37 : 96 (1937).
- (193) Michelazzi M.: Arch. Sci. Biol., 26 : 513 (1940).
- (194) Caujolle: J. Pharm. Chim., 29 : 410 (1939).
- (195) Underwood E. J.: Nutrit. Abstracts 8 Revs., 9 : 520 (1940).
- (196) Maynard L. A.: Am. Rev. of Biochemistry, 10 : 449 (1941).
- (197) Marston H. R.: Am. Rev. of Biochemistry, 10 : 573 (1941).
- (198) Browstead J. E., Saknille J. P., Sinclair R. D.: Sci. Agric., 22 : 314 (1942).
- (198a) Mc. Cande R. A.: Rev. Clin. Española: 8 : 371 (1943).
- (198b) Waltner K.: Acta Pediatr., 11 : 438 (1930).
- (198c) Baxter C. R.: Brit. Med Jour., 1 : 534 (1939).
- (198d) Cronin E.: Brit. Med. Jour., 1 : 643 (1939).
- (199) Myers V. M., Beard H., Barnes B.: J. Biol. Chem., 94 : 117 (1931).
- (200) Orten J. M.: Am. Jour. Physiol., 114 : 414 (1936).
- (201) Houker S. B.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 28 : 310 (1930).
- (202) Verzar E., Arvay A., Peter J., Sholderer H.: Bioch. Z., 257 : 113 (1933).
- (203) Davis J. E.: J. Pharmacol & Exper. Therap., 73 : 162 (1941).
- (204) Davis J. E.: Am. Jour. Physiol., 134 : 219 (1941).
- (205) Davis J. E., Harris A. M.: Am. Jour. Physiol., 137 : 94 (1942).
- (206) Barcroft J.: Lancet, 2 : 485 (1920).
- (207) Peter J., Van Slyke D.: Quantitative Clinical Chemistry, pg. 605. Baltimore (1932).
- (208) Keilin D.: Proc. Royal Soc., 98 : 312 (1925).
- (209) Monge C. y colaboradores; An. de la Fac. de Ci. Med., 10 : 1 (1928).
- (210) Monge C.; Les erythremies de l'altitude. Paris (1929).
- (211) Monge C., Encinas E., Cervelli M., Pesce H., Villa-García H.: An. Fac. Cie. Med., 17 : 1 (1935).
- (212) Monge C.: Arch. Int. Med.; 58 : 32 (1937).
- (213) Monge C.: Science, 95 : 79 (1942).
- (214) Hurtado A.: Am. Jour. Physiol., 100 : 487 (1932).
- (215) Hurtado A.: Am. Jour. Physiol. Anthrop., 17 : 137 (1932).
- (215a) Hurtado A.: Aspectos fisiopatológicos de la vida en la Altura, Lima. (1937).
- (216) Lowenhaupt E.: J. Lab. Clin. Med., 27 : 874 (1942).
- (217) Guzmán Barrón E. S., Dill D. B., Edwards H. T., Hurtado A.: Jour. Clin. Investig., 16 : 541 (1937).
- (218) Hurtado A.; Aspectos fisiológicos y patológicos de la vida en las alturas, (1937).
- (219) Guzmán Barrón E. S., De Meio R. H., Klemperer F.: J. Biol. Chem., 112 : 625 (1936).

- (220) Guzmán Barrón E. S., Guzmán Barrón A., Klemperer F.: *J. Biol. Chem.*, 116 : 563 (1936).
- (221) Giri K. V., Shourie K. L.: *J. Indian Med. Research*, 27 : 685 (1940).
- (222) Roe F. H., Barnun G. L.: *J. Nutrition*, 11 : 359 (1936).
- (223) Ball E. G. J.: *J. Biol. Chem.*, 118 : 219 (1937).
- (224) Bragagnolo G.: *Anu. Chim. Applicata*, 31 : 350 (1941).
