

## ***Estudio del ácido fólico y vitamina B-12***

### ***Metabolismo***

Por los Dres.:

**PORFIRIO HERNÁNDEZ, MARITZA FERRÁ y VÍCTOR M. BOFFILL**

Hernández P. et al. *Estudio del ácido fólico y la vitamina B-12. Metabolismo* Rev. Cub. Med. 12: 3, 1973.

Se realiza un estudio sobre los avances obtenidos no solo en los conocimientos bioquímicos, sino también clínicos del metabolismo del ácido fólico y vitamina B-12, así como también sobre algunos tópicos que resultan importantes en los trastornos ocasionados por el déficit de estos factores.

En años recientes se ha podido mostrar la gran complejidad de pasos metabólicos en los cuales en una u otra forma intervienen el ácido fólico o la vitamina B-12, así como los diversos componentes que constituyen las familias de los folatos y las cobalaminas. Sin embargo, aún todo no ha sido aclarado, sobre el metabolismo de las mismas.

Ultimamente se han enriquecido no sólo los conocimientos bioquímicos, sino también los clínicos con la demostración de una variada patología congénita debida a la deficiencia de estas coenzimas, lo que nos ha motivado a realizar una actualización del metabolismo del ácido fólico y de la vitamina B-12, así como comentar algunos tópicos que hemos considerado importantes en los trastornos ocasionados por el déficit de estos factores.

#### ***Metabolismo de los folatos***

El ácido fólico (ácido pteroilglutámico) es una sustancia compleja constituida por la unión del ácido pterico (pteridina -j- ácido p-aminobenzoico) a una molécula de ácido

glutámico. Cuando el ácido pterico se une a más de una molécula de ácido glutámico da lugar a los compuestos conocidos por poliglutamatos, como son el ácido pteridilglutámico, triglutámico y el heptaglutarámico (Fig. 1). Algunos autores utilizan la denominación de ácido fólico como un término general que incluye tanto al producto sintético, como a los poliglutamatos. Otros prefieren el término de folatos para designar a todos los compuestos con una actividad semejante a la del ácido fólico. En este sentido genérico ácido fólico y folatos resultan equivalentes, pudiendo ser utilizados indistintamente como nombre común de cualquier miembro de la familia.

Los folatos de la dieta están constituidos fundamentalmente por poliglutamatos<sup>23</sup> encontrándose en mayor cantidad en ciertos alimentos tales como: vegetales frescos, hígado, riñón, huevos, levaduras, habichuelas, frutas, etc. La leche tiene poca cantidad de folatos, lo cual debe tenerse en

cuenta cuando éste sea el alimento que predomina en la dieta. Mediante la cocción pueden perder hasta un 95% de su actividad.

Las necesidades diarias son pequeñas, considerándose que 50 microgramos es una cantidad suficiente. Una dieta normal, bien equilibrada contiene de 1-

1. 5 mg de ácido fólico. El exceso es eliminado por la orina y heces fecales.

Como el hombre al igual que otros animales es incapaz de sintetizarlo, su metabolismo depende de la eficacia con que se lleve a cabo la ingestión, digestión y absorción de los folatos.<sup>4</sup>

La absorción se produce a nivel del intestino delgado, principalmente en el duodeno y yeyuno, siendo necesaria la presencia de una enzima llamada conjugasa para desdoblar los poliglutamatos a monoglutamatos, los cuales muestran una absorción más rápida y eficaz. Enzimas de este tipo han sido encontradas en el intestino delgado, hígado, bilis, etc.<sup>5,8</sup> No existe uniformidad de criterio con respecto a la forma de transporte a través de la pared intestinal y al sitio de conversión en las formas activas, ya que el ácido fólico como tal, no ejerce acción alguna sobre el organismo, siendo necesaria su reducción a otros derivados metabólicamente activos. Actualmente existen evidencias de que estos cambios se producen a nivel hepático, aunque por ello no puede excluirse la posibilidad de estas transformaciones en la propia pared intestinal.

