

INFLUENCIA DE DISTINTOS SUPLEMENTOS DIETÉTICOS SOBRE LA REPRODUCCIÓN DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS BAJAS EN VITAMINA B₁₂

Werner G. Jaffé

Instituto Nacional de Nutrición

El estudio de dietas puramente vegetarianas sobre varias generaciones seguidas de animales omnívoros y de necesidades alimenticias similares a las del hombre tiene un interés especial por su relación con el problema de si es esencial o no la inclusión de productos animales en la alimentación humana.

En trabajos anteriores hemos descrito resultados obtenidos en ensayos sobre la reproducción de ratas y ratones sometidos a dietas vegetarianas a base de maíz y soya con varias modificaciones (1). Así se pudo demostrar que la dieta basal, suplementada con aceite, minerales y vitaminas, con excepción de la vitamina B₁₂, permite una reproducción regular durante repetidas generaciones (2); la inyección de vitamina B₁₂ a estos animales causa un incremento en el peso de las crías y de las madres. Un efecto similar, aunque menos pronunciado, fué observado con suplementos dietéticos de cobalto (3, 4). También se demostró la importancia del contenido en nitrógeno de la dieta experimental, observándose un efecto nocivo al aumentar el contenido en proteínas o en urea de la dieta (5). En otra serie experimental se estudió el efecto del antibiótico aureomicina bajo las condiciones descritas, sin que se hubiera podido observar ninguna influencia significativa sobre la reproducción de ratones y ratas (6).

Nuestro objetivo en el presente trabajo ha sido el de estudiar si hay nutrientes desconocidos y esenciales para el ciclo vital que no se encuentren en las dietas vegetales ni puedan ser sinteti-

zados en el organismo animal. Representa una continuación de los anteriores estudios citados.

En los últimos años se han publicado varios estudios experimentales que describen la existencia de nuevos factores vitamínicos encontrados en diversos materiales naturales. Así, Novak y Hauge (7) han descrito un factor aislado de residuos de la fabricación alcohólica y que llamaron vitamina B₁₃. Gotsch (8) ha descrito una sustancia activa en estimular el crecimiento de ratas, pollos e insectos, la cual designó con el nombre de vitamina T, siendo, según las publicaciones del citado autor, la levadura "torula" una buena fuente de este factor.

Las descripciones de estos factores que posiblemente falten en nuestra dieta basal nos decidieron a estudiar el efecto de un suplemento de levadura seca del género "torula" sobre la reproducción.

Otros investigadores han postulado la existencia de un "factor proteico animal" (APF), y desde hace varios años se ha observado que ratas, pollos y otros animales mantenidos con dietas vegetarianas crecen mejor al incluir extracto de hígado, leche o caseína cruda, harina de pescado, etc., en las mismas (9). Posteriormente se pudo demostrar que esta acción se debía, por lo menos parcialmente, al contenido de estos productos en vitamina B₁₂. Existen hoy en día productos comerciales muy activos en este sentido, producidos por acción microbiana, por ejemplo, del *Streptomyces griseus* y otros. Estos productos son una buena fuente de vitamina B₁₂, pero no se sabe con seguridad si contienen además algún otro factor desconocido. Contienen antibióticos que pueden ejercer una influencia estimuladora bajo ciertas condiciones experimentales (11). Últimamente se han descrito síntomas de deficiencia en ratas, atribuidas a una falta del "A. P. F." y no curables con vitamina B₁₂, sino con caseína cruda (12).

El problema de si el factor proteico animal es idéntico a la vitamina B₁₂ o si, en cambio, contiene también otros componentes activos desconocidos, nos llevó a presentar ensayos con ambos por separado.

PARTE EXPERIMENTAL

Resultados

Los animales experimentales provenían de la cría mantenida en nuestro laboratorio por más de cuatro años con la dieta basal N° 1 (ver tabla N° 1). Se trata de ratas blancas de la cepa "Sprague Dawley".