- (225) Tapia Freses A.: *Las Vitaminas*, Lima (1941).
- (226) Holtz P., Walter H.: *J. Physiol. Chem.*, 263 : 187 (1940).
- (227) Saha K. C., Majundar A. C., Guha B. C.: *J. Biochem. Exper. Med.*, 1 : 135 (1941) c. f. *C. A.* 34, 2473 I.
- (228) Numata F.: *J. Biochem.*, 32 : 281 (1940).
- (229) Girond A., Leblond C. P.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 16 : 1352 (1934).
- (230) Bourne G.: *Physilg. Reviews*, 16 : 448 (1936).
- (231) Dalldorf G.: *The Vitamina*, Chicago, pg. 339 (1939).
- (232) Friederbaum J., Tislowitz R.: *J. Exp. Med.*, 97 : 121 (1935).
- (233) Hamson D. C.: *Biochem. J.*, 27 : 1501 (1933).
- (234) King C. G.: *Physiol. Reviews*, 16 : 2381 (1936).
- (235) Baucke J.: *Arch. ges. Physiol.*, 241 : 392 (1939).
- (236) Nunila A., Amorin M., Vovelsinger: *Anal. Asoc. Quim. Farm., Uruguay.*, 42 : 104 (1939).
- (237) Lakhano F. V.: *Biochem. J. (Ukraine)*, 15 : 115 (1940).
- (238) Piery M., Cordier V., Enselmc J.: *Bull. Acad. Med.*, 123 (1940).
- (239) Naccary A.: *Giorn. Batteriol. Immunol.*, 20 : 1042 (1938).
- (240) Harrer C. J., King C. G.: *J. Biol. Chem.*, 138 : 111 (1941).
- (241) Giri K. V.: *J. Indian Chem. Soc.*, 18 : 141 (1941).
- (242) Giuseppe Dessy: *Arch. studio fisiopatol. clin. ricambio*; 6 : 187 (1938).
- (243) Borsook H., Devempport H. W., Jeffrey C. E. P., Warner R. C.: *J. Biol. Chem.*; 117 : 237 (1937).
- (244) Keilin D., Hartree E. F.: *Proc. Royal Soc. B.*, 124 : 397 (1938).
- (245) Keilin D., Hartree E. F.: *Proc. Royal Soc. B.*, 125 : 171 (1938).
- (246) Lovett Janisson P. L., Nelson J. M.: *J. Chem. Soc.*, 62 : 1409 (1940).
- (247) Stolz E., Harrer L., Schultz M. O., King C. G.: *J. Biol. Chem.* 122 : 407 (1938).
- (248) Ramasarma, Dalton, Doctor: *Enzimology*, 8 : 108 (1940).
- (248a) Mier L.: *Bioch. Z.*, 303 : 32 (1939).
- (248b) Araki T.: *Oriental Jour. Dise. Infants*, 25 : 23 (1939).
- (249) Penney J. R., Silva S. S.: *Biochem. J.*, 37 : 403 (1943).
- (250) King C. G.: *Col'd Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 7 : 135 (1939).
- (251) Schultze M. O., Harrer C. J., King C. G.: *J. Biol. Chem.*, 131 : 5 (1939).
- (252) Lyman C., Guzmán Barrón E. S.: *J. Biol. Chem.*, 121 : 257 (1937).
- (253) Hopkins F. G., Morgan E. J.: *Biochem. J.*, 30 : 1446 (1936).
- (254) Kitinosnke H. J.: *Agric. Chem. Soc., Japan*, 16 : 649 (1940).
- (255) Kitinosnke H. J.: *Agric. Chem. Soc., Japan*, 16 : 92 (1940).
- (256) Schultze M. O., Stotz E., King C. G.: *J. Biol. Chem.*, 122 : 395 (1938).
- (257) Raabe S.: *Bioch. Jour. Z.*, 299 : 141 (1938).