Bajo la acción de una enzima específica (folato reductasa), el ácido fólico (F) es reducido a ácido dihidrofólico (FH<sub>2</sub>), el cual a su vez lo es a ácido tetrahidrofólico (FH<sub>4</sub>). La enzima folato-reductasa convierte el F a FH<sub>2</sub> lentamente; pero el paso de FH<sub>2</sub> a FH<sub>4</sub> lo ejecuta en una forma muy rápida.<sup>8</sup> El FOL es un cuerpo esencial en el metabolismo de los folatos, ya que ocupa una posición clave para la formación de los derivados que intervienen en el transporte

de los grupos de un átomo de carbono. El FH<sub>2</sub> puede pasar rápidamente a otro intermediario crucial-el N<sup>5</sup>N<sup>10</sup> metileno-FH<sub>2</sub> catalizándose la conversión de serina a glicina en presencia de piridoxal. También es posible llegar al N<sup>5</sup>N<sup>10</sup> metileno FH<sub>2</sub> por vías más largas. En presencia de la formil-tetrahidrofólico sintetasa el FH<sub>2</sub> forma los derivados formilados, los cuales participan como donadores de fórmilos en la síntesis de las purinas.<sup>9</sup> Bajo la acción de dicha enzima se forma el N<sup>5</sup> formil FH<sub>2</sub>, el cual puede pasar en forma reversible a N<sup>5</sup>N<sup>10</sup> metileno-FH<sub>2</sub> mediante la enzima ciclohidrolasa, e irreversiblemente al N<sup>5</sup> formil FH<sub>2</sub> que constituye el ácido folínico, la única forma estable de los compuestos activos, el cual a su vez puede ir reversiblemente a N<sup>5</sup>N<sup>10</sup> metileno-FH<sub>2</sub>, pudiendo este último convertirse en presencia de una deshidrogenasa en N<sup>5</sup>N<sup>10</sup> metileno FH<sub>2</sub>, que vuelve a FH<sub>2</sub> mediante la transformación de desoxiuridilato a timidilato, precursor necesario para la síntesis del DNA. El N<sup>5</sup>N<sup>10</sup> metileno I<sup>\*</sup> puede también dar lugar al intermediario N<sup>5</sup> metil-FIL, el que cediendo su metilo y teniendo como coenzima a la B-12 (metil-B-12) favorece el cambio de homocisteína a metionina con la liberación de FH<sub>4</sub>. En el metabolismo de la histidina, el FH<sub>2</sub> en presencia de dicho aminoácido, de formiminoglutamato (F1GLU) y de formiminotransferasa, forma un metabolito de menor importancia, el N<sup>5</sup> formimino FH<sub>4</sub>, con la liberación de ácido glutámico. Cuando existe un déficit de folatos este eslabón metabólico se interrumpe con acumulo del F1GLU, el cual es eliminado por la orina después de una sobrecarga con histidina (Fig. 2).

Como se puede apreciar, la función principal del ácido fólico a través de sus derivados activos es servir de transporte a los grupos constituidos por un átomo de C, con participación en la biosíntesis de diferentes aminoácidos, de las purinas, de la timina y por tanto en la del RNA y DNA.

Las reservas de folatos del organismo se han calculado en 5 a 10 mg, es decir, una cantidad muy por encima de las necesidades diarias en una situación normal.<sup>9</sup>

La actividad de los folatos es demostrable en el suero y se considera como cifra normal aquella por encima de 5 milimicrogramos por ml de suero, medida por el método microbiológico (L. casei). En los glóbulos rojos los niveles varían entre 160 y 640 m $\mu$ Ag/ml de hematíes centrifugados,<sup>10</sup> considerándose que los valores séricos inferiores a 4 m[Z.g/ml de suero y los globulares menores de 140 m[Ag/ml de hematíes indican un déficit seguro de folatos.

#### *Metabolismo de la vitamina B-12*

Esta vitamina fue obtenida del hígado en 1948, por varios investigadores simultáneamente, bajo la forma de cianocobalamina,<sup>8</sup> la que se considera actualmente como un artificio de los métodos utilizados en los procesos de su aislamiento y purificación.<sup>11</sup> La vitamina B-12 existe en el organismo bajo diferentes formas estructurales que se conocen por el término genérico de cobalaminas.

En la molécula de cianocobalamina pueden considerarse tres regiones.<sup>8,12</sup> El núcleo central (anillo corrínico) está formado por cuatro núcleos pirrólicos unidos por enlaces particulares que los distinguen del núcleo de las porfirinas y que se combinan en su centro a un átomo de cobalto situado en la misma posición que ocupa el hierro en la molécula de Hem. Este cobalto presenta seis valencias de coordinación. Por debajo del núcleo central y unido parcialmente al cobalto se encuentra un nucleótido benzamídazólico que por otro punto se une a dicho núcleo mediante un éster fosfórico.

