

Estudio acerca de las necesidades mínimas en vitamina B₁₂ de Ratas en Reproducción

WERNER G. JAFFÉ
Instituto Nacional de Nutrición

El presente trabajo forma parte de un estudio a largo plazo que hemos estado llevando a cabo desde 7 años acerca de la influencia que tiene sobre animales de laboratorio (ratas y ratones) el consumo continuo de una dieta vegetariana reforzada con minerales y vitaminas con la excepción de la vitamina B₁₂. Este problema tiene cierto interés práctico en vista de que grandes sectores de las poblaciones mundiales consumen muy pocos o ningunos alimentos animales, mejor fuente de la vitamina en cuestión. Estas dietas populares vegetarianas no son completamente comparables con nuestra dieta experimental, porque generalmente presentan deficiencias múltiples en vitaminas, proteínas y calcio, además de su bajo contenido en vitamina B₁₂. Por lo tanto, consideramos los experimentos presentados y los ya publicados como primera fase de un estudio posterior acerca de una alimentación pluricarencial. En el presente trabajo nos interesó el problema de la dosis mínima necesaria de vitamina B₁₂ para la reproducción de ratas y se incluyen también observaciones acerca de la influencia de dicha vitamina sobre la tasa de glutación de sangre e hígado como también sobre la posible adaptación de los animales a la deficiencia crónica de la vitamina B₁₂, problema de gran interés para la alimentación humana.

Para el estudio de la dosis requerida de un nutriente, se han empleado varios métodos distintos. Para escoger un método apropiado, hay que tomar en cuenta el metabolismo es-

(1) La presente publicación incluye los datos experimentales de un trabajo publicado en inglés en *Journal of Nutrition*, vol. 59, pág. 135-146, mayo 1956.

pecífico del metabolito en estudio. En el caso de la vitamina B₁₂ es de importancia el hecho de que las reservas almacenadas en el cuerpo animal de este factor pueden ser tan considerables que durante un tiempo no se presentan estados de franca deficiencia al pasar los animales a una dieta en la vitamina. Una vez que las reservas se han gastado, el efecto biológico de dosis marginales de la vitamina aplicada con la dieta no tendrán un efecto apreciable inmediato hasta que el nivel en el organismo se ha elevado hasta por encima del margen de actividad fisiológica.

Por estas razones, ensayos experimentales a corto plazo acerca de la dosis mínima de la vitamina B₁₂ no darán resultados correctos que pudieran aplicarse a problemas de la alimentación humana.

En el presente trabajo se señalan algunos resultados obtenidos con ratas que se habían alimentado con las respectivas dietas y suplementos por lo menos durante una generación completa antes de iniciar los ensayos, de manera que eliminamos todo efecto de reservas almacenadas en los animales deficientes o respuestas atrasadas por depleción exagerada de los animales experimentales que recibieron suplementos marginales.

PARTE EXPERIMENTAL

La dieta usada fué la misma descrita anteriormente(1) y que contiene 46% de harina de soya, 46% de harina de maíz, 5% de aceite, 2% de mezcla de sales y 1% de mezcla de vitamina sin la vitamina B₁₂. Esta dieta no tiene actividad de vitamina B₁₂, determinada con *Lactobacillus leischmannii*. Las ratas usadas fueron descendientes de la cepa "Sprague Dawley" que se han tenido aproximadamente por 18 generaciones en esa dieta.

Los animales se tenían en jaulas comunes hasta que las hembras salieron preñadas. Estas se pasaron a jaulas individuales. Las crías se redujeron a 6 animales. Comida y agua se ofrecieron ad libitum.

Se prepararon dietas experimentales suplementando la dieta base con 3 mcg/kg, 5 mcg/kg ó 30 mcg/kg de vitamina

B₁₂; en el último caso se agregó además 0,2% de metionina. La dieta control fué un alimento comercial para ratas que contiene harina de pescado y sólidos de leche y tiene aproximadamente 30 mcg/kg de vitamina B₁₂. Las series de animales que sirvieron de base para los experimentos siguientes se habían alimentado por una generación por lo menos con la respectiva dieta antes del experimento presentado.

