

UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Filosofía y Ciencias de la Educación
LABORATORIO DE NUTRICION
del
Instituto de Educación Física y Técnica
Prof. Dr. J. Mardones Restat

NUEVOS ESTUDIOS SOBRE EL FACTOR N.

Tesis para optar al título
de Médico Cirujano de la
—Universidad de Chile—

PAULINO DIAZ VERGARA

CH 846
1943

IMP. Y LITO. "LEBLANC"
SANTIAGO DE CHILE
===== 1943 =====

UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Filosofía y Ciencias de la Educación
LABORATORIO DE NUTRICION
del
Instituto de Educación Física y Técnica
Prof. Dr. J. Mardones Restat



NUEVOS ESTUDIOS SOBRE EL FACTOR N.

Tesis para optar al título
de Médico Cirujano de la
—Universidad de Chile—

PAULINO DIAZ VERGARA

IMP. Y LITO. "LEBLANC"
SANTIAGO DE CHILE
== 1943 ==

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE BIOLOGIA
Y CIENCIAS MEDICAS

La Comisión que prestó su aprobación a la Memoria del Sr. PAULINO DÍAZ VERGARA, titulada "Nuevos Estudios sobre el Factor N", estaba compuesta por los siguientes Profesores:

DR. EDUARDO CRUZ-COKE, Profesor Titular de Química Fisiológica.

DR. FRANCISCO HOFFMANN, Profesor Titular de Fisiología.

DR. ARTURO MARDONES A., Profesor Titular de Dietética y Nutrición.

FUE APROBADA CON VEINTIUN PUNTOS

Mínimum 12.

Máximum 21.

SANTIAGO, 5 de Agosto de 1943.

DR. ARMANDO LARRAGUIBEL
Decano

DR. ALDO CONTRUCCI
Secretario

A mis padres

Al Profesor Dr. Jorge Mardones,
muy agradecido

INTRODUCCION

En su tesis de prueba, presentada en 1942, expone E. Onfray los interesantes trabajos que ha llevado a cabo con el Profesor J. Mardones, en relación con el estudio experimental del alcoholismo, desde un punto de vista nuevo hasta el momento.

Partiendo de una idea original, y aprovechando una técnica de sólo reciente aplicación en otros centros científicos, orientan sus investigaciones, en el sentido de considerar el aumento del deseo por el alcohol, como el resultado de una carencia alimenticia, que estaría en íntima relación con un aporte deficiente de complejo vitamínico B.

Estos experimentos, realizados en la rata blanca, que representan una novedosa adquisición en lo que al determinismo del apetito específico por el alcohol se refiere, abren, sin duda, posibilidades inesperadas al estudio del alcoholismo en el hombre.

No nos parece necesario entrar a detallar extensamente la manera cómo fueron llevados a cabo estos trabajos, ya que ello ha sido hecho minuciosamente en la tesis a que hacemos mención al comenzar estas líneas. Diremos sólo, que se empleó permanentemente la técnica de auto-selección preconizada por Richter y su escuela para experimentos de esta especie. Este método consiste, en pocas palabras, en la observación de la conducta del animal en estudio, puesto en condiciones de elegir libremente entre distintas substancias que le son ofrecidas (en este caso, alcohol a diversas concentraciones y agua), y las modificaciones que dicha conducta sufre, al ser introducidos cambios, ya sea cualitativos o cuantitativos, en su alimentación.

Los primeros resultados obtenidos en estos experimentos, y que constituyen el punto de partida de los estudios posteriores, se refieren a la comprobación de un hecho, que desde un comienzo se nos presenta con toda la fuerza de la evidencia: en un momento dado constatamos un aumento del consumo de alcohol en la rata sometida a una dieta de hipovitaminosis B, comparado con el de los animales que reciben una alimentación normal. Esta dieta es la modificación de Egaña y Ruiz a la de Birch y Harris (1938),

y consiste en el reemplazo de la levadura de cerveza natural por una tratada al autoclave durante 5 horas, a 120° C y a un PH de 8.5-9.5.

Este aumento del consumo de alcohol se hace notorio a contar de la tercera semana de carencia, y se estabiliza en un nivel de valores, dos a tres veces superior al de los animales que sirven de control. Ahora bien, basta con reemplazar la levadura tratada por la normal, para que, inmediatamente, este consumo elevado recupere su nivel normal.

Posteriormente, se estudia la acción de otras sustancias ricas en complejo B, al ser añadidas a la dieta de carencia. De este modo son probados el hígado, carne muscular y germen de trigo, observándose con cada uno de ellos, el mismo efecto de la levadura de cerveza sobre el apetito por el alcohol.

Este fenómeno, cuya fidelidad en repetirse hace excluir toda duda, lleva a establecer, en primer lugar, que la propiedad observada, se encuentra unida de un modo constante a estructuras celulares ricas en complejo vitamínico B. Como consecuencia de esta primera observación, surge una hipótesis muy lógica, cual es, la de atribuir a alguno de los componentes conocidos de dicho complejo, la característica de modificar el afán por el alcohol.