Por encima del núcleo central y unido al átomo de cobalto se encuentra un radical CN (ciánico) que es lo que caracteriza a la cianocobalamina (fig. 3). Este radical puede ser sustituido por diferentes grupos químicos, y así tendremos: si en su lugar se sitúa un grupo OH, a la hidrocobalamina (B-12 a); si es un H<sup>+</sup>O, a la aquocobalamina (B-12 b); colocando un radical NO<sub>2</sub>, a la nitrocobalamina (B-12 c); si es un grupo metilo, a la metilcobalamina; y si es un residuo 5-desoxiadenosil se formará la 5-desoxiadenosil cobalamina. La cianocobalamina por exposición a la luz y a los agentes reductores, pasa rápidamente a la forma de hidroxocobalamina.

La vitamina B-12 es elaborada por muchas bacterias y ciertos hongos, no pudiendo ser sintetizada por las células de los mamíferos.<sup>13</sup> Una dieta normal suministra alrededor de 3-30 microgramos diarios de esta vitamina bajo la forma de proteína animal: carne, leche, queso y huevos.<sup>14,15</sup> En el adulto normal las necesidades diarias de B-12 son de aproximadamente 1 microgramo, por lo cual, al tener el hígado una reserva de 1 mg se encuentran aseguradas estas necesidades por varios años.

Los estudios realizados en las bacterias<sup>16</sup> y posteriormente en cultivos de células humanas<sup>17</sup> han permitido plantear el mecanismo de formación de las dos coenzimas que representan las verdaderas formas activas de la B-12: la metilcobalamina (metil-B-12) y la 5-desoxiadenosilcobalamina (5-desoxiadenosil-B-12). La hidroxocobalamina posee su cobalto (Co) en forma trivalente y al ser transportada dentro de la célula sufre una doble reducción, pasando de la forma trivalente original a la divalente primero (B-12 r) y a la monovalente después (B-12 s).

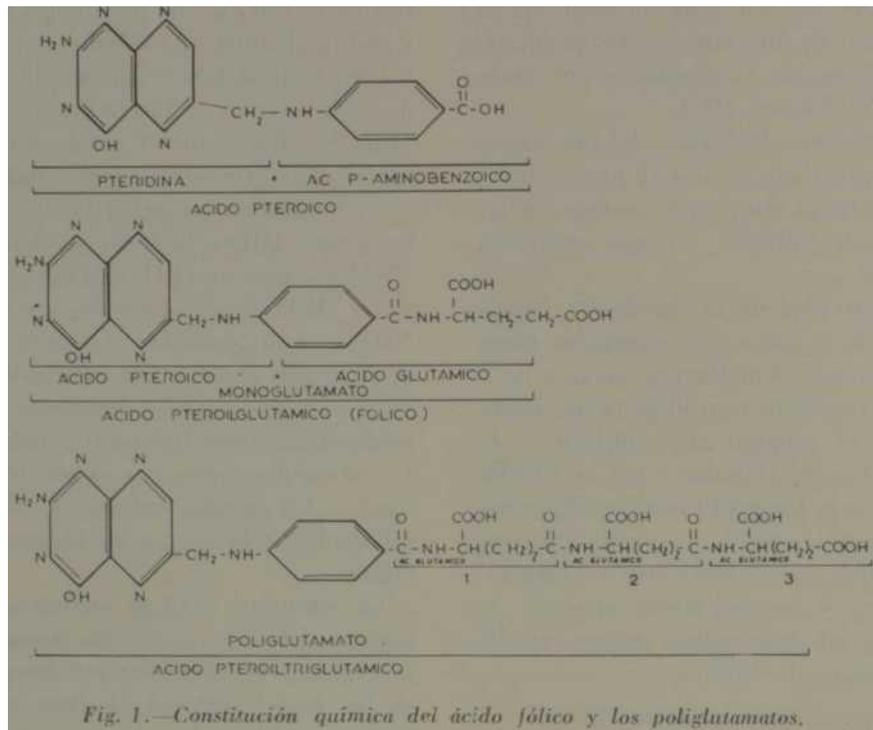


Fig. 1.—Constitución química del ácido fólico y los poliglutamatos.

