

SEGUNDA PARTE

FACTOR CITOTOXICO EN LA LECYTHIS OLLARIA ("COCO DE MONO")

Lewis Aronow, Ph. D. *
Dr. Francisco Kerdel-Vegas**

En vista de la caída del pelo ocasionada por la ingestión de semillas de coco de mono, se pensó que era posible que un factor citotóxico estuviera presente en estas nueces, produciendo un efecto adverso en las células del folículo piloso. Es bien sabido que las células del folículo piloso se multiplican rápidamente y que la mayor parte de las drogas citotóxicas usadas en la quimioterapia del cáncer pueden producir caída del pelo como uno de los síntomas tóxicos ¹.

METODOS

Por lo tanto, se determinó la actividad citotóxica de diferentes extractos de "coco de mono", usando células de mamíferos, en crecimiento in vitro, como sistema de prueba. Los estudios de Eagle, Foley y otros ^{2, 3} han demostrado la utilidad general de los sistemas de cultivo de tejidos, para determinar la actividad citotóxica. La célula de mamífero empleada fue la célula "L" murina, una célula fibroblástica originalmente obtenida de un ratón C3H en el Laboratorio de Earle en 1943, y derivada por Sanford y col. 5 en 1948. La Fig. 1, tomada del trabajo de Sanford y col., enseña la apariencia de estas células en 1948. Estas células se han mantenido in vitro desde entonces, usualmente multiplicándose de unas 20 a 30 veces cada semana. La Fig. 2 es una microfotografía de estas células, teñidas con Giemsa, recientemente obtenida en nuestro laboratorio.

El medio de cultivo empleado es una modificación del que inventara Eagle ⁶, cuyos componentes están enumerados en la Tabla 1. Se añade a las vitaminas, aminoácidos, sales, etc., suero bovino estéril hasta una concentración final del 10%

Los cultivos patrones de fibroblastos de ratón se mantienen en frascos de farmacia de 8 onzas, bien cerrados con tapones de silicón. (El silicón es preferible a la goma, desde que puede ser directamente flamea-

* Profesor Asociado de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Stanford; Profesor Visitante de Farmacología, Escuela de Medicina José Vargas de la Universidad Central de Venezuela (1963-1964).

** Profesor Titular de Dermatología, Escuela de Medicina José Vargas, Universidad Central de Venezuela. Ier. Adjunto del Servicio de Dermatología del Hospital Vargas, Caracas.

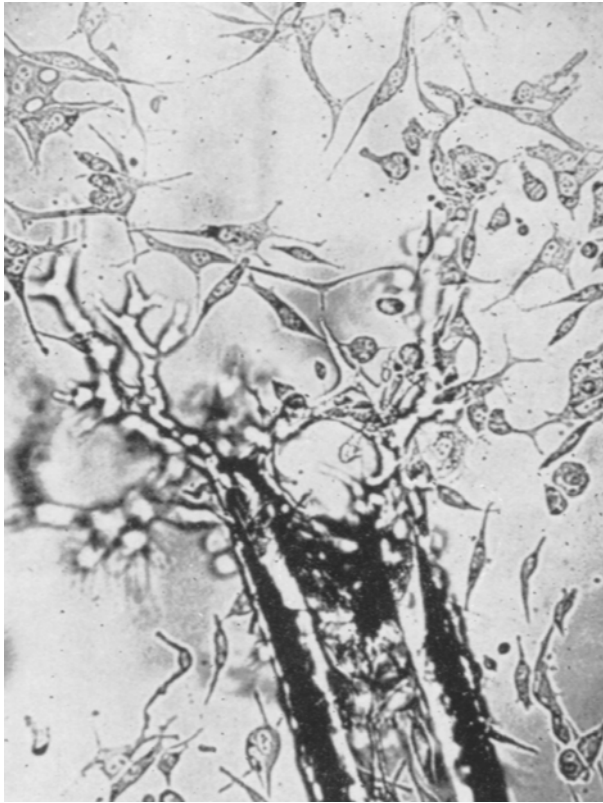


Fig. 1.-Esta microfotografía, tomada del trabajo de Sanford y col⁵ muestran la apariencia de los fibroblastos de ratón, cepa "L", derivada 929, tal como emergen del final roto de un tubo capilar, en el año de 1948. Estas células son todas progenie de una sola célula aislada en el tubo capilar. Las células redondas, más pequeñas, son aquellas que acaban de completar su división mitótica.

do para mantener su esterilidad sin producir daño al tapón). Un frasco de 8 onzas, con 20 ml. de medio de cultivo, contendrá alrededor de $4-5 \times 10^6$ células en su momento de crecimiento máximo. Las células se adhieren al piso del frasco. En la práctica, un frasco tipo, se vacía del medio de cultivo usado cada semana. Se añaden entonces 10 ml. de medio estéril al frasco, y las células se desprenden del piso del frasco, mediante raspado con un aplicador (con punta de goma en una varilla de vidrio). Se separan cerca de 9,5 ml. de la suspensión celular y se usan para propósitos experimentales o se descartan. Se añaden a la botella patrón 20 ml. de medio fresco, que luego se llena con una mezcla de 95% de aire y 5% de anhídrido carbónico, fuertemente cerrada, y se mantiene acostada en la incubadora a 37°C . Este procedimiento de subcultivo debe ser repetido una vez a la semana.

Los experimentos que requieren la determinación del crecimiento; en presencia de varios extractos de coco de mono, se hicieron de la manera siguiente: una suspensión celular, en medio de cultivo estéril, se obtiene de un frasco patrón, se diluye luego con medio fresco, y se mantiene en movimiento mediante agitación con un agitador magnético. Las dosis, en réplicas sucesivas de 20 ml. cada una, se dispensan automáticamente, bajo condiciones estériles, en un número grande (40 ó más) de frascos de prescripción de 8 onzas. El número de células que se han de usar en cada suspensión se calcula previamente de tal manera que cada muestra de 20 ml. de la suspensión diluida de células contiene entre 1 y 2×10^5 células. Los frascos se incuban luego a 37° C. El día siguiente, denominado "día 1", se retira un grupo de 3 frascos y se cuenta el número de células en cada uno. Las diversas drogas o soluciones que se van a probar en relación con su efecto citotóxico, se añaden entonces a otros grupos de tres frascos cada uno. Después de 4 ó 5 días de crecimiento, se termina