RESULTADOS

En la primera tabla se presentan los pesos medios de las crías a la edad del destete de 4 semanas. Se nota que con la dieta deficiente el peso de destete es un 25% inferior al de los controles; la dosis de 3 mcg/kg de vitamina B₁₂ tenía un efecto marcado aunque no causó un crecimiento normal, mientras que con la dosis de 5 mcg/kg el peso era igual al observado con 30 mcg. o con la dieta control (tabla No. 1).

El número de animales de cada camada que llegó a la edad de 4 semanas también era mayor en las series que recibieron un suplemento de vitamina B₁₂ que en los controles negativos (tabla No. 2). Esto significa en primer lugar una mayor mortinatalidad y mayor mortalidad en las primeras 48 horas entre las crías de la dieta deficiente en vitamina B₁₂ comparado con los controles; la mortalidad después de 2 días de nacidos no era significativamente aumentada en la serie deficiente.

No se observó un aumento en el número de animales nacidos en cada cría con la adición de la vitamina B₁₂ a la dieta, (tabla No. 3). Esto coincide con los resultados de experimentos no incluidos en el presente trabajo y en los cuales tampoco se pudo comprobar una relación significativa entre la suplementación con vitamina B₁₂ de la dieta y el número de animales que nacieron en cada parto (1). Sin embargo, la dieta de control causó un aumento significativo en el tamaño de las camadas. Lo mismo hemos observado en ratones(1).

El peso promedio de los animales recién nacidos y el cambio del peso de las madres durante la lactancia no mostraron diferencias evidentes entre las diferentes series experimentales. Se observó que la edad de las ratas hembras al dar a

luz por primera vez fué mayor en la serie de la dieta basal e igual en las series con 3 mcg ó 5 mcg de B_{12} /kg y los controles (tabla No. 4); esto significa que hay un atraso en la maduración sexual en ratas hembras deficientes en vitamina B_{12} .

Se estudió, en un experimento separado, el crecimiento de los animales jóvenes entre las 3 semanas y las 7 semanas de edad (tabla No. 5). Se notó una diferencia marcada entre la serie que recibió la dieta basal y los demás. La suplementación de esta ración basal con 3 mcg/kg de B_{12} ya era suficiente para resultar un crecimiento óptimo.

Se hicieron determinaciones del glutatión reducido, soluble en hígados y sangre de un número de ratas adultas de 2-3 meses de edad de las diferentes series experimentales, usando una técnica descrita anteriormente (2). Se ha incluido el estudio de este punto porque últimamente varios autores describieron un descenso bastante marcado en la tasa de glutatión de sangre e hígado en ratas hechas deficientes en vitamina B_{12} (3). En la tabla No. 6 presentamos algunos de nuestros resultados. Se observa que no hemos podido registrar diferencias importantes en el contenido de los hígados en glutatión entre las series de ratas que recibieron la dieta deficiente o una dieta suplementada con vitamina B_{12} .

Las diferencias observadas con respecto a la tasa de glutatión sanguíneo calculado sobre el contenido en eritrocitos, determinados por el hematocrito, entre los diferentes grupos experimentales son de significación dudosa y de menos importancia que las descritas por otras autores (3).

Esta diferencia entre nuestras observaciones y las de la literatura coincide con otra, a saber: la ausencia casi completa de mortalidad después del destete de nuestros animales deficientes en vitamina B_{12} . Varios autores que han trabajado sobre el tema describen una elevada rata de mortalidad de los animales deficientes en vitamina B_{12} después de su separación de la madre (4) fenómeno nunca observado por nosotros. También el crecimiento observado en nuestros animales deficientes es mucho mayor (más o menos el doble) que el registrado por otros autores bajo condiciones experimentales parecidas.