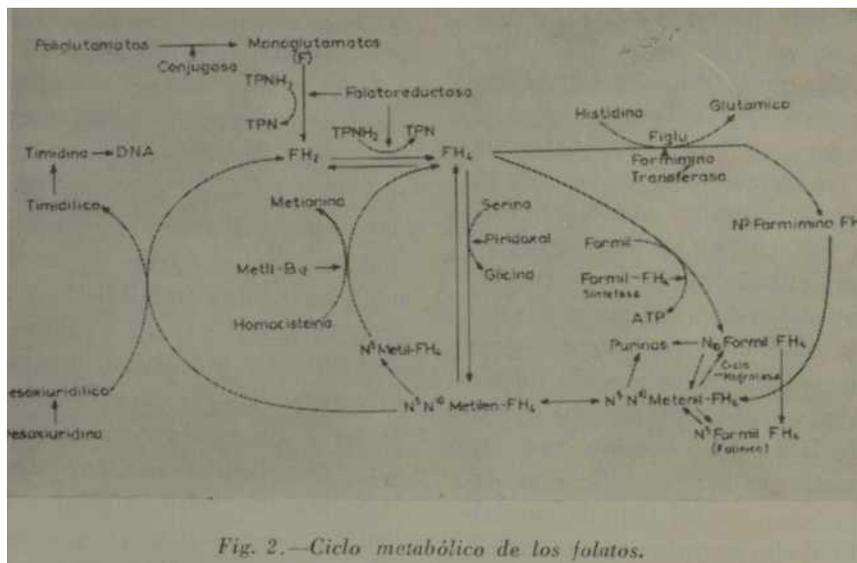


Fig. 2.—Ciclo metabólico de los folatos.

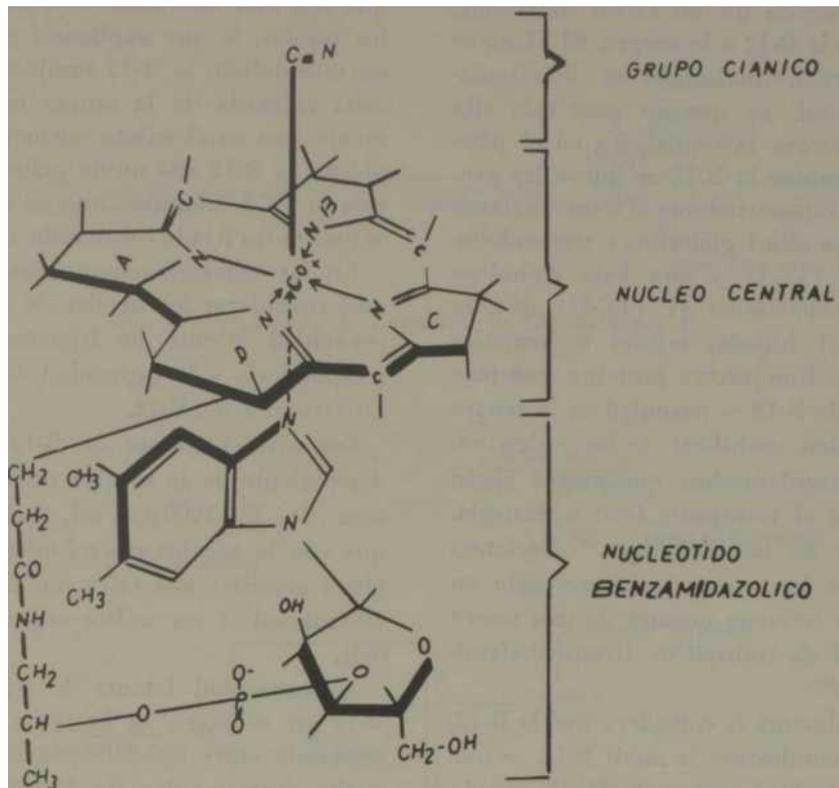


Fig. 3.—Estructura química de la cianocobalamina.

Esta última forma se combina posteriormente con un grupo 5-desoxiadenosil bajo la acción de una traefersa específica, o bien sufre un proceso de mediación pasando a me til-B-12 (Fig. 4). Por alteraciones en estos cambios metabólicos pueden pro. (lucirse defectos hereditarios del metabolismo de la B-12.

La vitamina B-12 de los alimentos se encuentra en forma de complejos proteínicos, los cuales son rotos bajo la acción del jugo gástrico y la enzimas gastrointestinales. La absorción de la B-12 depende de la presencia del factor intrínseco (FI). La afinidad de este factor para unirse a la B-12 en el medio ácido del estómago es mucho mayor que la de las proteínas de los alimentos,<sup>17</sup> formándose con su unión un complejo

B-12-FI. Cada molécula de F1 lija dos moléculas de B-12.<sup>11</sup>

La absorción se lleva a cabo a nivel del íleon terminal, siendo su mecanismo fundamentalmente activo, y sólo en una proporción muy baja se realiza por difusión pasiva en presencia de cantidades excesivas de la vitamina en el tubo digestivo. La absorción activa depende de la formación del complejo B-12-FI, el cual va a unirse a un receptor específico ileal por medio de un mecanismo complementario semejante a como una llave entra en su cerradura.<sup>18</sup> Esta unión se hace a un pH superior a 5.6 y necesita de la presencia de iones calcio y/o magnesio.