La idea primitiva de Mardones y Onfray fué de relacionar este fenómeno con una carencia de Tiamina. Por lo tanto, el primer experimento que se realizó, fué en este sentido: se añadió esta sustancia a la dieta de carencia y se estudió el consumo de alcohol. Los resultados negativos de esta primera prueba, fueron pronto seguidos de la falta de respuesta frente a la administración de cinco otros elementos del complejo B, a saber: Riboflavina, Piridoxina, Acido Nicotínico, Pantotenato Cálcico e Inositol. Dados a las dosis demostradas como activas para sus acciones específicas, ninguno de ellos fué capaz de modificar, ni en mínimo grado, el consumo de alcohol.

Esta sustancia, al parecer nueva, recibe la denominación provisoria de FACTOR N. (J. Mardones R. - E. Onfray B.) (1942), nombre que nosotros continuaremos usando en adelante.

He aquí la marcha seguida hasta la fecha en estos estudios, y cuyos resultados constituyen las premisas de las cuales partiremos en la continuación de ellos.

El estudio aislado de los seis elementos que ya mencionamos, dejó abierta una interrogante, en el sentido de no haberse dilucidado aún, la acción de los restantes componentes del complejo B. Es así, que quedaban por estudiar: el Cloruro de Colina, Acido Para Amino Benzoico, Acido Adenílico y Biotina.

La primera parte de estos trabajos se refieren a la ineficacia de todos los componentes conocidos del complejo B, dados aisladamente o en conjunto.

Un segundo capítulo está dedicado al estudio del contenido en FACTOR N del hígado y levadura de cerveza.

Más adelante, exponemos un ensayo provisorio sobre el establecimiento de una unidad de esta nueva sustancia.

Finalmente, damos a conocer algunas propiedades de este elemento, que hemos podido precisar, en un intento por obtener concentrados a partir del hígado.

Estos trabajos han sido realizados, en parte, con fondos proporcionados por el Consejo Nacional de Alimentación.

Vayan nuestros agradecimientos muy sinceros al I. M. T. Sanitas, y, en forma especial, al Prof. Dr. H. Croxatto y Sr. R. de la Parra, por la eficaz ayuda que nos han prestado durante el curso de esta investigación.

Dejamos asimismo constancia de nuestro reconocimiento al Dr. E. Onfray B. y Srta. Natividad Segovia, a cuya valiosa cooperación se debe, en gran parte, el resultado obtenido.

Mezcla salina de Osborne y Mendel	5 "
Levadura de cerveza tratada (L1)	10 "
Aceite de hígado de bacalao (por rata, una vez por semana)	1.5 cc.

Con posterioridad, hemos introducido dos modificaciones importantes, una de las cuales se refiere a la levadura de cerveza, y la otra, a la caseína.

Onfray emplea durante todos sus experimentos, la levadura de cerveza del comercio (Cerevisina Dropa), que es sometida a un calentamiento de 5 horas al auto clave, a un PH alcalino (8.5-9.5), y a la temperatura de 120° C. Esta es la que él llama L1, base de la dieta 60, y que es la que provoca la carencia de FACTOR N en la rata. Nosotros continuamos empleando la misma en la primera parte de nuestros trabajos. Con el objeto de simplificar nuestra labor, y, previos estudios de su actividad, usamos a continuación, una levadura que sólo era tratada durante dos horas, en las mismas condiciones de PH y temperatura. Modificamos también la procedencia de la levadura, ya que en un tercer tiempo, sustituimos la Cerevisina por una levadura que nos fué proporcionada por I. M. T. Sanitas, que fué sometida a igual tratamiento. Esta levadura era obtenida fresca de la Cía. de Cervecerías Unidas, y llevada con prontitud a la desecación por medio de la máquina de Krause. Al comprobar en ciertas levaduras de cervezas comerciales un empobrecimiento marcado en FACTOR N, ensayamos también, durante un tiempo conveniente, una levadura de panificación del comercio (Golondrina), y que fué sometida al mismo tratamiento que la levadura de cerveza, entrando a sustituirla en las dietas en igual proporción. Sin embargo, tuvimos que abandonar su uso por presentar los mismos defectos que mencionamos al referirnos a las levaduras de cerveza comerciales. En cambio, la levadura proporcionada a nosotros por el I. M. T. Sanitas, ha manifestado una riqueza del factor más o menos constante, durante el tiempo más o menos prolongado que la llevamos usando.

Introducimos también un cambio respecto a la caseína. Onfray utilizó, para sus experimentos, un caseinógeno sometido a la técnica de purificación de Bomskow (1935), que consiste en una serie de disoluciones y precipitaciones alternadas, con lavados posteriores sucesivos con alcohol de 45° y 90°. De esta manera se elimina la Tiamina y, al mismo tiempo, las vitaminas A y D. Hemos estudiado si estas manipulaciones son necesarias para determinar carencia del FACTOR N, con el objeto de simplificar nuestra técnica. Por otra parte, interesaba saber también, si el contenido de vitaminas A y D en la caseína bruta del comercio, era suficiente para impedir la aparición de síntomas de carencia de ellas, en nuestras ratas.

