

TRABAJO DEL LABORATORIO DE LA CLÍNICA DE  
LOS DOCTORES VARELA Y RUBINO

## INVESTIGACIÓN DE LA VITAMINA D EN EL ACEITE DEL LOBO MARINO (ARTROCEPHALUS AUSTRALIS) DE LAS COSTAS DEL URUGUAY (\*)

por

J. A. COLLAZO                      A. GOSLINO

de Montevideo

La riqueza de los animales marinos en vitamina D ha sido investigada, hasta hoy, exclusivamente en las grasas de los peces. El bacalao especialmente, ha servido por el aceite de su hígado como fuente industrial para la preparación de vitamina D y de sus numerosas variedades farmacéuticas.

Después del descubrimiento de WINDAUS sintetizando por reacción fotoquímica la vitamina D, a expensas de la previtamina, por irradiación de la ergosterina que se extrae de los hongos, algas y levaduras, el uso del aceite de bacalao como a remedio único y específico ha disminuído, por lo menos, en importancia teórica. Sin embargo, la confirmación de la identidad de los efectos biológicos y de la mayor parte de las propiedades físicas y químicas de ambas sustancias, indica que pueden ser substituídas una por otra, existiendo quizá, a favor de los productos farmacéuticos derivados del aceite de bacalao concentrado (fracción insaponificable), una preferencia médica para uso, con carácter profiláctico, de la vitamina D.

La extraordinaria concentración, la variabilidad dentro de márgenes enormes de esta concentración de vitamina D y la toxicidad temible demostrada en el producto sintético derivado de la ergosterina, acentúa cada día la tendencia a usar la ergosterina irradiada más bien como a medicamento en el tratamiento del raquitismo grave, osteomalacia y en todos los casos de gran decalcificación con hipocalcemia e hipofosfemia, incluso la tetania idiopática y paratiropriva; en tanto que para el uso profiláctico o como tónico estimulante regulador del metabolismo mineral, tan importante en el niño, la utilización de los preparados del aceite de hígado de bacalao completo o de su fracción activa concentrada insaponificable, conserva su justificada preferencia.

La investigación de la riqueza en vitamina D de los animales marinos mamíferos, no ha sido llevada a cabo hasta ahora, o por lo menos, en lo que se refiere a los lobos de mar de las costas atlánticas del Uruguay. La industria de los productos obtenidos del lobo de mar se limita, en el Uruguay,

a la explotación de la piel y, en menor grado, de la grasa. Una fracción de esta grasa, separada por procedimientos mecánicos simples se usa, desde hace tiempo, como tónico antirraquítico. Su práctica, aunque sólo fundada en presunciones empíricas, se halla muy extendida en el Río de la Plata, por más que no se confiesa siempre su origen real.

Por esta razón proponemos presentar en el presente trabajo los primeros resultados de nuestros análisis de orientación cualitativa, obtenidos con una muestra de aceite de lobo marino recogida por el Instituto de Química Industrial del Estado (Director Dr. A. GOSLINO), en las costas de Maldonado (Uruguay). Durante mucho tiempo se ha creído que la actividad vitamínica de los aceites o grasas animales, aún de los peces, se reducía casi únicamente a los depósitos del hígado. Hoy está bien comprobado que la grasa subcutánea de reserva, y en mayor grado, la de los órganos (especialmente la de las glándulas), contiene también cantidades apreciables de vitamina D.

En las tablas publicadas últimamente en los libros sobre las vitaminas (1) se reconoce la riqueza de vitamina D no sólo en las grasas de los peces, sino también de los mamíferos, carnívoros y herbívoros terrestres.

Es fácil de comprender la existencia de vitamina D en todas las grasas de organismo animal, teniendo en cuenta su origen doble:

(\*) Comunicación al Primer Congreso Internacional de Biología de Montevideo. 10 al 12 octubre de 1930.