- (258) Levine R., Hechter O., Grossman A., Soskin S.: *Proc. Soc. Exper. Biol.-Med.*, 40 : 525 (1939).
- (259) Gedda L., Pignatelli A.: *Minerva Med.*, 1 : 525 (1940).

- (260) Miraglia M.: *Pediatría*, 48 : 369 (1940).
- (261) Castex M., Schesteingart M.: *Rev. Asoc. Med. Argenti.*, 51 : 579 (1937).
- (262) Binet L., Bochet M.: *Compt. rend. Soc. Biol.*, 126 : 674 (1937).
- (263) Guzmán Barrón E. S.: *Bol. Soc. Quím. Perú.*, 4 : 243 (1938).
- (264) Kandel E. V., Levy G. V.: *J. Lab. & Clin. Med.*, 24 : 669 (1939).
- (265) Handovsky H.: *Klin. Woch.*, 9 : 937 (1930).
- (266) Prunty F. T. G.: *Bioch. J.*, 37 : 506 (1943).
- (267) Guzmán Barrón E. S.: *Am. Review of Biochemistry*, 10 : 1 (1941).
- (268) Steinman H. S., Dawson C. R.: *J. Am. Chem. Soc.*, 64 : 1212 (1942).
- (269) Goldehtein B. I., Volkenzon D. V.: *Biokhimiya*, 4 : 457 (1939).
- (270) Green D. E.: *Mechanism of Biological oxidations*, Cadbridge. pg. 32 (1941).
- (271) Lemberg R., Legge J. W., Lockwood W. H.: *Biochem. J.*, 35 : 328 (1941).
- (272) Kratinova E. R., Buton M. L.: *Med. Exper.*, 3 : 58 (1940).
- (273) *Chemical Abstracts*: : 331, 45 (jul. 1941).
- (274) Heineman M.: *J. Clin. Inv.*, 20 : 467 (1941).
- (275) Alessandro R.: *Minerva Médica*, 2 : 273 (1939).
- (276) Cislaghi F., Tecilazic F.: *Pediatría*, 44 : 693 (1936).
- (277) Kandel E. V., Le Roy G. V.: *Am. Jour. Med. Science*, 196 : 392 (1938).
- (278) Deeny J.: *Brit. Med. Jour.*, 2 : 864 (1940).
- (279) Deeny J., Murdock E. T., Rogan J. J.: *Brit. Med. Jour.*, 1 : 721 (1943).
- (280) Lian C., Frumusan P.: *Bul. Med. Soc. Hosp. Paris*, 55 : 1194 (1939).
- (281) Schroder H., Braum M.: *Klin. Woch.*, 20 : 978 (1941).
- (282) Dyke S. C., Della B. L.: *Lancet*, 2 : 278 (1942).
- (283) Braganca B., Soha K. C.: *Ann. Bioch. Exp. Med.* 3 : 47 (1943).
- (284) Giri K. V., Krisnamurthy P. V.: *Nature*, 147 : 59 (1941).
- (285) Rosemberg H. R.: *Chemistry and Physiology of Vitamins*. New York. (1942) pg. 328.
- (286) Scarborough H., Stewardt C. P.: *Nature* 142 : 40 (1938).
- (287) Bourne G.: *Physiol. Rev.* 16 : 442 (1936).
- (288) Guzmán Barrón E. S., Brumm H. J., Dick G. F.: *J. Lab. Clin. Med.* 23 : 1126 (1938).
- (289) Wolbach S. B., Howe P. R.: *Arch. Path. Lab. Med.* 1 : 1 (1926).
- (290) Wolbach S. B.: *Science* 86 : 569 (1937).
- (291) Ham A. W., Elliot H. C.: *Am. Jour. Path.* 14 : 323 (1938).
- (292) Schultz M. O., Statz E., King C. G.: *J. Biol. Chem.*, 122 : 395 (1938).
- (293) Berheim F., Berheim M. C.: *J. Biol. Chem.*, 134 : 459 (1940).