El complejo B-12-FI es separado dentro de la célula de la mucosa intestinal por la acción de un factor liberador, pasando la B-12 a la sangre.

El FI rio se encuentra normalmente en la circulación portal, ya que no pasa más allá de la mucosa intestinal. Ya en el plasma sanguíneo la B-12 se une a las proteínas transportadoras (transcobalaminas), una alfa-1 globulina o transcobalamirra I (TC-I) y una beta globulina o transcobalamina II (TC-II) que la llevan al hígado, tejidos y hematíes (Fig. 5). Una tercera proteína transportadora de B-12 se encontró en la sangre del cordón umbilical de los recién nacidos, considerándose que juegue algún papel en el transporte fetal o transplacentario de las vitaminas.<sup>9</sup> Recientemente se ha reportado la presencia en el suero humano normal de una nueva proteína de transporte (transcobalamina III).<sup>19a</sup>

Actualmente se considera que la B-12, fundamentalmente la metil B-12, se une tanto a la TC-I como a la TC-II; siendo que en un período de 24 horas la unida a la TC-II es entregada a los tejidos, mientras que la TC-I mantiene la B-12 en el plasma, es por lo que se evalúa la TC-II como una proteína esencialmente de transporte y la TC-I más bien de almacenamiento, aunque esta última puede también ceder la B-12 a los tejidos, aunque muy lentamente.

Normalmente la forma de almacenamiento se encuentra en gran parte unida a la vitamina, mientras que la de transporte por el contrario presenta disponible la mayor proporción de su capacidad de fijación, por lo que es a ésta a la que va a unirse la vitamina B-12, representando en estos casos la mayor fracción de la capacidad latente de fijación de la vitamina en el suero.

En el déficit de B-12, al hallarse libre una mayor cantidad de TC-I, la vitamina puede unirse fácilmente a ella, aunque con

una liberación más lenta hacia los tejidos, lo que explicaría el porque en este déficit, la B-12 suministrada resulta aclarada de la sangre más lentamente que en el sujeto normal.<sup>20</sup> En el plasma la B-12 está unida principalmente a la TC-I mientras, que en el hígado se encuentra fijado sobre todo a la TC-II.

En las determinaciones séricas debemos considerar los niveles de B-12 y la capacidad latente de fijación que correspondería a la capacidad de fijación no saturada de B-12.

Los niveles séricos de B-12, aunque dependiente de la técnica utilizada, varían de 150-1400  $\mu\text{g/ml}$ , valorándose que con la técnica microbiológica (*Escherichia coli*) una cifra por debajo de 100  $\mu\text{g/ml}$  es un índice seguro de déficit.

La capacidad latente de fijación de B-12 en el suero es bastante elevada, oscilando entre 800-2100  $\mu\text{g/ml}$ , de los cuales corresponden de 200-500  $\mu\text{g/ml}$  a la TC-I, y de 500-1600  $\mu\text{g/ml}$  para la TC-II<sup>21</sup> y cuyas determinaciones resultan variables en distintas patologías, principalmente en los síndromes mielo-proliferativos.

El transporte de la vitamina plasmática a los eritrocitos se efectúa fundamentalmente por un proceso fisiológico activo, por mediación de las transcobalaminas que la fijan sobre la membrana de los hematíes y sobre todo de los reticulocitos. También puede efectuarse una difusión pasiva en presencia de grandes cantidades de B-12 plasmática no ligada a las proteínas.

En el plasma, la mayor cantidad se encuentra bajo la forma de metil-B-12, siendo más escasa la hidroxocobalamina y despreciable la cantidad de 5-desoxiadenosil B-12. En el hígado se invierten las proporciones predominando la 5-desoxiadenosil B-12, siendo menor la can-

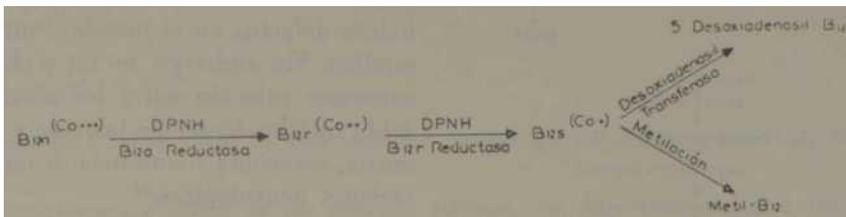


Fig. 4.—Mecanismo de formación de las coenzimas B<sub>12</sub>.