Como posible explicación para estas diferencias en los resultados experimentales se puede pensar en el hecho de que nuestras ratas se han mantenido por 7 años y aproximadamente 18 generaciones en la dieta basal sin interrupción, lo que posiblemente puede haber causado cierta adaptación biológica a la deficiencia en vitamina B₁₂.

Para estudiar esta posibilidad, se presenta en la tabla No. 7 el peso medio de destete de las ratas, mantenidas ininterrumpidamente con la dieta deficiente en B₁₂ desde la primera hasta la 18ª generación. El crecimiento de los animales de la primera generación es casi normal, debido a las reservas de vitamina B₁₂ acumuladas en las madres que antes recibieron una dieta completa. Desde la segunda generación en adelante el crecimiento es deficiente. No se nota una diferencia significativa entre las distintas generaciones que apoyaría la tesis de que se haya producido una adaptación a la deficiencia crónica en vitamina B₁₂.

Como resultado del presente trabajo se puede concluir, que bajo las condiciones experimentales usadas, la adición de 5 mcg/kg de vitamina B₁₂ a una dieta basal de soya y maíz, es suficiente para reproducción, lactancia y crecimiento normal de ratas. Mencionamos que en un trabajo anterior (2) observamos que para ratones la dosis correspondiente es de solo 3 mcg/kg.

RESUMEN

Un grupo de ratas se ha criado por 18 generaciones con una dieta de soya y maíz fortificada, deficiente en vit. B₁₂. Desde la 2ª generación en esta dieta se observó una alta mortalidad en las crías, bajo peso de destete, crecimiento lento después del destete y maduración sexual atrasada. Todos estos síntomas de deficiencia se eliminaron con la adición de 5 mcg/kg de dieta. La dosis de 3 mcg/kg no causó que las crías llegaran a tener un peso normal a la edad del destete, pero eliminó todos los demás signos de deficiencia.

Durante las 18 generaciones de observación, los animales con la dieta basal deficiente en vitamina B₁₂ no mostraron signos de adaptación que se hubiera manifestado en signos de deficiencia atenuadas.

Los niveles de glutatión hepático en todos los grupos de ratas estudiados al respecto eran normales.

SUMMARY

A group of rats has been kept for 18 generations on a fortified soy bean-corn ration, deficient in vit. B₁₂. From the 2ⁿ generation on a high mortality rate of the newly born was observed in this group, as well as a low weanling weight, slow growth after weaning, and delayed sexual maturity. All these symptoms were overcome, when 5 mcg of vit. B₁₂/kg of diet were added, while 3 mcg/kg were insufficient to cause normal weaning weight, although sufficient to overcome all the other deficiency symptoms.

During the 18 generations of observation, no signs of adaptation to the B₁₂ deficient diet were observed. The liver reduced glutathione levels in all the groups of rats studied were normal.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Gruppe von Albinoratten wurde während 18 Generationen mit einer Mais-Soya Diät ernährt, der Vitamine und Mineralien mit Ausnahme von B₁₂ zugesetzt waren. Von der 2ⁿ Generation an wurde eine hohe Sterblichkeit der Jungen nach der Geburt beobachtet, sowie geringes Gewicht zur Zeit der Entwöhnung, langsames Wachstum nach der Entwöhnung, späte sexuelle Reife. Alle diese Symptome verschwanden, wenn der Diät nur 5 mcg Vit. B₁₂/kg Diät zugesetzt wurden; bei einem Zusatz von 3 mcg/kg war das Gewicht der Jungen zur Zeit der Entwöhnung noch unter dem normalen, während alle andern Symptome verschwunden waren.

Es wurden während der Versuchszeit, die sich über 18 Generationen erstreckten, keine Adaptation an die an Vitamin B₁₂ defiziente Diät beobachtet, obwohl fast ausschliesslich mit Bruder -Schwester Zucht gearbeitet wurde.

Die Werte von Leber-Gluthation waren normal in allen Gruppen, in denen sie bestimmt wurden.