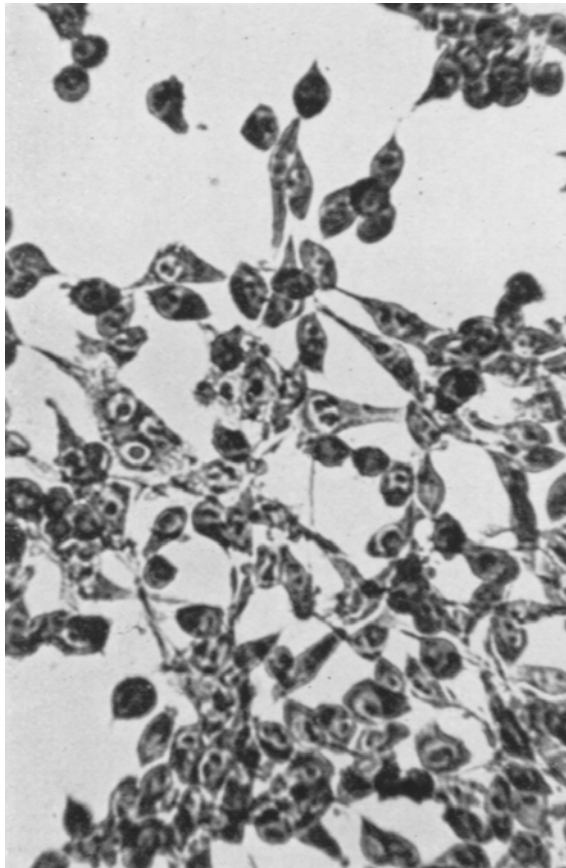


Fig. 2.-Los fibroblastos de ratón, cepa "L", derivada 929, tal como aparecían en 1963. Las células, mientras están adheridas a una lámina de vidrio, se fijaron en metanol y se tiñeron con Giemsa.

TABLA 1. COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO DE EAGLE (6)

<i>L-Aminoácidos+</i>		
1-arginina clorhidrato	0,10	milimolar
1-histidina clorhidrato	0,04	
1-cistina	0,04	
1-isoileucina	0,20	
1-leucina	0,15	
1-lisina clorhidrato	0,15	
1-metionina	0,05	
1-fenilalanina	0,08	
1-treonina	0,15	
1-triptófano	0,015	
1-tirosina	0,10	
1-valina	0,15	
<i>L- glutamina+</i>		
1- glutamina	2,0	milimolar
<i>Vitaminas+</i>		
tiamina	1	mg/litro
cloruro de colina	1	
ácido pantoténico	1	
ácido fólico	1	
piridoxamina	1	
nicotinamida	1	
biotina	1	
riboflavina	0,1	
1-inositol	0,2	
<i>Sales N° 1 +</i>		
NaCl	117	milimolar
KCl	5,4	
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1	
NaHCO ₃	26	
<i>Sales N° 2+</i>		
CaCl ₂ . H ₂ O	1,8	milimolar
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,9	
<i>Antibióticos y rojo fenol+</i>		
Penicilina	50	mg/litro
estreptomina	50	
rojo fenol	5	
<i>Glucosa+</i>		
Dextrosa	5	milimolar

+ Las soluciones patrones se hacen de la manera siguiente:

Aminoácidos, concentrados 20 veces; glutamina, concentrada 50 veces; vitaminas, concentradas 100 veces; sales N° 1, concentradas 10 veces; sales N° 2, concentradas 10 veces; antibióticos y rojo fenol, concentrados 100 veces; glucosa, concentrada 100 veces.

La glutamina, los antibióticos, y las soluciones patrón de vitaminas se mantienen en el congelador. Las otras se mantienen en la refrigeradora. La solución de glucosa se esteriliza en el autoclave y se mantiene en la refrigeradora.

Para hacer 1 litro del medio, se colocan 50 ml del patrón de aminoácidos en un cilindro de 1000 ml. Se añaden 20 ml del patrón de glutamina, 10 ml del patrón de vitaminas, 100 ml del patrón de sales N° 1, y agua destilada (en vidrio) hasta cerca de 700 ml. Se añaden entonces 100 ml de sales N° 2, 10 ml de antibióticos, y 10 ml de glucosa. El agua destilada se añade hasta completar 900 ml y la mezcla se esteriliza pasándola a través de un filtro de retención bacteriana, tal como el filtro Millipore HA. Se añaden entonces 100 ml de suero bovino estéril.

el experimento y se determina el número de células en cada frasco. Los frascos de control contendrán ordinariamente alrededor de $2-4 \times 10^6$ células al final del experimento, dependiendo del número inicial, dando así un factor de multiplicación de alrededor de 20 veces. Los frascos que contienen las diversas drogas tendrán un número variable de células, y esto puede ser expresado más convenientemente como porcentaje del crecimiento de control.

Las réplicas alícuotas de suspensiones celulares se dispensan en frascos usando un llenador "Filmatic" fabricado por la National Instrument Company, Baltimore, Maryland, USA. El número de células se determina automáticamente, mediante el contador celular Coulter, fabricado por la Coulter Company, Hialeah, Florida, USA (Fig. 3). El instrumento está constituido por dos electrodos incluidos en solución salina, separado uno de otro por un orificio de 100 micras de diámetro. Hay un

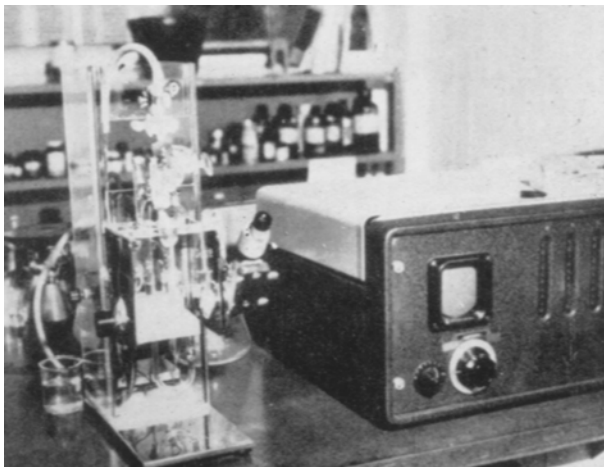


Fig. 3.- El Contador de Células Coulter usado para de terminar el número de células en una suspensión celular. El diseño del manómetro permite exactamente el paso de 0,5 ml. de una suspensión celular, a través de un orificio de 100 micras, que se observa hacia la izquierda. El instrumento electrónico, a la derecha, registra el número de partículas que pasan a través del orificio. En uso, el instrumento registra en forma precisa concentraciones celulares hasta de 40.000 a 50.000 células por 0,5 ml. Si la suspensión celular es más concentrada, se diluye usualmente al 1 por 10 con solución salina para obtener un contaje más preciso de la concentración celular. La parte electrónica del instrumento permite una calibración del "umbral", eliminando así contajes espúreos de pequeñas partículas de polvo. Los contajes "blancos" obtenidos cuando se usa únicamente el fluido de suspensión (cloruro de sodio 0,9%, tripsina 0,1%) son menores de 100 unidades por 0,5 ml.

dispositivo manométrico para permitir pasar exactamente 0,5 ml. de la suspensión de células, a través del orificio. Cada vez que pasa una célula a través del orificio, hay un cambio de la resistencia eléctrica entre los dos electrodos, y esto puede ser informado y registrado en el instrumento registrador electrónico.