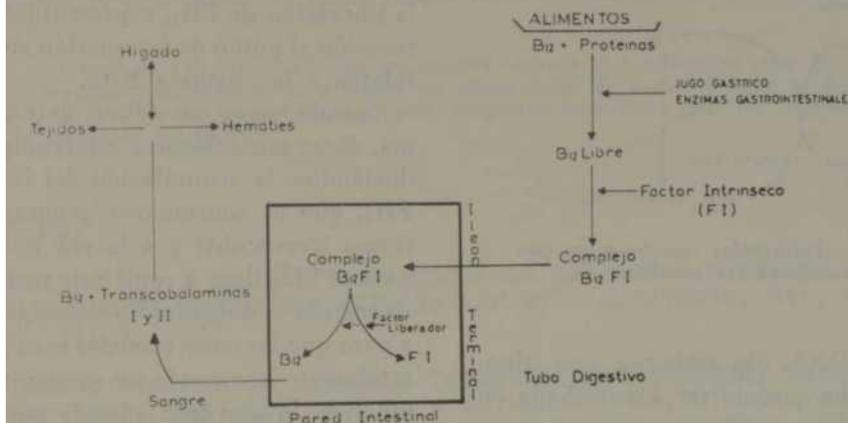


Fig. 5.—Absorción e incorporación a los tejidos de la vitamina B-12.

tividad de hidrox-B-12 y escasa la forma metilada.<sup>11</sup>

En un sujeto normal, se excreta diariamente de 1-3 gg de B-12, aproximadamente un 50% por la orina y el resto con las heces. Parte de la que se excreta por la bilis se reabsorbe por la mucosa ileal, estableciéndose un tipo de circulación enterohepática.<sup>21</sup>

*Reacciones bioquímicas mediadas por la vitamina B-12 y su interrelación con el metabolismo de los folatos*

Las formas activas de B-12 (coenzimas) son capaces de actuar en diferentes puntos metabólicos,<sup>12</sup> aunque de todos ellos, tres son las reacciones que más nos interesan

desde el punto de vista hematológico (Fig. 6).

*Reacciones mediadas por la 5-desoxiadenosil B-12*

La arribonucleotidorreductasa cataliza la conversión de los ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos, los cuales representan el sustrato para la síntesis de DNA. En las bacterias la coenzima B-12 actúa como cofactor de esta reductasa, que en los mamíferos presenta muchas de las propiedades de la bacteriana. Se planteó<sup>22</sup> que al ser dependiente de la coenzima B-12 para su acción, en los déficits de esta vitamina no funcionaría, provocando una interrupción de la sin-

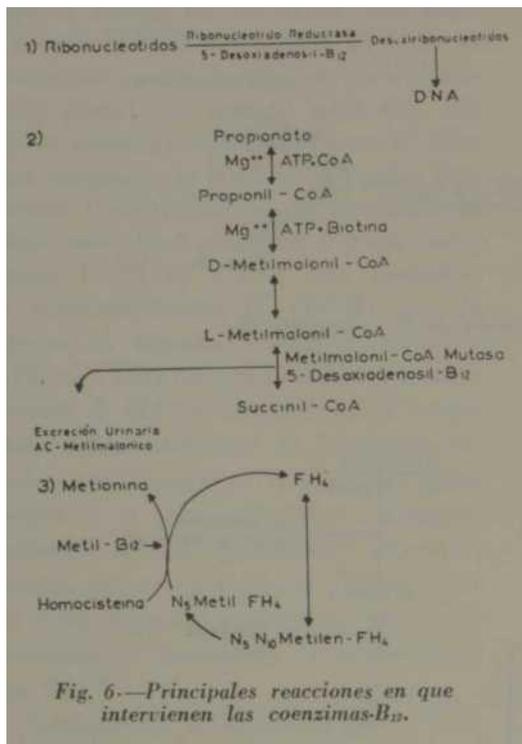


Fig. 6.—Principales reacciones en que intervienen las coenzimas-B<sub>12</sub>.

tesis del DNA. Sin embargo, esta hipótesis no ha podido ser comprobada en el hombre.

Otra función importante de esta coenzima B-12 es su participación en el ciclo de los propionatos donde intervienen en la última etapa de esta vía, transformando el ácido metilmalónico en ácido succínico. En el déficit de B-12 este mecanismo se interrumpe con acumulación del ácido metilmalónico, cuyo aumento en la orina resulta una prueba concluyente del déficit.