TABLA N° 1

COMPOSICION DE LA DIETA BASAL

Harina de soya comercial	46
Harina de maíz	46
Aceite de ajonjolí con 0,2% de aceite de per- mormum y 0,2% de aceite de gérmenes de trigo	5
Mezcla de sales U. S. P. N° 2	2
Mezcla de vitaminas	1

La mezcla de vitaminas contiene:

Tiamina	0,3 mg.
Riboflavina	0,3
Niacina	2,0
Acido para-amino-benzoico	25,0
Inositol	10,0
Pantotenato de calcio	2,0
Piridoxina	0,2
Acido fólico	0,025
Biotina	0,010
Colina	100,0

El mantenimiento y manejo de estos animales ha sido igual al descrito anteriormente (4). Los animales recibieron la dieta basal N° 1 hasta pocos días (2-8) antes de dar a luz, período en el cual se cambió por la dieta experimental correspondiente.

Los suplementos usados fueron: levadura seca en polvo de la cepa *Torulopsis utilis*, obtenida por la fábrica Colonial Food Yeast Ltd., Frome, Jamaica, y "Animal Protein Factor", gentilmente cedido por la U. S. Industrial Chemicals, Inc., New York 17. Esta última preparación contiene 7,7 gamas de vitamina B₁₂/gr., según indicación del fabricante.

La vitamina B₁₂ pura usada fué una preparación comercial en solución para uso parenteral humano. Los suplementos se agregaron a la dieta I mezclando y tamizando muy cuidadosa-

mente. La inyección de vitamina B₁₂ se aplicó por la vía intraperitoneal en una sola dosis de 15 gamas por animal 2-8 días antes del parto.

Todos los resultados fueron sometidos al cálculo estadístico correspondiente, aplicándose para las columnas "crías muertas" y "animales sobrevivientes / crías nacidas", el método de los chi al cuadrado.

Se incluyó una serie alimentada con una dieta comercial para ratas, "Ratarina", para fines de comparación. De igual manera como se hizo con los otros grupos experimentales, se separaban ratas preñadas y alimentadas con la dieta basal y pocos días antes del parto se les cambió la alimentación por la mencionada dieta comercial, la cual contiene 13% de proteínas animales (leche descremada en polvo y harina de pescado) y 11% de proteína vegetal.

Resultados

Los resultados obtenidos se han resumido en la tabla N° 2.

En la serie N° 1, alimentada con la dieta basal, y la N° 2, que recibió la dieta suplementada con levadura "torula", no hubo diferencias en la mortalidad de las crías ni en el número de animales que sobrevivieron el período de lactancia, así como tampoco en el peso a la edad del destete. Lo mismo se puede decir de las series 3 y 4, ambas inyectadas con vitamina B₁₂ y recibiendo además la N° 4 el suplemento de levadura en la dieta. Sin embargo, comparando el aumento de peso de las madres durante la lactancia entre las series Nos. 1 y 2, sin y con suplemento de levadura, se observa que este suplemento causó un incremento significativo del peso.

No se notó diferencia entre las series que recibieron la dieta suplementada con vitamina B₁₂ pura o con A.P.F. (aportando una cantidad igual de esa vitamina). El cálculo estadístico reveló que las pequeñas diferencias entre estas dos series no son significativas.

La comparación entre los grupos Nos. 3 y 5 revela que el crecimiento de las crías en la primera serie donde la madre fué tratada antes del parto con una inyección de 15 gamas de vitamina B₁₂ fué inferior al del grupo donde la misma recibió el suplemento vitamínico con la dieta. Los datos de la serie control N° 7, donde se usó en la alimentación una dieta comercial completa demuestran que tanto el crecimiento como la sobrevivencia fueron comparables a los de los dos grupos experimentales citados.