En la práctica, el medio de cultivo usado se drena del frasco de cultivo cuyo número de células necesita ser determinado. Exactamente 10 ml. de 0,9% NaCl con 0,1% de tripsina, se añaden entonces, y las células se separan del piso del frasco raspando con la espátula de goma. La suspensión celular se pipetea dentro y fuera varias veces, usando una pipeta de 10 ml. y luego la suspensión celular se coloca en un pequeño tubo de ensayos. Estos procedimientos garantizan una suspensión celular uniforme, con pocos si es que hay algún "racimo" de células. Inmediatamente se cuenta la suspensión en el Contador Coulter. Desde que el número de células contadas puede ser bastante grande (contajes hasta de 40.000 se obtienen fácilmente), la exactitud del contaje es muy alta. Las variaciones en el número de células de frasco a frasco, dentro de un determinado grupo, es sorprendentemente pequeña, comúnmente menos del 5% y tres frascos dentro de cada grupo son más que adecuados para obtener resultados estadísticos significativos. La información presentada en la Tabla. 2, enseñando los efectos del extracto acuoso de coco de mono en el crecimiento de fibroblastos de ratón en un experimento como el descrito. arriba, ilustrará el tipo de información obtenida, y el tipo y extensión de las desviaciones encontradas.

TABLA 2. INHIBICION DE LOS FIBROBLASTOS DE RATON MEDIANTE UN EXTRACTO ACUOSO DE COCO DE MONO

Los extractos de las nueces de *Lecythis ollaria* fueron preparados tal como se describe en el texto y se probó su actividad citotóxica usando fibroblastos de ratón creciendo in vitro. Los extractos alcohólico y salino de las nueces no tenían actividad citotóxica, pero el extracto acuoso, añadido en cantidades variables a los cultivos en crecimiento, inhibieron el crecimiento en forma marcada. El "inoculum inicial" se refiere a los contajes de células obtenidos el "día 1", el día después de preparar los frascos réplica. Al mismo tiempo, porciones medidas del extracto acuoso de coco de mono se añadieron a otros frascos, y 4 días más tarde, se terminó el experimento. El número de células de cada frasco fue determinado. Los valores expresados son los promedios y los errores standard de un grupo de 3 frascos.

Grupo	Número de células/frasco			% de control		
	promedio	± error standard	promedio	+	error	-
Inoculum inicial (día 1)	4,81	± 0,03	10^5	9	± 0,1	
Control (sin ninguna adición)	53,2	± 0,8		100	± 1,4	
0,05 ml. de extracto	47,5	± 0,6		89	± 1,1	
0,10	37,9	± 0,8		71	± 1,1	
0,20	19,1	± 0,5		36	± 0,7	

RESULTADOS

Se obtuvo una cantidad de semillas de un árbol de la región donde se sabe que hay nueces tóxicas. Se secaron 600 gm. de almendras con cáscara toda la noche en una estufa a 80°C. y luego se realizó la extracción con benceno. El residuo insoluble en benceno se extrajo con etanol, y el material insoluble en etanol se extrajo primero con agua y luego con cloruro de sodio al 9%. Cada una de estas fracciones, excepto el material lipídico inicial, soluble en benceno, se probó, en relación con la actividad biológica, tal como se describió anteriormente. Los resultados indicaron que un potente factor citotóxico estaba presente, y podía ser extraído de las semillas con agua (Tabla 2).

Con un rápido sistema de bioensayo se pudo de manera directa, proceder al aislamiento del material activo. Se encontró que este material activo era estable al calor, en ácido y en álcali (Tabla 3), y era fácilmente dializable, se perdió al incinerarlo tanto en condiciones secas como húmedas (Tabla 4) ; finalmente, se observó que era parcialmente absorbido en una columna de Dowex-1, si se ajustaba el pH inicial a pH 11. No era absorbido en Dowex-1 en una solución neutra ; sin embargo, se absorbía bien en Dowex-50 en solución neutra (Tabla 4).

Estos estudios permitieron la preparación de una cantidad grande del material citotóxico purificado del coco de mono. El procedimiento adoptado fue el siguiente: las semillas trituradas se extrajeron con benceno para remover los lípidos, y el residuo seco se extrajo varias veces con agua caliente. Los extractos acuosos se combinaron, y centrifugaron, y el material sobrenadante se colocó en bolsas de diálisis y se dializó en un cuarto refrigerado contra un gran volumen de agua destilada. El dializado se concen-

TABLA 3. ESTABILIDAD DEL FACTOR CITOTOXICO EN MEDIO ACIDO Y ALCALINO

El material purificado del extracto acuoso de coco de mono fue investigado en relación con su posible actividad citotóxica tal como se describe en el texto. Partes alícuotas (0,4 ml) se trataron con 4 microlitos de 10 N HCl y 10 N NaOH, y calentadas en baño de maría por una hora. Luego fueron neutralizadas y se determinó la actividad citotóxica de 0,05 ml. Los testigos consistieron de 0,4 ml de agua, más el tratamiento ácido o alcalino descrito más arriba. Los valores mencionados son los promedios y el error standard de los grupos de tres frascos.