Existen animales cuyo metabolismo depende de la neoglucogénesis a expensas de ácidos grasos de cadenas cortas, provocando en ellos graves alteraciones, las interrupciones en el ciclo de los propionatos. En el hombre se ha planteado<sup>9</sup> que el acúmulo del ácido metilmalónico es capaz de producir trastornos en el metabolismo de los lípidos y posiblemente también del sistema nervioso. Se sugirió que estos cambios pudieran ser la causa de las manifestaciones neurológicas en la anemia perniciosa<sup>23</sup> por probables defectos en el metabolismo de la mielina. Sin

embargo, no ha podido encontrarse relación entre los niveles del ácido metilmalónico en la orina y la presencia, severidad o ausencia de manifestaciones neurológicas.<sup>24</sup>

#### Relaciones mediadas por la metil B-12

Como sabemos del metabolismo de los folatos, esta coenzima es esencial para el paso de homocisteína a metionina con la liberación de FH<sub>4</sub>, representando esta reacción el punto de interacción entre los folatos y la vitamina B-12.

Cuando existe un déficit de esta última, dicho mecanismo se interrumpe produciéndose la acumulación del N<sub>5</sub>-metil FH<sub>i</sub>, que al continuarse generando en forma irreversible y a la vez no poder pasar a FH<sub>4</sub> llega a constituir casi exclusivamente el único folato del organismo, y para que las consecuencias sean peores, totalmente bloqueado en su camino metabólico, lo que trae además por resultado la disminución del resto de los intermediarios (FH<sub>1</sub>, formil FH<sub>4</sub>, metilen FH<sub>4</sub>) con una menor producción de purina y timina y con ello la disminución en la síntesis del DNA. Todas estas alteraciones son el producto del bloqueo metabólico que se conoce con el nombre de "atrapamiento metílico".<sup>25</sup>

Lo expuesto nos permite apreciar la variedad de intermediarios y los posibles intercambios que pueden efectuarse en el metabolismo del ácido fólico, así como la secuencia que sigue la vitamina B 12 para la constitución de sus formas activas y su incorporación a los tejidos, destacándose la importancia de las relaciones existentes entre ambos factores. Todos estos detalles nos resultan indispensables para una comprensión cabal de las alteraciones que se producen en estos metabolismos, producto de ciertos déficits enzimáticos congénitos, así como para un mejor conocimiento de la fisiopatología de las anemias megaloblásticas.

## SUMMARY

Hernández, 1\*. et al. *Study on folie acid and vitamin Bu. 1-Metabolism.* Rev. Cub. Med. 12: 3, 1973.

It is perfoimied a review on the advances obtained, not only in biochemical but also in clinieal knowledges on the folie-acid and vitamin-Bi° metabolism, as well as on some signi- fieant topies in the disturbauces provoked by the déficit of these factors.

## RESUME

Hernández P. et al. *Elude de Vacide folique et de la vitarnine Bu.* Rev. Cub. Med. 12: 3, 1973.

Dans ee travail ou fait nnj elude sur les progrès ob'enus non seu'ement dans les connais- sanees bioehimiques, mais aussi cliniques du métabolisme de l'acide folique et de la vita- inine P 12, ainsi que sur quelques topiques, résiiltants importants dans les troqbles causé\* par le déficit de ces facleurs,

## PESEME.

SpHaHjteC ù., H sp. 113y^eHHe \$0;meB0;í KHCJIOTH H BiiTaiviiiHa B-12. 3a<5ojieBaHiw, BH3BaHfíae HeaocTaTKOM CTIIX CO3H3HMOB. Rev. Cub. Med. 12: 3, 1973

B patfoTe npOBOjuiTCH H3y^ieHJie pa3JiiraHHx 3aóojieBaHür BU3BaHHHe HejiocTaTKOM (JojmeBOñ khcjioth Ñ BUTaMima B-12. OTMe^aeTCH, mto HejiocTaTGK yica3aHHHx coshshmob mqjmt óhtb BposjieHHHM m npno-ópeTeHHHM, npuraeM nepBuii ejiy^aii ABjuieTCH tok \$opMoñ, hotopan óojiBme Bcero noMorajia BtmcHemno \$H3H0naT0Ji0nm eBHsaHHHX 38(5 o- jieBaHHK ii jiy^Eer.^ noHHMamno oÓweHHUx MexaHH3M0B sthx e03H3HMOB.