(1) The distribution of Vitamines in Nature (Issued by the Institute of Margarin Manufactures 1212, Munsly Building, Washington, D. C.); Report on the Present state of Knowledge of Accessory Food Factors (Vitamines) London, 1924 H. M. Stationery Office; C. FUNK, Die Vitamine, 3.<sup>a</sup> ed. Munich, 1924; R. BERG, Die Vitamine 2.<sup>a</sup> ed. Leipzig, 1928; Mc. COLLUM y Nina SIMMONDS, The newer Knowledge of Nutrition, 1928; L. RANDOIN y H. SIMONNET, Les donnees et les inconues de probème alimentaire, tomo II, La Question des vitamines, Paris, 1927; W. STEPP y P. GYORGY, Avitaminosen und Verwandte Krankheitszustände, Berlin, 1927.

a) por irradiación solar sobre los esteroides de la piel, y b) por acumulación, precisamente en las grasas de reserva, de la vitamina D liposoluble, aportada por los alimentos vegetales o animales.

La riqueza del organismo en vitamina D depende, por consecuencia, de la mayor ingestión de alimentos irradiados por el sol.

Los peces, sobre todo los más pequeños, se alimentan de algas expuestas largamente a las irradiaciones ultravioletas que no son absorbidas por el agua; en tanto que los peces grandes se nutren de aquéllos, incorporando así a sus reservas las grandes riquezas de vitamina D que conservan. El problema de las fuentes de las vitaminas del grupo liposoluble o vitaminas, A, D y E (también denominadas vitosteroides (FUNK) por su probable constitución química) ha sido estudiado sistemáticamente por DRUMMOND y sus colaboradores (1) siguiendo sus diversas etapas, desde su origen en los vegetales marinos hasta su acumulación en el hígado del bacalao.

El bacalao es carnívoro y se alimenta de arenques, sardinas, crustáceos y jibias, los cuales se nutren del plankton formado por crustáceos, gusanillos decápodos, copépodos y numerosas formas larvarias, las que, en último término, viven a costas de las diatomeas clorofílicas que existen en gran abundancia en las capas superficiales del mar, expuestas constantemente a los rayos solares. Tal es el ciclo de la vitamina del aceite de hígado de bacalao, desde los sencillos vegetales de que toma origen.

Pero ¿de dónde procede la vitamina D de las diatomeas?

Las experiencias de DRUMMOND y sus colaboradores han demostrado que las diatomeas clorofílicas (*Nitzschia closterium*) pueden crecer en el laboratorio a la luz, en soluciones de agua salada y esterilizada, y que otra pequeña alga de agua dulce (la *Chlorella*) crece también en soluciones de sales inorgánicas, químicamente puras. La misma comprobación ha sido hecha por FULMER, NELSON y WHITE, demostrando que ciertas levaduras pueden desarrollarse en un medio artificial sintético de sales inorgánicas y de azúcar puro, formando vitaminas capaces de mostrarse activas en las pruebas biológicas, realizadas en animales.

Estas nociones merecen recordarse, para sugerir el estudio de la alimentación del lobo de mar de nuestras costas, animal carnívoro estricto, desde luego, alimentado exclusivamente de peces y cuya grasa depende, en la mayoría de sus propiedades biológicas, de las condiciones de los alimentos. El lobo de mar, además, sale del agua, va a la playa de las islas y toma, precisamente a las horas del sol más intenso, largas sesiones de irradiación en nuestros veranos sub-tropicales.

Recordemos, finalmente, que las propiedades de

la vitamina D no sufren alteración fundamental durante las operaciones de extracción del aceite del lobo, semejantes, en buena parte, a las del aceite de bacalao: prensado de los órganos, decantación, hidrogenación, oxidación al aire, conservación prolongada, etc.

La vitamina D no se destruye por hidrogenación a 55° durante 36 horas ni por la oxidación baja temperatura, aún durante 20 horas; por lo demás, se sabe que se encuentra solamente en la pequeña fracción de insaponificable, es decir, entre los colesteroides y que se puede separar de la colesteroína por no precipitar con la digitonina. El aceite de lobo es de olor y sabor menos penetrante que el de bacalao, quizá por la existencia en menor cantidad, de ciertos ácidos grasos volátiles y bases aminadas, producidas por el comienzo de la putrefacción.