De acuerdo con esta idea, se ha empleado una caseína del comercio, llamada "caseína al cuajo", producida por la Central de Leche Chile. Esta substancia es expendida en trocitos del tamaño

METODICA GENERAL

En líneas generales, podemos decir que hemos usado la misma técnica que empleó Onfray, salvo aquellas modificaciones que estimamos conveniente introducir, con miras a conseguir una mayor simplificación. Nos ahorraremos, por este motivo, entrar en abundancia de detalles, ya que nos remitimos por completo a la descripción que en la citada tesis aparece, en el Capítulo II, haciendo sólo hincapié en todo aquello que se haya cambiado.

Condiciones experimentales. — El animal de experimentación es la rata blanca en período de crecimiento, de seis semanas de edad, y de un peso de 60 a 100 grs. La práctica nos fué enseñando que obtuvimos mejores resultados con animales de un peso no inferior a 80 grs.

Los grupos estaban constituídos por 4 a 6 animales del mismo sexo, y colocados en las mismas jaulas que se usaron en los experimentos anteriores. Idénticos fueron también los dispositivos de auto-selección, como también las condiciones ambientales de temperatura. Al respecto, podemos decir que las variaciones diarias y estacionales fueron reducidas, en lo posible, mediante el uso, en tiempo frío, de una estufa eléctrica, de tal modo que la temperatura varió entre una mínima de 18° C en invierno y una máxima de 30° C en verano.

Dietas empleadas y líquidos en auto-selección. — En un comienzo, empleamos la misma dieta que usó Onfray, y que es una modificación de Egaña y Ruiz (1938) de la dieta de Birch y Harris (1934), con el objeto de provocar en la rata un estado de bradicardia que sirva de test de titulación de la vitamina B1.

Su composición es la siguiente:

Sacarosa refinada	60 grs.
Caseína blanca purificada	20 "
Aceite de olivas	15 "

de un garbanzo, aproximadamente, y se puede moler fácilmente, hasta reducirla a partículas del aspecto de sémola. No se ha modificado el resto de la composición de la dieta; sólo se ha reemplazado en ella, en cantidades iguales, la caseína purificada, por caseína del comercio al estado de tal.

Los resultados obtenidos con esta modificación, nos demuestran que la caseína del comercio no contiene FACTOR N, al menos en cantidad que permita apreciar su efecto.

Por otra parte, la ausencia de síntomas de carencia de vitaminas A y D, permite suponer que esta caseína proporciona un aporte de cantidades suficientes de estas dos vitaminas liposolubles, al menos cuando representa el 20% más o menos de la dieta, cual es el caso de la nuestra. Esto nos permitió suspender definitivamente la administración de aceite de hígado de bacalao, que es una operación de técnica molesta, y representaba un aporte extraordinario de lípidos que pudiera influir en el consumo de alcohol, en los días en que se daba (Mardones J., E. Onfray, P. Díaz, 1943).

Los líquidos empleados fueron el agua destilada y soluciones de alcohol a distintas concentraciones.

En un comienzo, usamos, al igual que Onfray, un recipiente que contenía el agua destilada, y 4 probetas de 50 cc. conteniendo, las dos primeras, soluciones al 5%, y las otras dos, de 10 y 20%, respectivamente. Más adelante, suprimimos la solución al 5%, y dejamos sólo las de 10 y 20%, en atención a un trabajo de Richter y Campbell (1940), en que estos autores demuestran que las ratas prefieren soluciones alcohólicas débiles (1.8%-4.8%) al agua de la llave.

Técnica general. — Los animales fueron pesados dos veces por semana, y el consumo de alcohol se leía diariamente en forma directa en las probetas graduadas, como asimismo, la ingestión de agua. Todos estos datos fueron anotados en la hoja de protocolo que se llevó de cada jaula. De esta manera, tuvimos el control diario del consumo alcohólico, referido a la unidad de 100 grs. rata, y las distintas modificaciones que experimentó cada grupo, frente a las variaciones dietéticas.

Al igual que en los experimentos anteriores, cuidamos, salvo escasas excepciones, que en cada serie de grupos hubiera una jaula con animales alimentados con la dieta normal, vale decir, la 62 de Onfray, con el objeto que nos sirviera de control, tanto de los animales carenciados, como de la riqueza en FACTOR N de las diversas levaduras. Por lo demás, estos testigos estuvieron sometidos a las mismas condiciones experimentales que los demás.

Esperábamos que los grupos de animales en carencia estabilizaran su consumo de alcohol en un nivel de valores manifies-

tamente alto, y entonces les eran administradas las distintas sustancias en estudio, siempre por vía bucal (1).

RESULTADOS

Durante nuestros experimentos, estudiando varias series de grupos, hemos comprobado plenamente las conclusiones a que llegó Onfray en sus trabajos. La dieta de carencia provoca en la rata un aumento del consumo alcohólico, que va ascendiendo lentamente, hasta llegar a un nivel de valores de casi seis veces el de los controles, en ciertas ocasiones, el que se mantiene estabilizado a esa altura, y que sólo es rebajado por la vuelta a la dieta normal, o por la adición a la dieta de carencia, de sustancias ricas en FACTOR N. Al lado de esto, comprobamos que este apetito aumentado por el alcohol, no guardaba ningún paralelismo con los síntomas de carencia de los elementos conocidos del complejo, ya que, como lo haremos resaltar más adelante, en ciertos animales se logró compensar, de un modo aparentemente perfecto, las carencias cutáneas y de desarrollo, sin que por eso se produjera ninguna modificación del consumo de alcohol. Verificamos, también, que el consumo líquido total era igual, tanto en los animales controles, como en los carenciados, observándose sólo variaciones dependientes de las condiciones de temperatura y sus cambios estacionales.