TABLA N° 1
PESO MEDIO DE CRIAS DE RATAS A LA EDAD DE 4 SEMANAS
ALIMENTADAS CON DIFERENTES DIETAS

Dieta	N° de crías	Peso medio en gr.
Basal	30	45.7 ± 3.1
id. + 3 mcg/kg Vit B ₁₂	15	57.7 ± 2.2
id + 5 mcg/kg Vit B ₁₂	24	66.6 ± 1.0
id. + 5 mcg/kg Vit B ₁₂	20	61.8 ± 3.1
Control	70	66.6 ± 1.0

TABLA N° 2
NUMERO DE ANIMALES QUE SOBREVIVIERON HASTA LA EDAD
DEL DESTETE POR CADA CRIA NACIDA

Dieta	N° de crías	N° de animales sobrevivientes/cría
Basal	30	3.6 ± 0.47
id. + 3 mcg/kg de Vit. B ₁₂	15	5.3 ± 0.18
id. + 5 mcg/kg de Vit. B ₁₂	24	4.8 ± 0.20
id. + 30 mcg/kg de Vit. B ₁₂	20	5.0 ± 0.44
Control	70	5.6 ± 0.11

TABLA N° 3
NUMERO DE ANIMALES NACIDOS POR CRIA DE RATAS

Dieta	N° de crías	N° de animales nacidos por cría
Basal	30	7.6 ± 0.37
id. + 3 mcg/kg Vit. B ₁₂	15	8.0 ± 0.62
id. + 5 mcg/kg Vit. B ₁₂	24	8.5 ± 0.55
id. + 30 mcg/kg Vit. B ₁₂	20	8.5 ± 0.50
Control	70	9.5 ± 0.29

TABLA N° 4
EDAD DE RATAS HEMBRAS AL TENER LA PRIMERA CRIA

Dieta	Edad en días
Basal	147 ± 2.5
id. + 3 mcg/kg Vit. B ₁₂	95 ± 4.4
id. + 5 mcg/kg Vit. B ₁₂	111 ± 3.8
Control	96 ± 3.7

TABLA N° 5
CRECIMIENTO DE RATAS MACHOS ENTRE LAS 3 Y 7
SEMANAS DE EDAD

Dieta	N° de animales	Crecimiento en gr.
Basal	23	91.3 ± 4.9
id. + mcg/kg Vit. B ₁₂	29	120.0 ± 3.1
id. + 5 mcg/kg Vit. B ₁₂	24	128.4 ± 3.3
Control	24	121.5 ± 3.7

TABLA N° 6
GLUTATION REDUCIDO EN HIGADOS DE RATAS
MACHOS ADULTOS

Dieta	N° de animales	Glutation mg/100 gr
Basal	17	211 ± 6
id. + 3 mcg/kg Vit. B ₁₂	11	222 ± 5
id. + 5 mcg/kg Vit. B ₁₂	6	218 ± 6
id. + 30 mcg/kg Vit. B ₁₂	6	202 ± 6

TABLA N° 7

PESO MEDIO DE CRIAS DE RATAS A LA EDAD DE 4 SEMANAS DE
GENERACIONES CONSECUTIVAS ALIMENTADAS CON UNA
DIETA BAJA EN VIT. B₁₂

Generación (aprox.)	N° de crías	Peso medio
1	12	63.1 ± 3.3
2—3	24	41.4 ± 2.1
4—5	19	47.9 ± 2.2
6—7	32	38.9 ± 1.8
8—12	32	43.1 ± 3.6
13—15	30	45.7 ± 2.8
16—18	21	42.9 ± 1.7

BIBLIOGRAFIA

- 1.—W. G. Jaffé, Arch. Venez. Nutr. 3, 59 (1952).
- 2.—W. G. Jaffé y P. Budowski, Acta Cient. Venez. 5, 131 (1954).
- 3.—C. T. Ling y B. F. Chow, J. Biol. Chem. 202, 443 (1953) U. D. Register, J. Biol. Chem. 206, 705 (1954).
- 4.—W. C. Sherman, H. L. Schilt y H. C. Schaefer, J. Nutr. 55, 255, 1955).