Grupo	Número de células/frasco promedio + error standard		Porcentaje de crecimiento celular	
Inoculum inicial	0,80	±	0,07 x 10 ⁵	2
Control	45,0	±	1,7	100
0,01 ml extracto	24,0	±	3,2	53
0,05 ml extracto	1,9	±	0,6	4
0,05 ml (tratamiento ácido)	1,5	±	0,6	3
0,05 ml (tratamiento alcalino)	1,1	±	0,1	2
ácido sólo	42,7	±	1,6	95
álcali sólo	44,1	±	1,5	98

TABLA 4. INESTABILIDAD DEL FACTOR CITOTOXICO DESPUES DE LA INCINERACION, Y ADSORCION EN COLUMNAS DE DOWEX-1 Y DOWEX-50

Se probó la actividad citotóxica de un extracto acuoso de coco de mono tal como se describe en el texto. Cantidades equivalentes del extracto fueron probadas después mediante (1) incineración seca en un tubo de ignición, (2) incineración húmeda con H₂SO₄ concentrado y H₂N₃, (3) paso a través de resina 1 ml Dowex-50 (H⁺), (4) paso a través de resina 1 ml Dowex-1 (Cl⁻), y (5) paso a través de resina 1 ml Dowex-1 (Cl⁻) después de haber alcalinizado al extracto. La incineración seca fue hecha calentando 0,5 ml de extracto en un tubo de ignición hasta el rojo vivo, y luego disolviendo la ceniza residual en 0,5 ml de agua, después de enfriar. El extracto original era de pH neutro. Todas las muestras se hicieron neutras antes de probarlas. Se incluyeron controles apropiados. Los valores señalados son los promedios y los errores standard de grupos de tres frascos.

Grupo	Número de células/frasco promedio + error standard		Porcentaje de control de crecimiento	
Inoculum inicial	1,9	±	0,1 x 10 ⁵	4
Control	52,7	±	1,0	100
Extracto, 0,04 ml	4,8	±	0,3	9
Extracto después inciner. seca	54,0	±	4,2	102
Extracto después inciner. húmeda	45,7	±	3,6	87
Extracto después Dowex-50	46,7	±	5,6	89
Extracto después Dowex-1 (neutro)	4,9	±	0,7	9
Extracto después Dowex-1 (alca lino)	32,3	±	3,0	61
Control de incineración húmeda	50,7	±	4,3	96

tró luego a un pequeño volumen, que se agitó con cloroformo para remover trazas de lípidos y proteínas. La solución acuosa, clara y amarillenta, entonces podía ser usada para trabajos de ensayo, o bien ser purificada aún más en una columna de intercambio iónico de Dowex-50.

Para mayor purificación, una cantidad de extracto acuoso dializado se pasó por una columna de Dowex-50 y se inició la elución con concentraciones en aumento de KCl (Figura 4). La densidad óptica a 260 micras también se expone en la Figura 4. El material activo pareció inicialmente presentar una elevación de absorción UV cerca de 260 micras pero esto fue probablemente una impureza, desde que muestras más puras del material, tenían menor y menor absorción ultravioleta.

Las fracciones N° y 24 y N°, 25 se combinaron y se obtuvo un precipitado cristalino por la adición de etanol. Era un material ligeramente amarillento, muy higroscópico e indudablemente todavía impuro. Sin embargo, se pesó una muestra, se diluyó en agua y se obtuvo una dosis-respuesta en la forma acostumbrada (Figura 5). La concentración necesitada para producir una inhibición del 50% del crecimiento de nuestro sistema de ensayo, fue de 3-5 microgramos por ml.

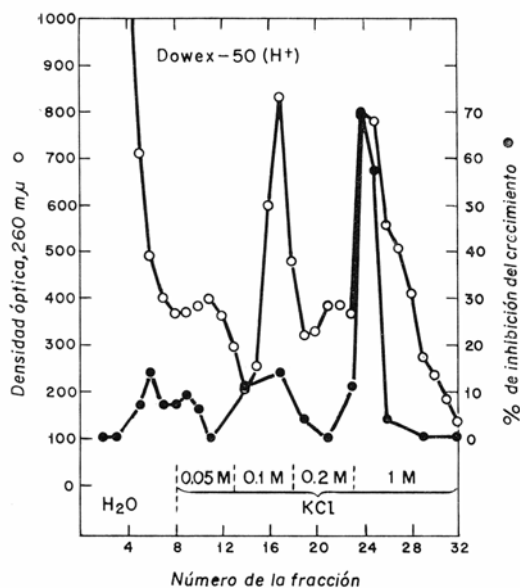


Fig. 4. Purificación cromatográfica del material citotóxico de extracto acuoso de coco de mono en una columna de Dowex-50. Un extracto acuoso de semillas de coco de mono se preparó en la forma que se describe en el texto. El extracto fue dializado, el dializado fue concentrado a un volumen menor, y agitado con cloroformo para remover cualquier traza de proteínas o lípidos. Un material representativo de 30 gramos de nueces con cáscaras se pasó a través de una columna de Dowex-50 (H⁺) (11 por 120 mm). Se lavó con agua, y se colectaron fracciones de 25 ml. cada una. Se comenzó la elución con 0,05 sol. molar de KCl, y subsiguientemente se cambió a 0,1 molar, 0,2 molar y 1 molar KCl. Es aparente en la ilustración que la actividad biológica fue eluida de la columna con 1 molar KCl. Las fracciones N° 24 y 25 fueron reunidas para mayor purificación y aislamiento del material cristalino.

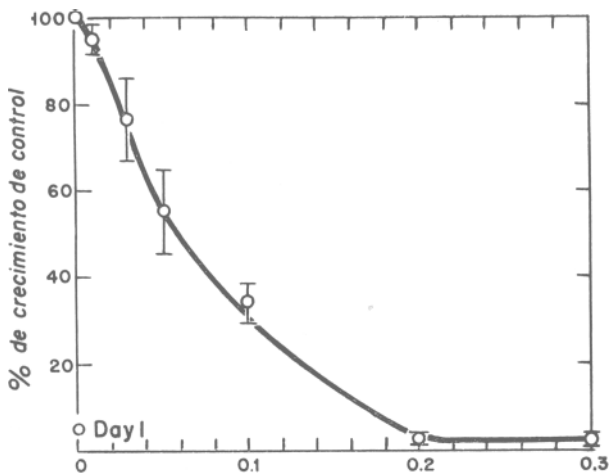


Fig. 5.-Curva de dosis-respuesta a una solución acuosa de material cristalino, purificado, obtenido del extracto acuoso de coco de mono. El material cristalino obtenido de las fracciones 24 y 25 en la separación cromatográfica mostrada en la Fig. 4, se disolvió en agua para obtener una concentración de 1 mg. por ml. El material en este momento fue denominado "venecina". Partes alícuotas de esta solución se añadieron entonces a los cultivos de fibroblastos de ratón en la forma acostumbrada. Es aparente que el 50% de inhibición del crecimiento se obtienen con una cantidad ligeramente superior a 0,05 ml. de esta solución, cuando se añade a 20 ml, de medio de cultivo. Así, la "ID₅₀" (concentración requerida para una inhibición del 50% del crecimiento) está cerca de los .3 microgramos por ml, concentración final en el medio de cultivo.