TABLA Nº 2

REPRODUCCION DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS A BASE DE SOYA Y MAIZ Y REFORZADAS CON ACEITE Y MINERALES Y VITAMINAS, EXCEPTO LA VITAMINA B₁₂ CON O SIN SUPLEMENTOS ADICIONALES

Nº Suplemento	Crías nacidas	Crías muertas	Animales destetados / crías nacidas	Peso medio a la edad del destete	Cambio de peso de las madres durante la lactancia
1. Ninguno	24	6	3,54	43,3 ± 2,2	1,5 ± 3,4
2. Levadura torula 2%	13	3	2,92	46,3 ± 3,1	16,6 ± 5,0
3. 15 gama. B ₁₂ inyect.	10	1	4,20	50,2 ± 2,1	23,4 ± 3,6
4. Idem más levadura torula	12	1	3,58	54,8 ± 3,9	26,4 ± 5,6
5. 40 gama/kg. de vitamina B ₁₂	13	4	3,50	63,6 ± 2,7	22,6 ± 4,6
6. A. P. F.	18	4	4,60	60,0 ± 1,8	18,3 ± 4,0
7. Dieta completa	9	1	3,90	50,0 ± 0,6	7,1 ± 4,7

La edad del destete fué de 28 días. Crías mayores fueron reducidas a 6 animales. Se indica el error standard del promedio en las últimas dos columnas.

Discusión de los resultados

El suplemento de la dieta básica con levadura torula ni causó un mejor crecimiento de las crías ni disminuyó la mortalidad de las mismas. Sin embargo, el aumento de peso de las madres durante la lactancia parece haber sido significativamente mayor en el grupo experimental en comparación con el control. Esta observación tiene varias explicaciones posibles: por una parte, puede tratarse de un efecto casual, ya que el número de animales de la serie experimental fué algo pequeño, siendo la probabilidad matemática de esta explicación de 1:22, la cual, aunque pequeña, no puede ser descartada completamente. Si la diferencia observada es real, significaría que existe un factor de crecimiento desconocido en la levadura (los factores conocidos han sido incluidos en la dieta básica con excepción de la B₁₂, que tiene un efecto distinto), factor que estimula el aumento de peso de los animales adultos bajo las condiciones experimentales usadas y no el de las crías, pudiéndose ello deber a que la falta de vitamina B₁₂ en la dieta afecte a las crías más que a las madres y, por lo tanto, las primeras no responden al nuevo factor y las últimas sí. Esta explicación es apoyada por algunas observaciones no publicadas con dietas bajas en B₁₂ y que contienen lactosa. Ellas causan una mortalidad muy elevada entre las crías, mientras que no afectan considerablemente a los animales adultos. Por otra parte, podría ser que el factor no pasara a la leche materna bajo las condiciones experimentales o que por alguna razón los animales muy jóvenes no respondiesen al mismo. Cunha y col. (10) encontraron un estímulo del crecimiento de cochinos jóvenes únicamente después de 45 días de suplementación con vitamina B₁₃, pero no estudiaron el efecto sobre animales de mayor edad.

El factor desconocido postulado podría ser la vitamina B₁₃ o la T, cuya acción fué suprimida en las crías por la falta simultánea de la vitamina B₁₂. En el caso de que así fuera, debería observarse un estímulo del crecimiento de las crías al suministrar simultáneamente vitamina B₁₂ y levadura torula. Este experimento se efectuó con las series Nos. 3 y 4. Realmente existe una pequeña diferencia en el crecimiento de las crías entre ellas, pero no es estadísticamente significativa. Se necesitaría un número de animales mucho mayor para decidir definitivamente si

las crías crecen mejor con vitamina B₁₂ y levadura que con vitamina B₁₂ sola.

Entre las series Nos. 5 y 6, es decir, las que recibieron el suplemento de vitamina B₁₂ puro o el "factor proteico animal" crudo, respectivamente, no hubo diferencia significativa en ningún respecto, lo que debe interpretarse en el sentido de que, bajo las condiciones experimentales usadas, el factor crudo no aporta ninguna sustancia activa adicional, con excepción de la vitamina B₁₂.

Una comparación entre los grupos Nos. 3 y 5, que recibieron el suplemento vitamínico de B₁₂ en la dieta o inyectado en la madre, respectivamente, revela una diferencia significativa respecto al crecimiento de las crías, que fué muy superior en el primer caso. Esta diferencia podría deberse a una dosificación o retención insuficiente de la vitamina inyectada. En parte, por lo menos, la diferencia podría ser causada por el hecho de que en el último período del experimento las ratas ya consumen alimentos sólidos y, por lo tanto, en el caso de que el suplemento sea ofrecido en la dieta, lo ingieren con ella.