## BIBLIOGRAFIA

1. —Linman, J. W.: Principles of Hematology. I et. 186 pp. The Macmillan Co., New York, 1966.
2. —Buttenvorth. C. E. Jr.; Santini, H. Jr.; Frommyer, W. B. Jr.: The pteroylgluta- mate components of American diets as de ermined by chromatograplic fractiona- tion J. Clin Invest., 42: 1929, 1963.
3. —Santini, B. Jr.; Berger. F. M.; Berdasco, G., Sheehy, T. W., Aviles, J., Davila, I.: Folie acid activity in Puerto Rican foods. J. Amer. Diet. Ass, 41: 462, 1962.
4. —Bernstein, L. II.; Gutsitein, S.; if einer. S.; Gershon, E.: The absorption and malabsorption of folie acid and its poly- glutamates. Am. Journ. of Med., 48: 570, 1970.
5. —Streiff. B. B.; Bosenberg, I. H.: Absorp- tion of polyglutainic folie acid. J. Clin. Invest., 46: 1121, 1967.
6. —Bernstein, L. ti.; Gutstein, S.: Folate con- jugase in bilc. New Eng. J. Med., 281: 565, 1969.
7. Leeming. B. J.; Portman-Graham, II.: Site of reduction and methylation of folie acid in man. Lancet, II: 955, 1971.
8. —Chanarin, The Megaloblastic Anaemias, I ed., Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edinburgh, 1969.
9. —Jandl, J. H.: Anemias Megaloblásticas. En Cecil-Loeb. Tratado de Medicina Inter, na. Tomo II, pp. 1039. Edición Revolucionaria, 1968.
10. —Hoffbrand, A. V.; Newcombe, Beuerly, F. A. and Mollin. D. L.: Method of assay of red cell fola'e activity and the valué of the assay as a test for folate deficiency. J. Clin. Patli., 19: 17, 1966,

- H. —*Gajdos, A.*: Biochimie de la vitamina B<sub>12</sub> Press Médicale, 79: 1849, 1971.
12. —*Silber, B. and Moldóte, Ch. F.*: The biochemistry of B<sub>12</sub> mediated reactions in man. Am. Journ. of Med., 48: 549, 1970.
13. —*Smith, E. L.*: Vitamin B<sub>12</sub> 3a. ed., John Wiley & Sons, New York, 1965.
14. —*Winthrobc, M. M.*: Hematología Clínica. 3a. edición en español. 87 pp. Ed. Revo. Iueionaria. 1968.
15. —*Mangay, Chung, A. S.; Pearson, W. J. V.; Darby, H. J.; Miller, O. T. V. and Goldsmith, G. A.*: Folic acid, Vit. B<sub>12</sub>, pantothenic acid and vitamin B<sub>12</sub> in human dietaries. Am. J. Clin. Nutr., 9: 573, 1961.
16. *Mahoney, M. J.*, and *Bosenberg, L. E.*: Inherited defects of B<sub>12</sub> Metabolism. Am. Journ. of Med., 48: 584, 1970.
17. —*Cooper, B.*, and *Castle, T. V. B.*: Sequential mechanism in the enhanced absorption of vitamin B<sub>12</sub>, by intrinsic factor in the rat. J. Clin. Invest., 39: 199, 1960.
18. *Corcino, J. J.*; *Waxman, S.* and *Herbert, V.*: Absorption and malabsorption of Vit. B<sub>12</sub>, Am. Journ. of Med., 48: 562, 1970.
19. —*Kumentó, A.*; *López;* *Luhby, A. L.* and *Hall, C. A.*: B<sub>12</sub> binders in human cord serum. Clin. Res., 15: 283, 1967.
- 19a. *Bloomfield, F. I.* and *Scott, J. A.*: Identification of a new vitamin B<sub>12</sub> binder (transcobalamin III) in normal human serum. Brit. J. Haemat., 22: 33, 1972.
20. —*Herbert, V.*: Diagnostic and prognostic values of measurement of serum vitamin B<sub>12</sub> binding proteins. Blood, 32: 305, 1968.
21. —*Sullivan, E. IV.*: Vitamin B<sub>12</sub> metabolism and megaloblastic anemia. Seminars in Hematology, 7: 6, 1970.
22. —*Bock, H. S.*: Deoxyribonucleotide synthesis and the role of vitamin B<sub>12</sub> in erythropoiesis, Vitamins hormones, 26: 413, 1968.
23. —*Breck, W. S.*: The metabolic basis of megaloblastic erythropoiesis. Medicine, 43: 715, 1964.
24. —*Jeffery, A. M.* and *Cox, E. V.*: Methylmalonic acid excretion and vitamin B<sub>12</sub> deficiency in the human. Ann. N. Y. Acad. Sci., 112: 915, 1964.
25. —*Nixon, P. F.* and *Bertino, J. I.*: Interrelationships of vitamin B<sub>12</sub> and folic acid in man. Am. Journ. of Med., 48: 555, 1970.