Daremos a conocer a continuación los resultados más importantes que hemos obtenido en el curso de nuestras observaciones.

I. — INEFICACIA DE LOS COMPONENTES CONOCIDOS DEL COMPLEJO B FRENTE A LA ELEVACION DEL CONSUMO DE ALCOHOL

Habiéndose estudiado la acción de 6 de los elementos del complejo B, faltaba, para completar este estudio, la observación referente a los factores aún no probados, a saber: Acido Para Amino Benzoico, Cloruro de Colina y un concentrado de Biotina. Nos faltaría aquí, naturalmente, lo que concierne al Acido Adenilico; pero la imposibilidad de conseguirnos esta última sustancia al estado de pureza requerida por nuestros experimentos, nos priva de este dato. Sin embargo, dado que es un elemento bastante termo-estable, hemos de pensar, fundadamente, que aún se encuentra en la levadura tratada.

(1) Para el caso de los factores del complejo B, usamos una solución de alcohol al 20%, de tal modo que en 0.1 cc. iba contenida la cantidad de sustancia requerida, y que dábamos con una pipeta graduada.

Estos elementos provienen de "The house of vitamins" International Vitamin Corp., U. S. A., y nos fueron proporcionados gratuitamente a nosotros, por el I. M. T. Sanitas.

1. — Acido Para Amino Benzoico

Kringstad y Lunge (1940) estudian una sustancia aislada del hígado fresco y levadura de cerveza, que llaman vitamina Bx, o "anti gray hair factor", por su propiedad de prevenir y curar la acromotriquia en ciertos animales. Posteriormente, se la identifica con el ácido para amino benzoico, y se le ubica entre los componentes del complejo B (S. Ansbacher y J. Martin, 1941).

Su acción sobre el consumo alcohólico, se encuentra expresada en el gráfico 1.

Desde el día vigésimo hasta el vigésimo octavo de carencia, dimos 0.500 mlgr. por rata y por día a 4 grupos de animales.

Durante el tiempo de su administración se manifestó una tendencia del consumo de alcohol, a hacerse más alto, lo que nos está demostrando que esta sustancia es incapaz de ese consumo. Añadiremos que no hubo modificación de ninguno de los síntomas de carencia en los animales en observación. La sensibilidad de los grupos fué comprobada con el cambio, desde el día 30, de la dieta 60, por la 62. Como puede apreciarse en el gráfico correspondiente, se produjo un inmediato descenso, que se mantuvo mientras los animales recibieron la dieta normal.

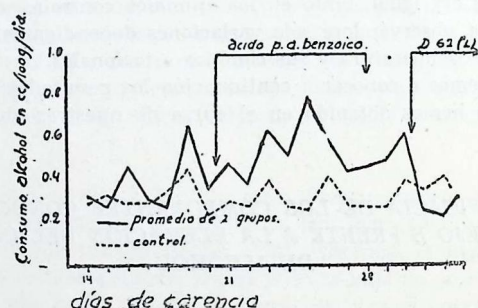


Gráfico N° 1. — Acción del Acido P. Amino Benzoico. Desde el día 20 al 28, 0.500 mlgrs. Ac. P. Am. Benzoico/rata/día.

Desde el día 30, Dieta Completa (L).

2. — Cloruro de Colina

Tiene este cuerpo importancia, por intervenir en el metabolismo de la célula hepática. Su rol como componente del complejo vitamínico B, ha sido determinado recientemente por György y Glodblatt (1940). Su carencia provoca, entre otros síntomas, la degeneración grasa del hígado de los animales de experimentación.

Veremos su acción a través de dos grupos, en el gráfico 2. Administramos, desde el día vigésimo cuarto al vigésimo nono, 0.500 mlgrs. diariamente a cada animal, siguiendo la técnica ya especificada.

Como se desprende del estudio de la curva que representa el promedio de consumo de los dos grupos, esta sustancia es también ineficaz, en lo que se refiere a hacer descender la ingestión de alcohol. Al igual que con el elemento anterior, no observamos ningún cambio en los animales, ni en su aspecto, ni en su conducta.

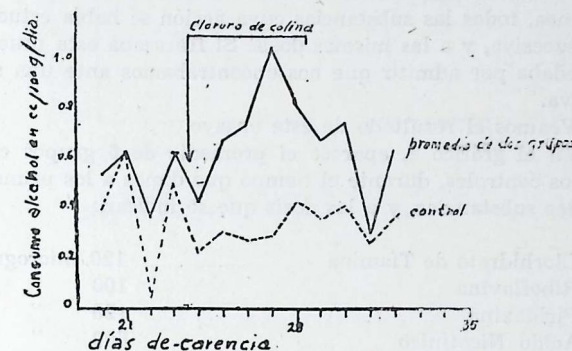


Gráfico N° 2. — Acción del Cloruro de Colina. Desde el día 24 al 29, 0.500 mlgrs./rata/día.