La serie N^o 7 fué incluida para comparar la reproducción de las ratas alimentadas con la dieta experimental o la suplementada con vitamina B₁₂, con las que recibieron una dieta comercial completa que, según indicación del fabricante, contiene 13% de proteínas animales en forma de leche descremada en polvo y harina de pescado. El contenido en proteína cruda total en ambas dietas era igual (24%). Los animales de esta serie fueron tratados en igual forma que los otros, es decir, que las hembras nacidas y mantenidas por la dieta vegetariana se separaron pocos días antes de dar a luz y se les dió la dieta completa desde esta fecha y durante toda la lactancia. La mortalidad y el crecimiento de estas crías fueron comparables a los de las series que fueron tratadas con vitamina B₁₂ intraperitoneal, y el crecimiento de las crías fué inferior al de las series con la dieta basal suplementada con vitamina B₁₂. Sin embargo, nuestras crías normales, cuyas madres se han mantenido en esta misma dieta comercial durante toda su vida, crecen mejor y tienen menos mortalidad. El peso medio de destete a los 28 días en este caso es de 70 gramos, indicando que la dieta es satisfactoria. El peso inferior de las crías de la serie N^o 7 se explica porque probablemente la cantidad de vitamina B₁₂ contenida en esta dieta no basta para llenar rápidamente las reservas exhaustadas de

las madres que se habían alimentado anteriormente con la dieta deficiente. De todas maneras, este ensayo no da ningún indicio de que pueda existir en la dieta completa un factor de crecimiento que falte en la dieta basal, con excepción de la vitamina B₁₂.

RESUMEN

Se estudió la reproducción de ratas alimentadas con una dieta vegetal a base de soya y maíz y suplementada con grasa y todos los minerales y vitaminas conocidos, con excepción de la vitamina B₁₂, con y sin la adición de varios suplementos dietéticos. Levadura torula, agregada al 2% a la dieta básica pocos días antes de nacer las crías, no tuvo efecto sobre la mortalidad o crecimiento de éstas, pero causó un mayor aumento de peso de las madres durante la lactancia. Al inyectar a las madres antes del parto con vitamina B₁₂ desapareció la diferencia entre los grupos con y sin el suplemento de levadura.

No se observó diferencia ninguna entre los grupos que recibieron la dieta básica suplementada con vitamina B₁₂ pura o con una preparación cruda de "factor proteico animal" en cantidades correspondientes.

El crecimiento de las crías de la serie alimentada con la dieta adicionada con vitamina B₁₂ (40 gama/kg.) fué superior al del grupo en que se inyectó a las madres antes del parto con 15 gamas de la vitamina.

La mortalidad y el crecimiento de las crías cuyas madres se habían alimentado con la dieta vegetal hasta pocos días antes de dar a luz, cuando se les cambió por una dieta comercial mixta, especial para ratas, fué comparable al observado en los grupos cuyas madres recibieron la vitamina B₁₂ inyectada e inferior al de las series que recibieron la dieta vegetariana con la vitamina. Sin embargo, esta misma dieta comercial da resultados muy superiores en ratas que la han recibido durante toda su vida.

SUMMARY

The reproduction of rats, kept on a vegetarian diet of soy-meal and corn, fortified with vegetable oil, minerals and vitamins with exception of vitamin B₁₂, with and without some additional supplements, was studied. Torula yeast, when added to the basal diet at 2% level a few days before the birth of the

litters, did not have an effect on mortality or growth of the young, but caused a significant increase in the weight gain of the mothers during the lactation period. When the mothers were injected with 15 ug. of vitamin B₁₂ before the birth of the young, the mentioned difference between groups, fed the diets with and without yeast, disappeared.

No difference at all could be found between groups receiving the basal diet fortified with 40 ug./kg. of pure vitamin B₁₂ or with the corresponding amount of a crude commercial preparation of A. P. F.