- (294) Ceresa F.: *Minerva Med.*, 11 : 230 (1942).
- (295) Gedda L., *Klin. Wochschr.* 21 : 478 (1942).
- (296) Frommel E., Herschberg A. D., Piquet: *J. Helv. Physiol. Pharmac. Acta* 1 : 229 (1943).
- (297) Quastel J. H.: *Nature* 152 : 215 (1943).
- (298) Peterson R. W., Walton J. H.: *Amer. Jour. Chem. Soc.*, 65 : 1212 (1943).
- (299) Michaellis L., Guzmán Barrón E. S.: *Jour. Biolog. Chemistry* 83 : 191 (1929).
- (300) Ruskin S.: *Am. Jour. Digest. Dis.* 110 : 1692 (1943).

- (301) Martin, Fisher, Thomson: Arch. Int. Med. 16 : 692 (1942).
- (302) Martin, Rennebaum, Thomson: Arch. Int. Med.: 18 : 57 (1943).
- (303) Juszat H. J., Klin. Wochschr. 21 : 761 (1942).
- (304) Ecker E. E., Pillemer L., Griffiths J. J., Schwartz W. P.: J. Am. Med. Ass., 112 : 1449 (1939).
- (305) Rosemberg H. R.: Chemistry and Physiology of Vitamins pg. 330 New York, (1940).
- (306) Farmr C. J., Abb A. F., Aron H. C.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 44 : 495 (1940).
- (307) Peryasen D.: O. Hospital. 17 : 281 (1940).
- (308) Delp M., Weber C. J.; Am. of. Int. Med., 15 : 890 (1940).
- (309) Ruskin S., Silverstein M., Med. Record, 153 : 327 (1941).
- (310) Ruskin S.; Am. Jour. Digest. Dis., 10 : 170 (1943).
- (311) Bundensen H., Aron H., Greenebaum R., Farm. C., Abt A.; Jour. Am. Med. Ass., 117 : 1692 (1941).
- (312) Vail D. A.; Jour. Missouri State. Med. Ass., 38 : 110 (1941).
- (313) Svrbely J.; Jour. Biol. Chem., 131 : 233 (1939).
- (314) Ratsimamanga A. R., Janikand J.; Bull. Acad. Med. 125 : 668 (1941).
- (315) Marin J.; Rev. Soc. Arg. Biol., 17 : 581 (1941).
- (316) Hagen J.; Arch. Gewerbepath. 9 : 698 (1939).
- (317) Lubowitzky O., Seyfried H., Wien. Klin. Wochschr. 53 : 543 (1940).
- (318) Holmes H. N.; Science, 96 : 834 (1942).
- (319) Longenecker H. E., Musulin R. R., Tulli R. H., King C. G.; Jour. Biol. Chem., 129 : 445 (1939).
- (320) Turchetti A.; Rev. Patol. Sper., 25 : 191 (1940).
- (321) Onoyama T., Mitt. med. A. Kad. Kioto, 27 : 1187 (1939).
- (322) Kovacs Z., Klin. Wochschr. 21 : 688 (1942).
- (323) Ruskin S.; Arch. of Otorinol., 36 : 853 (1942).
- (324) Beyer K. H.; Arch. Int. Med., 71 : 315 (1943).
- (325) Schultz M. O.; Jour. Biol. Chemistry, 138 : 219 (1941).
- (326) Brooks M.; Conferencia en la Ac. Nac. Ciencias. Lima.
- (327) Swann T. S., Xanthankn T. S.; Jour. Amer. Chem. Soc. 53 : 131 (1931).
- (328) Davis J. E.; Am. Jour. Physiol., 129 : 140 (1940).
- (329) Schultz M. O., Statz E., King C. G.; Jour. Biol. Chemistry, 122 : 395 (1938).
- (330) Prunty F. T. C., Vass C. C.; Bioch. Jour., 37 : 506 (1943).