3. — Biotina

Este elemento ha sido identificado con la vitamina H y con el coenzima R, recibiendo la denominación de "anti-egg-white-injury factor" (P. György, Melville, Buck, du Vigneau, 1940). Dentro del complejo B, desempeña el rol de intervenir en el metabolismo intermediario de los hidratos de carbono.

En la imposibilidad de conseguirnos esta sustancia al estado de pureza, usamos un concentrado de hígado, rico en Biotina, preparado en el I. M. T. Sanitas, según la técnica dada a conocer por György, Kuhn y Lederer (1939).

En el gráfico 3 aparece la acción de la Biotina, sobre el apetito por el alcohol, al ser añadida a la dieta de carencia. Representa el promedio de dos grupos, comparado con un control.

El típico aspecto de la curva, nos habla en favor de la ninguna actividad de esta vitamina, en el problema que nos ocupa.

Dimos durante 5 días una dosis equivalente a 0.05 grs. de concentrado, que iban contenidos, esta vez, en 0.4 cc. de solución alcohólica al 20%.

La administración de este factor provocó, eso sí, una mejora notable en el aspecto de los animales en carencia, tanto de los síntomas de la piel, como en la curva de peso. Anotamos también, un aumento del consumo líquido total, explicable por el rápido ascenso ponderal.

4. — Mezcla de los componentes conocidos del complejo B.

La respuesta negativa que obtuvimos con la administración por separado de cada uno de los elementos que conocemos como integrantes del complejo B, en relación con el consumo de alcohol, nos permitió plantearnos dos hipótesis. La característica de rebajar la ingestión elevada de alcohol podría evidenciarse al dar en forma simultánea, todas las sustancias cuya acción se había estudiado en forma sucesiva, y a las mismas dosis. Si fracasaba esta prueba, sólo nos quedaba por admitir que nos encontrábamos ante una sustancia nueva.

Veamos el resultado de este ensayo.

En el gráfico 4, aparece el promedio de 6 grupos carenciados y dos controles, durante el tiempo que dimos a los primeros, las siguientes sustancias, y a las dosis que se indican:

Clorhidrato de Tiamina	120 microgr.
Riboflavina	100 "
Piridoxina	120 "
Acido Nicotínico	600 "
Pantotenato Cálcico	600 "
Inositol	600 "
Acido Para Amino Benzoico	500 "
Cloruro de Colina	500 "
Concentrado de Biotina	0.500 grs.

Estas cantidades iban contenidas en 0.4 cc. de la solución hidro-alcohólica, que dábamos diariamente a cada rata.

Como se puede ver, no hubo aquí, al igual que en los casos anteriores, ninguna modificación en el aspecto de la curva de consumo, lo que nos está hablando en el sentido de la inactividad de esta mezcla.

Es interesante hacer notar, que desde los primeros días, todos los animales, que en mayor o menor grado, presentaban síntomas de carencia del complejo, empezaron a mejorar su aspecto y a aumentar rápidamente de peso, hasta terminar presentando la misma apariencia externa que los testigos, alimentados con la dieta normal. De este modo, tuvimos la seguridad que, con las dosis empleadas, habíamos compensado perfectamente todas las carencias de factores del complejo, desarrolladas por el uso de la levadura tratada. Esta mejoría se mantuvo un cierto tiempo después que cesamos de dar la mezcla, al cabo del cual volvieron a aparecer en forma paulatina, los signos de carencia.

Resulta, pues, digna del mayor interés la observación que el consumo del alcohol se mantuvo elevado, a pesar de la regresión de todos los síntomas de carencia, y que sólo observamos un descenso de él cuando reemplazamos la dieta 60 por la 62, o añadimos a la primera alguna sustancia rica en FACTOR N.

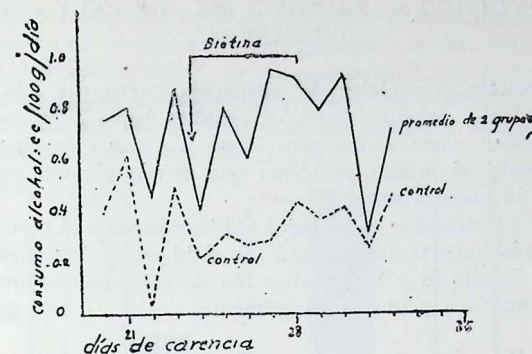


Gráfico N° 3. — Acción de la Biotina.
Desde el día 24 al 29, 0.050 gr. Biot./rata/día.

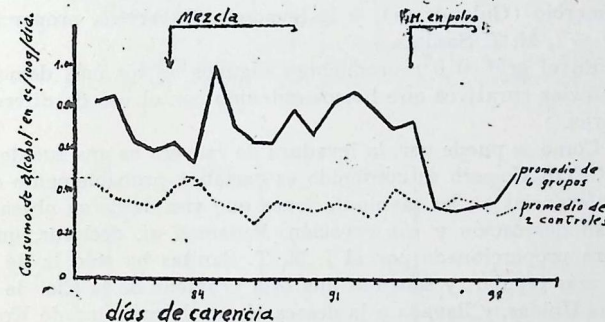


Gráfico N° 4. — Acción de la mezcla.
Desde el día 84 al 90, 0.4 cc. de la soluc./rata/día.