La substancia antirraquítica que se extrae del aceite de hígado de bacalao, así como la que se encuentra en el aceite de lobo marino, es seguramente idéntica al producto obtenido por irradiación, con luz ultravioleta, de la ergosterina (provitamina de WINDAUS) extraída de algas y levaduras o sintetizada en el laboratorio (TANRET, RIEDEL, WINDAUS).

Hablan a favor de esta identidad (POHL, WINDAUS, ADAM):

- a) El examen físico-espectroscópico.
- b) La inactivación prolongada con luz ultravioleta (WINDAUS, HARRIS y MOORE, SIMONNET y TANRET, ADAM, etc.)
- c) La absorción por el carbón animal (ADAM).
- d) La no precipitación por digitonina (NELSON y STEENBOCK).
- e) El formar en la fracción insaponificable (ZUCKER, PAPPENHEIMER, BARNETT, POULSSON, STEENBOCK, JONES y HART, DUBIN).
- f) El efecto antirraquítico en la raquitis experimental o espontánea, igual a la misma dosis de ambas substancias, no dando lugar a diferencia de ninguna clase en el mecanismo de su acción fisiológica (GYORGY, HARRIS y MOORE, SCHEUNERT, etc.)

#### PARTE EXPERIMENTAL

Diecisiete ratas blancas, de cuatro semanas aproximadamente, pesando entre 35 y 40 gramos y alimentadas anteriormente con el régimen del laboratorio (alfalfa, hojas de repollo, harina de maíz y agua) fueron sometidas al régimen de Mc. Collum o dieta raquitógena núm. 3143, durante 30 a 60 días.

#### REGIMEN DE MC. COLLUM

Trigo molido .....	330 gr.
Harina de maíz .....	330 gr.
Gelatina.....	150 gr.
Gluten.....	150 gr.
Carbonato de calcio .....	30 gr.
Cloruro de sodio .....	10 gr.

(1) DRUMMOND, Cod-liver Oil, Journ. Soc. Chem. Ind. 43, 928, 1924.

Las ratas se dividieron en cinco lotes, suministrando a cuatro de ellos aceite de lobo marino a la dosis de 10 gotas (lote 1), 5 gotas (lote 2), 4 gotas (lote 3) y 3 gotas (lote 4). El último lote (5), de control, no recibió aceite de lobo.

que consiste en someter a los animales a la excelente dieta raquitógena de Mc. Collum, adicionándole aceite de lobo en varias proporciones, para investigar cualitativamente la existencia del poder antirraquítico en dicha substancia, comparando sus

### PROTOCOLO DE LAS EXPERIENCIAS

Ratas blancas a régimen de Mc. Collum tratadas con aceite de Lobo marino del Uruguay, procedente del Instituto de Química Industrial de la Universidad de Montevideo. (Director A. Goslino)

N.º	Peso del animal			Duración de la exp. días	Cantidad de aceite de lobo marino por día Gotas	Examen de la existencia de raquitis en la rodilla, línea test.
	Inicial gramos	Final gramos	Diferencia gramos			
1	35	89	54	45	X	No hay raquitis
2	37	99	62	46	X	»
3	37	105	68	47	X	»
	Valor medio					
	36,3	97,6	61,3	46		
4	39	107	68	58	V	No hay raquitis
5	35	112	77	59	V	»
6	39	97	58	60	V	»
	Valor medio					
	37,6	105,3	67,6	59		
7	40	110	70	60	IV	No hay raquitis
8	39	81	42	60	IV	»
9	36	103	67	60	IV	»
10	40	90	50	60	IV	»
	Valor medio					
	38,75	96	57,25	60		
11	37	97	60	60	III	No hay raquitis
12	39	120	81	60	III	»
13	38	91	53	60	III	»
	Valor medio					
	38	102,6	64,6	60		