Al mismo tiempo, un grupo de químicos en los Laboratorios Wyeth prepararon un material cristalino purificado, a partir de los extractos de coco de mono, siguiendo procedimientos muy similares a los señalados anteriormente. Fueron capaces de identificar el compuesto como selenocistationina, o L-2-amino-4- (L-2-amino-2-carboxietil) senil-ácido butírico. La actividad biológica de este material fue exactamente equivalente a nuestro material, en cuanto a que la concentración necesaria para producir una inhibición del 50% del crecimiento fue también de 35 microgramos por ml.

El material cristalino purificado suministrado por los químicos de Wyeth, también exhibía comportamiento químico idéntico con muestra muestra menos pura. Así, era absorbida en Dowex-50 de soluciones neutras, y parcialmente absorbida en Dowex-1 de soluciones alcalinas. También era estable al calor en soluciones ácidas y alcalinas, pero perdía su actividad biológica al incinerarse. La Figura 6 es una fotografía de la

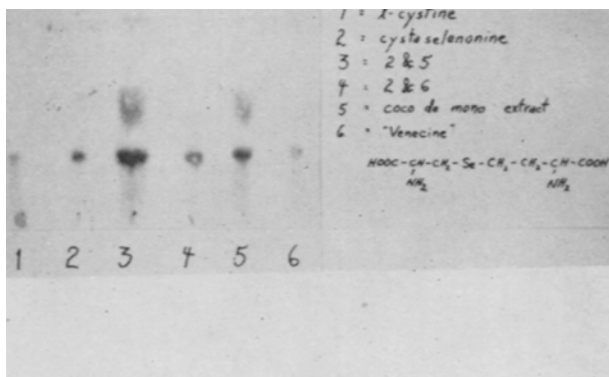


Fig. 6.-Cromatografía en capa fina de "venecina" (el material purificado aislado previamente); seleno-cistationina (material aislado por los químicos de Wyeth); y 1-cistina. El material cromatográfico fue celulosa TC, y el sistema solvente empleado fue n-butanol: piridina: agua (1:1:1). El color fue producido con nebulización de ninhidrina. Es aparente que nuestro material purificado, venecina, es idéntico a la selenocistationina, y migra idénticamente con la 1-cistina. El material cromatografiado en posición N° 5, o sea el extracto crudo de coco de mono antes del tratamiento en la columna de Dowex-50, muestra otro material positivo a la ninhidrina, además de la selenocistationina.

Cromatografía en capa fina presentando migraciones idénticas de selenocistationina (el material cristalino aislado por los químicos de Wyeth), y nuestro material purificado (llamado "venecina" en aquel tiempo).

Los efectos de la seleno-cistationina en la morfología de las células en crecimiento fueron examinados. El procedimiento fue como sigue: fueron colocadas láminas porta-objeto ordinarias de vidrio en un frasco de boca ancha y esterilizados en el autoclave. Las células suspendidas en el medio de cultivo se añadieron entonces a los frascos, y se les permitió incubar por tres días. En este momento, se añadió la seleno-cistationina en una concentración capaz de inhibir el crecimiento (15 microgramos por ml) a uno de los frascos; el otro frasco se dejó sin tocar, como testigo. El siguiente día, y diariamente después, se sacaron las láminas de cada uno de los dos frascos, y las células adherentes se lavaron sumergiendo el porta-objeto en una solución salina tampón y luego fueron escurridas. Las células se fijaron en metanol por 1 min., se tiñeron en solución de Giemsa diluida por 10 min., se enjuagaron con agua, se pasaron a través de etanol al 50%, 75%, y 100% y finalmente a xilol, antes de montarlas con Permunt y con la lámina cubre-objeto. Las Figuras 7 y 8 muestran la apariencia de células normales preparadas de esta manera. Las Figuras 9 y 10 demuestran la apariencia de células incubadas durante idénticos períodos de tiempo, pero en presencia de seleno-cistationina por 24 y 48 horas respectivamente. Las Figuras 11 y 12 demuestran la apariencia de las células después de 3 y 4 días respectivamente en presencia de selenocistationina.

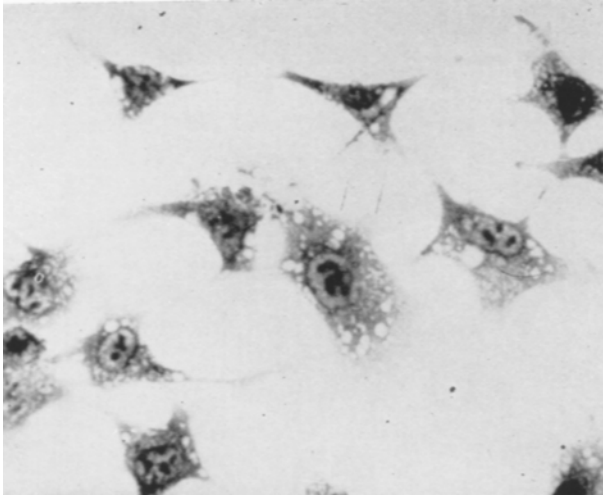


Fig. 7.-Células normales creciendo en láminas porta objeto en frascos de boca ancha, después de cuatro días de crecimiento. Las células fueron fijadas en metanol y teñidas con Giemsa tal como se describe en el texto.

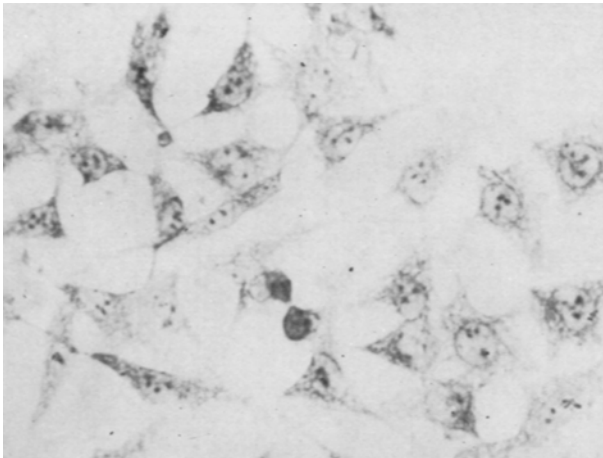


Fig. 8.-Células normales, como en la Fig. 7, pero un día más tarde. Es aparente que la densidad de las células aumenta rápidamente a medida que se dividen. Hay numerosas células, pequeñas, redondeadas, presentando una activa división mitótica.