Los resultados de estos experimentos nos están demostrando, de un modo evidente, la ninguna actividad de las sustancias que se estudiaron, sobre el apetito por el alcohol, en los animales de experimentación sometidos a una dieta carente en FACTOR N. Añadidas a la dieta de carencia, a dosis en que manifiestan sus acciones específicas, ninguna de ellas fué capaz de rebajar la ingestión de alcohol, ni aún después de varios días de administración.

Estos resultados, unidos a los de Onfray, nos autorizan para concluir que ninguno de los componentes conocidos del complejo vitamínico B, posee la propiedad de hacer descender el consumo de alcohol elevado, que se provoca mediante el uso de una dieta que no contiene FACTOR N.

II. — CONTENIDO EN FACTOR N DEL HIGADO Y LEVADURA DE CERVEZA

Resuelto el carácter de substancia nueva del FACTOR N, era importante orientar nuestros estudios hacia la obtención de concentrados, como camino para llegar a aislar este elemento, y, naturalmente, el primer problema que se nos plantea, es la búsqueda de la materia prima.

De acuerdo con los trabajos efectuados hasta el momento, las fuentes más importantes parecen ser el hígado y levadura de cerveza, por lo que es a la investigación de estas fuentes que se encaminan nuestros primeros experimentos.

1.—*Levadura de cerveza.* — La levadura de cerveza desecada del comercio, se había demostrado activa, tanto en experimentos preventivos, como curativos, de la carencia de FACTOR N.

El bajo consumo de alcohol de los animales control de los experimentos de Onfray, y la mayoría de los nuestros, son una prueba del efecto preventivo de esta substancia.

En el gráfico 5 vemos expresada la acción preventiva de la levadura de cerveza del comercio (Dropa), levadura de panificación del comercio (Golondrina), y la levadura de cerveza proporcionada por el I. M. T. Sanitas.

En el gráfico 6 reproducimos algunos de los más demostrativos efectos curativos que hemos obtenido con el uso de diferentes levaduras.

Como se puede ver, la levadura de cerveza es una fuente rica en FACTOR N, pero su contenido es variable, probablemente debido a diferencias en las manipulaciones que van desde su obtención, hasta su desecación y conservación. Podemos, sí, declarar, que la levadura proporcionada por el I. M. T. Sanitas ha sido la de contenido más regular, y sabemos que ésta proviene de la Cía. de Cervecerías Unidas, y llevada a la desecación en la máquina de Krause, a las pocas horas de obtenida. (Ver el capítulo de Metodica).

2.—*Hígado.* — Lo hemos ensayado en sus dos formas: como hígado fresco de vacuno adulto o de ternera, y al estado de desecado, en polvo (Activina Hepática, del I. M. T. Sanitas).

A. *Hígado fresco.* — Sólo se usó el método curativo en los experimentos con hígado fresco, que aparecen representados en el gráfico 7.

Se puede observar que el contenido en FACTOR N del hígado fresco es, también, variable; variaciones que son explicables por la destrucción espontánea del principio, en el material fresco, destrucción a que nos referiremos más adelante, cuando nos ocupemos de las propiedades que hemos precisado respecto del FACTOR N.

B. *Hígado desecado.* — Usamos el hígado en polvo, elaborado en el I. M. T. Sanitas (Activina Hepática), y solamente en experimentos de curación de la carencia de FACTOR N.

Algunos ejemplos de su acción sobre el consumo de alcohol, se encuentran en el gráfico 8. Se trata aquí, de una substancia de contenido variable también. No podemos, eso sí, precisar si el bajo contenido es debido a la desecación, o si se ha producido con anterioridad a ella, ya que desconocemos los tiempos y detalles de técnica seguidos en su elaboración.

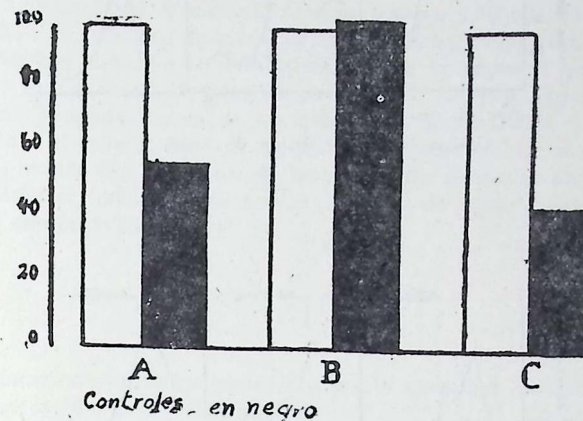


Gráfico N° 5. — Acción preventiva de las levaduras. En A, levadura del comercio (Dropa); en B, levadura de panificación del comercio (Golondrina), y en C, levadura del Sanitas.