#### Animales en Avitaminosis D, dieta de Mc. Collum. Control

14	36	86	50	37	No reciben aceite de Lobo	Raquitis neta
15	35	81	46	37		»
16	36	73	37	35		»
17	35	75	40	35		»
	Valor medio					
	35,5	78,75	42,25	36		

Cada uno de los lotes se encontraba en una jaula independiente, de zinc y doble fondo, y la comida se renovaba todos los días con abundancia, así como el agua de beber. El aceite de lobo se administraba en la boca de los animales, por medio de un cuenta-gotas.

Como método para investigar la actividad vitamínica del aceite de lobo, usamos el profiláctico

efectos en animales en las mismas condiciones experimentales, pero que no recibieron aceite de lobo.

El criterio para juzgar de la existencia de la raquitis fué el histológico, analizando la línea «test» o línea de osificación y el cartílago de crecimiento de los huesos largos de la articulación de la rodilla.

Es sabido que el régimen de Mc. Collum produce la raquitis experimental en el término de cuatro se

manas, a más tardar, en las ratas jóvenes en vía de crecimiento. Adicionando de una substancia antirraquítica dicha dieta que posee todos los elementos biológicos para la buena nutrición y desarrollo del organismo, a excepción de la vitamina D, se evita la raquitis y entonces la línea de osificación endocondral se calcifica y la zona de crecimiento no pasa de una anchura de 15 a 20 células cartilaginosas, dispuestas en columna y diferenciándose hacia la diáfisis, que va transformándose en hueso compacto, mientras en la región hipofisaria se van formando trabéculas y huesos esponjosos.

Los animales fueron sacrificados al fin de la experiencia, les fueron extraídas las extremidades posteriores y éstas se seccionaron en el sentido anteroposterior y vertical, para estudiar el estado de la línea «test».

El corte de la zona del tejido de conjugación basta ya, macroscópicamente, como elemento de juicio muy aproximado para afirmar o negar la presencia de la raquitis. Cuando existe raquitis, la línea del cartilago es ancha, dentada, irregular y muy vascularizada; constituida por tejidos osteoides no calcificados. Para mayor claridad, puede darse una pincelada de nitrato de plata en solución al 5 por ciento sobre la región ósteo-cartilaginosa a examinar, dejándola durante un rato a exposición al aire y lavando luego con agua destilada.

La línea de calcificación aparece negra (plata reducida) y puede observarse bien con una lupa o un lente de poco aumento (cinco a diez diámetros). Cuando existen dudas, o si se prefiere así, puede realizarse el examen histológico, previa coloración especial por el método de van Giessen o de Kossa. Nosotros hemos apelado a ella alguna rara vez, en caso de duda. También hemos recurrido, en la presente experiencia, a la radiografía. Cuando existe la raquitis se observa una imagen turbia, dentada, ancha y transparente, en tanto que la línea «test» es delgada y neta y lineal en el estado normal, con osificación fisiológica correcta.

Todos los animales se desarrollaron hasta los sesenta días, en que terminamos las experiencias, en excelentes condiciones, pues el régimen de Mc. Collum, como ya es sabido, posee una acción selectiva, únicamente, sobre la defectuosa calcificación de los cartílagos, aun cuando los animales sean tratados por un corto tiempo, tan sólo, con él. Una alteración más profunda de los huesos, así como la esplenomegalia, se producen siempre que se prolonga dicho régimen por unos meses, sobre todo en ratas hembras que han tenido crías; pero éste no es el caso de nuestro trabajo, terminado a los 45 días. A pesar de la diferencia entre las diversas dosis de aceite de lobo (3 a 10 gotas) el resultado fué el mismo en las once ratas sometidas a régimen raquítico.

Todas las ratas tratadas con aceite de lobo presentaban signos de buena osificación en la zona de la línea «test»; es decir, investigación negativa de la existencia de raquitis.