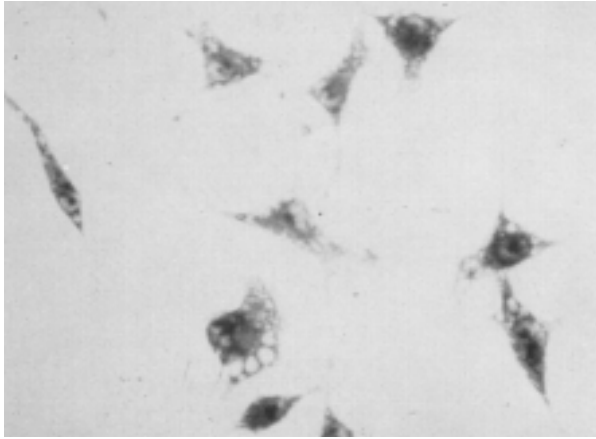


Fig. 9.-Estas células son un par exacto a la Fig. 7, pero han sido incubadas en presencia de seleno-cistationina (15 microgramos por ml) por 24 horas. La apariencia celular, tanto como la densidad, no parece ser muy diferente que las de las células mostradas en la Fig. 7. Sin embargo, hay ausencia de células pequeñas, redondeadas

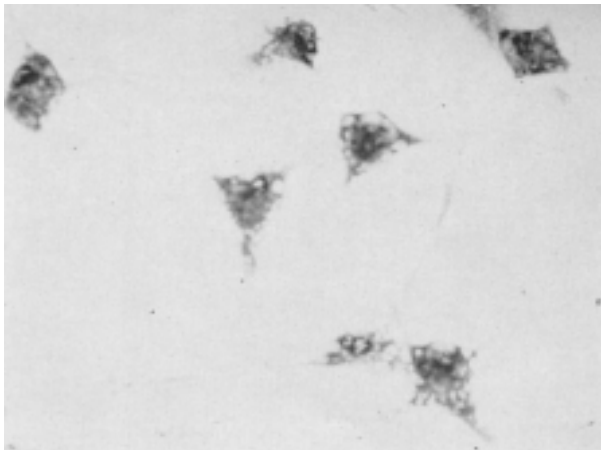


Fig. 10.-Células tratadas con seleno-cistationina por 48 horas. Comparar estas células con las de la Fig. 8. Es obvio que el crecimiento celular se ha detenido. No hay células pequeñas, redondas, y no se pueden discernir figuras mitóticas. Fig. 11.-Células tratadas como se ha descrito anteriormente, pero en presencia de seleno-cistationina por 72 horas.

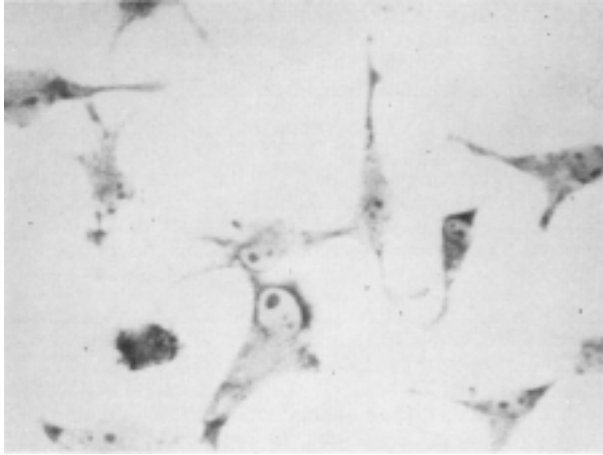


Fig. 11.- Celulas tratadas como se ha descrito anteriormente, pero en presencia de seleno-cistationina por 72 horas.

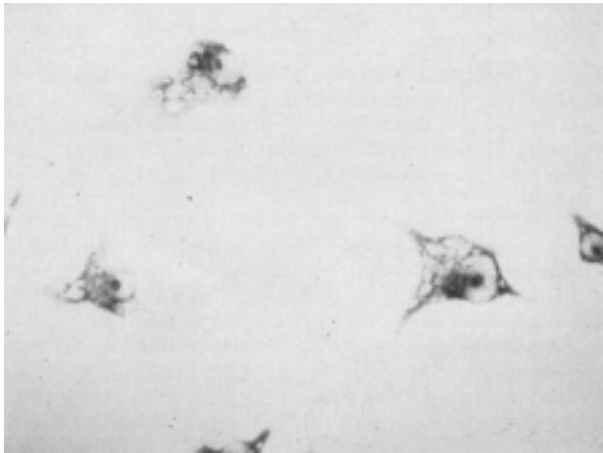


Fig. 12.--Células tratadas como se describió previamente, pero en presencia del seleno-cistationina por 96 horas. Las células normales cultivadas por ese lapso en medio de cultivo corriente, recuerdan las de la preparación demostrada en la Fig. 8, excepto que la densidad celular se hace mayor

Algunos experimentos se realizaron entonces para explorar el mecanismo de acción bioquímico de la seleno-cistationina. Los experimentos comprendieron la adición de ciertos compuestos en un esfuerzo para revertir los efectos tóxicos de la seleno-cistationina.

Como ejemplo de este tipo de trabajo, hay muchos estudios con antimetabolitos como la ametofterina o la 6-mercaptapurina. Estos antimetabolitos también ejercen efectos tóxicos en células cultivadas in vitro y los estudios demostrando que las formas utilizables de ácido fólico (en el caso de la ametofterina) o adenina (en el caso de la 6-mercaptapurina) pueden revertir sus efectos citotóxicos, han sido de gran valor para dilucidar el mecanismo de acción de estos antimetabolitos.

En el caso de la seleno-cistationina, se hicieron intentos para revertir los efectos tóxicos, añadiendo una variedad de compuestos con azufre. Algunas de las informaciones obtenidas aparecen en las Tablas 5 y 6. Se puede observar (Tabla 5) que la l-cistina es efectiva en revertir los efectos tóxicos de la seleno-cistationina, tal como lo es la d, l, + alocistationina. Otros compuestos sulfhídricos, incluyendo la d-cistina, glutatión reducido y homo-cistina fueron inefectivos. Otros estudios demostraron que la d-cisteína y el mercaptoetanol eran también inefectivos. La l-cisteína era tóxica por sí misma para las células, en concentraciones mayores de 10 gammas/ml. Por lo tanto, para demostrar el efecto antagónico de la selenocistationina, fue necesario añadir pequeñas cantidades de l-cisteína diariamente al medio de cultivo (Tabla 6). Así, sólo aquellos compuestos capaces de proporcionar l-cisteína a las células fueron efectivos en bloquear los efectos tóxicos de la seleno-cistationina.