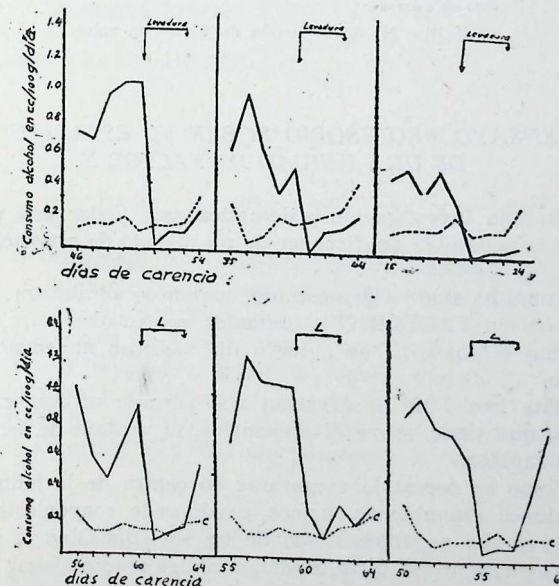


Gráfico N° 6. — Acción curativa de la levadura de cerveza.

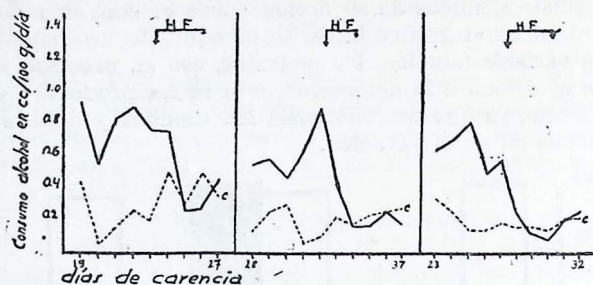


Gráfico N° 7. — Acción del hígado fresco.

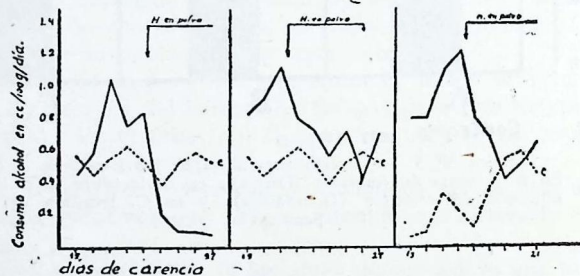


Gráfico N° 8. — Acción del hígado en polvo.

III. — ENSAYO PROVISORIO SOBRE EL ESTABLECIMIENTO DE UNA UNIDAD DE FACTOR N.

En una investigación sistemática para aislar este principio, es obvia la necesidad de disponer de un método de estimación cuantitativa.

Como ha sido ya demostrado, cuando se administra una sustancia rica en FACTOR N a animales carenciados, cuyo consumo de alcohol estaba alto, se observa un descenso inmediato de este consumo.

Este hecho de observación nos permite utilizar el método curativo, que tiene, sobre el preventivo, la ventaja de dar resultados más rápidos.

Como es necesario asegurarse en contra de la influencia de fluctuaciones espontáneas, hemos considerado conveniente utilizar para el cálculo, no el resultado de un solo día, sino el promedio de 5 días consecutivos. Esta condición obliga a administrar las sustancias por investigar, durante un tiempo que permita mantener el efecto durante esos 5 días. La experiencia nos ha demostrado

que para obtener esta duración del efecto, es necesario administrar la sustancia durante 3 días consecutivos.

Sobre estas bases, hemos definido la unidad de FACTOR N, como la cantidad de este factor que, administrada por vía bucal, a cada una de un grupo de no menos de cuatro ratas carenciadas, puestas en auto-selección, cuyo consumo de alcohol se encontraba claramente estabilizado en niveles altos (superiores a 0.50 cc. / 100 g. / rata / día), en cada uno de tres días consecutivos, determina, en los cinco días que siguen a la administración de la primera dosis, un consumo medio diario de alcohol por unidad de peso, igual a la mitad del promedio diario de los cinco días precedentes.

Para el caso de efectos superiores o inferiores al de la unidad, nos ha sido útil el empleo de las siguientes fórmulas empíricas, que utilizamos, mientras un número mayor de observaciones nos permita encontrar una mejor:

$$1. — N = \frac{(a}{b} - 1.2) 1.25.$$

donde:

N = número de unidades contenidas en la cantidad de sustancia que se administró diariamente;

a = promedio diario del consumo de alcohol en los 5 días que preceden a la administración de la primera dosis, expresado en cc/100 g./rata, y

b = promedio de los 5 días que siguen a la primera dosis, expresado en la misma forma;

y cuando $\frac{a}{b}$ es inferior a 1.5:

$$2. — N = \frac{a}{b} - 1.$$

IV. — ALGUNAS PROPIEDADES DEL FACTOR N

En el transcurso de nuestros trabajos, buscando el camino para llegar a obtener concentrados que nos permitan aislar el FACTOR N, hemos podido precisar algunas propiedades de este elemento, que consideramos interesante dar a conocer. Es necesario hacer notar que hemos trabajado a partir del hígado, que es, junto con la levadura de cerveza, una fuente rica y de fácil obtención. Hacemos esta aclaración, ya que esto nos dió motivo para comprobar un hecho muy significativo, del cual nos pasaremos a ocupar en primer término.