Growth of the young was better in the group receiving the vitamin B₁₂ supplemented diet as compared with the series in which the mothers were injected with the vitamin before giving birth.

In another series, the pregnant females which came from the soymeal corn ration, were put on a commercial rat ration a few days before giving birth. The performance of the young born in this group was comparable to those whose mothers were kept on the experimental diet and injected with vitamin B₁₂, but inferior to those kept on the B₁₂ supplemented diet, although growth and survival of young born from mothers, kept during the whole life in the stock ration was much better.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Fortpflanzung von Ratten untersucht, die mit einer vegetarischen Diät, bestehend aus Soyabohnenmehl und Maismehl, und der Pflanzenöl und alle als lebenswichtig erkannten Mineralien und Vitamine, mit Ausnahme von Vitamin B₁₂, zugesetzt waren; diese Diät wurde allein und mit speziellen Zusätzen benutzt. In einer Serie wurden 2% Torulahefe von wenigen Tagen vor Geburt der Jungen an, zugegeben. In diesem Falle wurde kein verbessertes Wachstum oder geringere Sterblichkeit der Jungen beobachtet, wohl aber ein statistisch gesicherter Zuwachs in der Gewichtszunahme der Muttertiere während der Säugeperiode. Wenn die Muttertiere vor Geburt der Jungen mit 15 gamma Vitamin B₁₂ injiziert wurden, verschwand dieser Unterschied zwischen den Gruppen mit und ohne Torulazusatz im Futter.

Zwischen 2 Gruppen, von denen eine einen Zusatz von reinem Vitamine B₁₂ (40 gama/kg.) und die andere eine äquivalente

Menge eines rohen Präparates des "animal-protein factors" erhielten, konnte keinerlei Unterschied beobachtet werden.

Die Jungen der Serie, die das Futter mit Vitamin B₁₂ zusatz erhielten, wuchsen besser als diejenigen, deren Mütter vor ihrer Geburt mit dem Vitamin parenteral behandelt wurden.

Weiterhin wurde eine Serie so behandelt, dass trächtigen Weibchen, die immer mit der pflanzlichen Versuchsdiaät ernährt worden waren, wenige Tage vor der Geburt der Jungen, diese gegen ein kommerzielles Rattenfutter vertauscht wurde. Wachstum und Sterblichkeit der Jungen war in diesem Falle etwa gleich wie in der Serie, in der die Muttertiere Vitamin B₁₂ gespritzt bekamen und schlechter als in der Gruppe, die das Vitamin im Futter erhielten. Wenn die Muttertiere von Geburt an auf der kommerziellen Rattendiät gehalten werden waren, war die Überlebensrate und das Wachstum der Jungen wesentlich besser.

BIBLIOGRAFIA

- (1) W. G. Jaffé.—Z. Vit. Hormon u. Fermentforsch. 2, 494 (1949).
- (2) W. G. Jaffé.—Arch. Biochem. 27, 464 (1950).
- (3) W. G. Jaffé.—Arch. Venez. Nutr. 2, 20 (1951).
- (4) W. G. Jaffé.—Science 115, 265 (1952).
- (5) W. G. Jaffé.—Acta Cient. Venez. 2, 78 (1951).
- (6) W. G. Jaffé.—Arch. Venez. Nutr. 2, 381 (1951).
- (7) A. F. Nevak y L. G. Hauge.—J. Biol. Chem. 174, 645 (1948).
- (8) W. Goetsch.—Osterr. Zool. Z. 1, 193 (1947).
- (9) R. Woods.—Borden's Rev. Nutr. Res. 9, Nº 8 (1948).
- (10) T. J. Cunha, H. M. Edwards, G. B. Meadows, R. H. Benson, R. F. Sewell, A. M. Pearson y R. S. Glasscock.—Arch. Biochem. 28, 142 (1950).
- (11) W. G. Jaffé.—Arch. Venez. Nutr. 2, 303 (1951).
- (12) M. Piccioni, A. Rabbi y G. Moruzzi.—Science 113, 179 (1951).
Int. Z. Vitaminforsch. 13, 58 (1951).