TABLA 5. REVERSIBILIDAD DE LA TOXICIDAD DE LA SELENO-CISTATIONINA

Se añadieron varios compuestos al medio de cultivo, con una concentración tóxica de seleno-cistationina y sin ella, en un esfuerzo por revertir los efectos inhibidores del crecimiento ocasionados por el aminoácido conteniendo selenio. Los resultados expuestos son el porcentaje de control de crecimiento (sin adición del medio de cultivo), expresado como promedio del grupo de tres frascos.

Medio de cultivo suplementado con:		Sin seleno-cistationina	Con seleno-cistationina,
Nada	10 gamma/ml	100%	7%
l-cistina,	10 y/ml	111%	11
" 100		108	89
" 200		121	111
d-cistina 100		83	6
" 300		68	7
d, l + alocistationina,	10	96	6
" 100		86	36
" 300		97	76
d, l-homocistina, 100		89	3
l-glutatión, rojo 10		94	6
" 100		10	4

TABLA 6. REVERSION DE LA TOXICIDAD DE LA SELENO-CISTATIONINA CON LA L-CISTEINA

Las réplicas de cultivos, conteniendo 15 ml de medio de cultivo, recibieron 150 microgramos de 1-cisteína en los días 1; 1 y 2; 1, 2 y 3; ó 1, 2, 3 y 4. Recibieron seleno-cistationina, 150 microgramos en el día 1. Los resultados son expresados como porcentaje de control de crecimiento (sin adiciones al medio de cultivo) se observaron en el día 5 y se expresaron como promedio y error standard de un grupo de tres frascos.

Medio de cultivo suplementado con:	Sin seleno-cistationina	Con seleno-cistationina
Nada	100% ± 2,7	17% ± 2,0%
1-cisteína, día 1 solamente	112 ± 2,1	24 ± 0,9
días 1, 2	115 ± 3,0	25 ± 4,0
días 1, 2, 3,	115 ± 2,4	32 ± 2,6
días 1, 2, 3, 4	114 ± 3,0	34 ± 3,7
1-cistina, 1,5 mg, día 1 solamente	114 ± 2,6	83 ± 7,9

DISCUSION

Queda claro de este trabajo, que el factor citotóxico encontrado en las nueces de la *Lecythis ollaria*, es una molécula soluble en agua, termoestable, dializable, insoluble en solventes orgánicos o etanol. Los químicos de los Laboratorios Wyeth⁷ han tenido éxito en identificarla químicamente como 1-selenocistationina, el análogo selenífero del aminoácido azufrado cistationina.

El análogo de la cistationina conteniendo selenio fue inicialmente aislado por Horn y Jones¹⁰ en una planta del Oeste de los Estados Unidos, el *Astragalus pectinatus*, en 1941. Shrift y Virupaksha también han informado su presencia en la *Stanleya pinnata*¹¹. La presencia de material tóxico obtenido de plantas provenientes de regiones seleníferas del mundo ha sido reconocida desde hace mucho tiempo y hay varias revisiones excelentes disponibles acerca del problema del envenenamiento por el selenio^{12, 13}. Es curioso notar que una de las descripciones escritas inicialmente de envenenamiento por el selenio en el ganado es el informe de Madison¹⁴ quien en 1856 describió una enfermedad fatal entre los caballos que pastaban en ciertas regiones del Territorio de Nebraska, en el Oeste de los Estados Unidos. Típicamente, los caballos perdían el pelo largo de la crin y de la cola y los cascos se hacían dolorosos. Se trataba, desde luego, de efectos marcados en las estructuras queratinosas. El envenenamiento por selenio en el ganado se conoce con los nombres de "enfermedad alcalina" y "ceguera tambaleante". Un síndrome similar había sido descrito previamente en humanos, probablemente porque el tipo de vegetación hasta entonces conocida que crecía en áreas con suelos seleníferos, no es consumida en grandes cantidades por humas. Weisberger y Shurland¹⁵ han escrito, sin embargo, la toxicidad de la d, 1-seleno-cistina en pacientes con leucemia. Estos autores informan náusea persistente y severa, vómitos, anorexia, caída del pelo y separación de las láminas ungueales de sus lechos, asociados con dosis diarias de 50

a 200 mg. Las pruebas de funcionalismo hepático y renal permanecieron normales. La toxicidad variable observada en Venezuela con diferentes semillas de *Lecythis ollaria*, puede probablemente deberse al contenido variable de selenio en el suelo en los alrededores de los diversos árboles.

Los estudios que presentamos indicarían que el factor citotóxico en los extractos acuosos de estas semillas es enteramente debido a la selenocistationina. Así, los efectos tóxicos de los extractos de nueces crudas y de las muestras altamente purificadas de selenocistationina cristalina son igualmente revertidos por la adición de L-cistina al medio de cultivo. Además, aparentemente toda la actividad biológica en los extractos crudos acuosos de las semillas era debida cuantitativamente al aminoácido seleno-cistationina.

En relación con el mecanismo de acción de la seleno-cistationina, parecería probable que el material interfiriera con la utilización del aminoácido azufrado L-cisteína para la síntesis de proteína. En nuestro sistema de células creciendo *in vitro*, esta restricción en la cantidad de cisteína utilizable significa que el crecimiento celular llega a detenerse. Sin embargo, la caída del pelo observada después de la ingestión de semillas de coco de mono, probablemente no se debe a un efecto citotóxico de la selenocistationina en las células del folículo piloso, sino a una interferencia en la utilización de la cisteína por las células de los folículos pilosos en la formación del pelo. Es bien sabido, desde luego, que la cisteína está presente en altas concentraciones en el pelo, y es de importancia vital en el proceso de la queratinización. Es interesante observar que el talio, un agente depilatorio mucho mejor conocido que la seleno-cistationina, también puede ser bloqueado en sus efectos por el aminoácido L-cistina 16, 17 Así, el talio probablemente bloquea, de alguna manera, la utilización de la cisteína en la formación del pelo.