1. — Destrucción espontánea

Al hablar del hígado fresco como fuente de FACTOR N, dijimos que se trataba de un material de contenido muy variable, ya

que se producía una destrucción espontánea del principio en estudio, a las pocas horas, aún en condiciones normales.

A través de un número suficiente de observaciones, podemos aclarar lo que a esta propiedad se refiere, del siguiente modo:

a) Se produce esta destrucción o empobrecimiento, solamente si el material se mantiene húmedo. Este hecho lo hemos observado tanto en el hígado como en la levadura.

b) En ambiente seco, no se destruye, por lo que se evita el empobrecimiento, llevando el material a la desecación con prontitud.

c) En un PH de 4.5-5.6, que es el que espontáneamente adquiere una maceración de hígado en agua, ya a las 24 horas, se ha destruido un 90%, más o menos, del principio.

d) Se puede evitar la destrucción, colocando el medio a un PH de 2.2-1.8 por la adición de HCl; hemos visto mantenerse así igual la actividad durante 10 días.

2. — Sensibilidad al calor

a) Onfray precisó que un calentamiento de 5 horas a 120° C y a un PH alcalino, destruye por completo el FACTOR N en la levadura;

b) Nosotros hemos podido establecer que bastan 2 horas en las mismas condiciones, para lograr dicho efecto;

c) Sabemos, por otro lado, que resiste el calor húmedo hasta de 70° C en contacto del aire, por tiempo prolongado (procedimiento de desecación);

d) Por calentamiento a la temperatura de la ebullición, se destruye una parte importante, cuando no totalmente.

3. — Solubilidad

Se disuelve este factor en agua destilada y en alcohol de 10°, 20° y 70°.

4. — Otras propiedades

En concentrados ricos en FACTOR N, pudimos, finalmente, comprobar la ausencia de proteínas y de lípidos; en cambio, podemos decir que esos concentrados daban, a la vez, reacción positiva de Mollisch y Fehling (glúcidos reductoras), y precipitados con el ácido fosfo-túngstico y reacción del biuret positiva (polipéptidos).

R E S U M E N

1.— Se continúan las investigaciones de Mardones y Onfray sobre el FACTOR N, elemento del complejo vitamínico B, cuya carencia produce un aumento del consumo de alcohol en ratas blancas, colocadas en condiciones de auto-selección.

2.— Se demuestra que el Ácido Para Amino Benzoico, Cloruro de Colina y Biotina, dados aisladamente, no rebajan dicho consumo.

3.— Queda, asimismo establecido, que la administración simultánea de estos tres factores, junto con Clorhidrato de Tiamina, Riboflavina, Piridoxina, Ácido Nicotínico, Pantotenato Cálcico e Inositol, también es ineficaz.

4.— Se confirma la riqueza del hígado y levadura de cerveza en este factor.

5.— Se establece una unidad provisoria de FACTOR N.

6.— Se describen algunas propiedades de este principio, referentes a su estabilidad y solubilidad.

BIBLIOGRAFIA

- ANSBACHER S. y J. H. MARTIN (1941). — Proc. Soc. Exper. Med. & Biol. 48:118.
- BIRCH T. W y L. J. HARRIS (1934). — Biochemical J. 28:602.
- BOMSKOW (1935). — Methodik der Vitaminforschung, Leipzig.
- GYORGY P. y H. GOLDBLATT (1942). — J. of Exper. Med. 72:1.
- GYORGY P., R. KUHN y E. LEDERER. (1939). — J. Biol. Chem. 131:745.
- GYORGY P., MELVILLE, BUCK y DU VIGNEAU (1940). — Science. 91:243.
- KRINGSTAD H. y G. LUNDE (1940). — J. of Nutrition. 19:321.
- MARDONES J. y E. ONFRAY (1942). — Rev. Chil. Hig. y Med. Prev. IV - 293 - 297.
- MARDONES J. y E. ONFRAY (1942). — Rev. Chil. Hig. y Med. Prev. V - 17 - 20.
- MARDONES J., E. ONFRAY y P. DIAZ (1943). — Boletín Soc. Biol. (En prensa).
- MARDONES J. y E. ONFRAY (1941). — Com. a la Soc. Biol. 12 de Dic. Rev. Méd. y Alim. 5:148.
- MARDONES J. y E. ONFRAY (1942). — Com. a la Soc. Biol. 14 de Abril. Rev. Méd. y Alim. 5:149.
- MARDONES J., E. ONFRAY y P. DIAZ (1942). — Com. Soc. Biol. 5 Dic. Rev. Méd. y Alim. 5:224.
- ONFRAY E. (1942). — Tesis de Prueba. Universidad de Chile.
- RICHTER C. P. y K. H. CAMPBELL (1940). — Science 91, 2369:507.
- RUIZ P. (1938). — Tesis de Prueba. Universidad de Chile.

ESTE LIBRO DEBE SER DEVUELTO
EN LA ULTIMA FECHA TIMBRADA

[illegible]

Universidad de Valparaíso
Chile



00417472