La actividad del aceite de lobo, manifestada a la dosis de tres gotas por día y por animal, nos informa, además, aunque sin gran precisión, acerca del contenido en vitamina D del aceite de lobo. Habitualmente, un buen aceite de bacalao, debe prevenir la raquitis experimental a la dosis de 1-2 gotas diarias, en los animales sometidos al régimen de Mc. Collum.

El aceite de lobo marino, en la prueba examinada por nosotros, es ya activo a la dosis de tres gotas, lo cual nos indica que su actividad debe ser, aproximadamente, no menor de un 60 por ciento a 80 por ciento de la del aceite de hígado de bacalao.

En consecuencia, consideramos al aceite de lobo marino como un producto bastante rico en vitamina D, cuya actividad vitamínica conviene fijar por métodos más precisos.

Merece estudiarse la manera de concentrar su actividad, separando la enorme masa de substancias inertes y quizás aumentarla por irradiación ultravioleta.

## CONCLUSIONES

1.—El aceite de lobo marino (no exclusivamente del hígado) de las costas atlánticas de los Departamentos de Maldonado y Rocha (Uruguay) posee una muy apreciable riqueza en vitamina D, comprobada por el método profiláctico en la rata joven, mantenida a régimen raquítico de Mc. Collum.

2.—Su actividad profiláctica (tres gotas diarias bastan) nos autoriza a calcular, aproximadamente, una riqueza de un 60 a 80 por ciento del poder vitamínico del aceite de hígado de bacalao. Nuevas investigaciones deben informarnos con más detalles sobre la valorización más exacta del poder vitamínico, así como sobre ensayos de concentración de dicha propiedad biológica.

3.—Nuestras investigaciones han sido realizadas con una prueba de aceite de lobo marino recogida por el Instituto de Química Industrial de la Universidad de Montevideo.

## RÉSUMÉ

*Tenant compte de l'emploi très étendu de l'huile de loup marin des côtes atlantiques de l'Uruguay, comme médicament anti-rachitique, nous avons cru intéressant de l'étudier pour connaître et vérifier scientifiquement les propriétés qui jusqu'à présent lui ont été attribuées empiriquement.*

*A cet effet nous avons traité seize rats (soumis au régime rachitogène de Mc. COLLUM) avec différentes quantités de la préparation commerciale de cette huile, et nous avons constaté qu'aucun d'eux souffrait de rachitisme. Après soixanta jours nous avons tué ces animaux et nous avons procédé à l'examen*

de la ligne test ou ligne d'ossification, la quelle s'est montrée dans tous absolument normale. De même nous avons vu que l'huile de foie de morue doit prévenir le raticisme expérimentale avec 1-2 gouttes par jour, nous déduisons de ceci que son activité est à peu près de un 60-80 % de cette dernière.

Finalement nous croyons nécessaire de fixer par des méthodes plus précises la teneur en vitamines D de cette huile et de chercher la manière de concentrer son activité, en séparant l'énorme masse de substances inertes, en les soumettant à la irradiation ultraviolette.

#### SUMMARY

Taking in consideration the great use made in the atlantic coasts of Uruguay of the oil, extracted from the marine wolf, as an anti-rachitic medicament, we have judged inte-

resting to study it in order to know and verify scientifically its proprieties, which till to day have been empirically attributed to it.

Hence, we have treated sixteen rats (Submitted to Mc. Collum's rachitogen treatment) with different quantities of said oil's commercial preparation, and we have noted that none of them suffered of rachitism. After sixty days of experience we killed those beasts and examined the test line or line of ossification, being this in all of them absolutely normal.

We have also seen that this oil is yet active at a dosis three drops and while a good codliver oil must prevent the experimental rachitism witch 1-2 drops a day, we deduce that its activity is about 60-80 % of that last.

Finally, we esteem necessary to establish by means of a more accurate mehod quantity of vitamins D in said oil, and will tray the means of concentration of its activity, separating the enormour mass of inert substances, submitting them to the ultraviolet irradiations.