La reversibilidad de la citotoxicidad determinada por la L-cistina o la D, L, + alo-cistationina da apoyo a la sugestión de que el efecto último de la seleno-cistationina es el bloqueo de algún aspecto del metabolismo de la cisteína, desde que estos compuestos conteniendo azufre son precursores directos de la L-cisteína.

La misma L-cisteína, en alta concentración, es tóxica a las células *in vitro* (probablemente al hacer enlaces con metales esenciales como el hierro), pero añadiéndola diariamente a las células en crecimiento (Tabla 6), es posible demostrar una débil acción antagónica en la seleno-cistationina también con este compuesto. Los D-isómeros de la cistina o cisteína son inefectivos en bloquear la toxicidad de la seleno-cistationina. Un conocimiento del lugar preciso de acción enzimática de la seleno-cistationina debe, sin embargo, aguardar otro tipo de estudios.

SUMMARY

Extracts of nuts of "coco de mono" (*Lecythis ollaria*) were tested for cytotoxic activity, in view of the hair-loss produced by its ingestion in several cases reported in the medical literature in Venezuela. Mammalian cells growing *in vitro* were used as the test system, adding a purified crystalline material from extracts of coco de mono, identified as seleno-cystathionine (cystaselenonine), or L-2-amino-4-(L-2-amino-2-car-

boxyethyl) selenylbutyric acid. Biological activity of this material was exactly equivalent to the aqueous extract used previously, in that the concentration necessary for 50% inhibition of growth was also 3-5 micrograms per ml.

The present studies would seem to indicate that the cytotoxic factor in water extracts of these nuts is entirely due to cystaselenonine. The toxic effects of both crude extracts of nuts as well as highly purified samples of crystalline seleno-cystathionine are equally reversed by the addition of L-cystine to the culture medium. Moreover, apparently all of the biological activity in crude water extracts of the nuts seems to be able to be quantitatively accounted for by the amino acid seleno-cystathionine.

Regarding the mechanism of action of seleno-cystathionine, it seems likely that the material interferes with the utilization of the sulfur-containing amino acid L-cysteine for protein synthesis. In our cells growing in vitro, this restriction in the amount of utilizable cysteine means that cell growth comes to a halt. However, the hair loss observed after ingestion of nuts of *Coco de mono* is probably not due to a cytotoxic effect of seleno-cystathionine on the hair follicle cell, so much as to an interference in the utilization of cysteine by the hair follicle cell in the formation of hair. It is well known, of course, that cysteine is present in high concentration in hair, and is of vital importance for the keratinization process.

BIBLIOGRAFIA

1. Flesch, P. Inhibition of Keratinizing Structures by Systemic Drugs. *Pharm. Rev.* 15: 653-671, 1963.
2. Eagle, H. y Foley, G. E. The Cytotoxic Action of Carcinolytic Agents in Tissue Culture. *Amer. J. Med.* 21: 739-749, 1956.
3. Eagle, H. y Foley, G. E. Cytotoxicity in Human Cell Cultures as a Primary Screen for the Detection of Anti-Tumor Agents. *Cancer Res.* 18: 1017-1025, 1958.
4. Earle, W. R. Production of Malignancy in Vitro. IV. The Mouse Fibroblast Cultures and Changes Seen in the Living Cells. *J. Nat. Cancer Inst.* 4: 165-212, 1943.
5. Sanford, K. K., Earle, W. R., y Likely, G. D. The Growth in Vitro of Single Isolated Tissue Cells. *J. Nat. Cancer Inst.* 9: 229-246, 1948.
6. Eagle, H. Nutrition Needs of Mammalian Cells in Tissue Culture. *Science* 122: 501-504, 1955.
7. Russell, P. B., Grant, N. H., Alburn, H. E., Clark, D. E. y Miller, J. A. Comunicación personal.
8. Aronow, L. Studies on Drug Resistance in Mammalian Cells. I Amethopterin Resistance in Mouse Fibroblasts. *J. Pharm. Exp. Therap.* 127: 116-121, 1959.
9. Tomizawa, S. y Aronow, L. Studies on Drug Resistance in Mammalian Cells. II. 6-Mercaptopurine Resistance in Mouse Fibroblasts. *J. Pharm. Exp. Therap.* 128: 107-114, 1960.
10. Horn, M. I. y Jones, D. B. Isolation from *Astragalus pectinatus* of a Crystalline Amino Acid Complex Containing Selenium and Sulfur. *J. Biol. Chem.* 139: 649660, 1941.
11. Virupaksha, T. K. y Shrift, A. Biosynthesis of seleno-cystathionine from selenate in *Stanleya pinnata*. *Biochem. Biophys. Acta* 74: 791-793, 1963.

12. Moxon, A. L. y Rhian, M. Selenium Poisoning. *Physiol. Rev.* 23: 305-337, 1943.
13. Painter, E. P. The Chemistry and Toxicity of Selenium Compounds, with Special Reference to the Selenium Problem. *Chemical Rev.* 28: 179-213, 1941.
14. Madison, T. C. Sanitary Report, Fort Randall, U. S. Congr. 36th Session, Senate Ex. Doe. 52: 37-41, 1860.
15. Weisberger, A. S. y Suhrland, L. G. Studies on analogs of l-cysteine and l-cystine. III The effect of selenium cystine on leukemia. *Blood* 11: 19-30, 1956.
16. Gross, P., Runne, E. y Wilson, J. W. Studies on the Effect of Thallium Poisoning of the Rat. The Influence of Cystine and Methionine on Alopecia and Survival Periods. *J. Invest. Dermat.* 10: 119-134, 1948.
17. Thyresson, N. The Influence of Dietary Factors, Especially Brewers Yeast, Cystine, and B. Vitaminins, on the Course of Chronic Thallium Poisoning in the Rat. *Acta Dermatovenereologica* 30: 9-26, 1950.

EPILOGO

SELENIOSIS EN VENEZUELA

Después de escrito e introducido nuestro trabajo, apareció una monografía de Rosenfeld y Beath, titulada "Selenium", que contribuye sustancialmente a darnos una imagen de conjunto del problema. También tuvimos oportunidad de obtener -gracias al Dr. Fabio Londoñomicrofilms del trabajo inédito de Servio Tulio Benavides R. y Francisco Silva Mojica, titulado: "Seleniosis. Ocurrencia de Selenio en Rocas, Suelos y Plantas. Intoxicación por Selenio en Animales y en Humanos. Revisión de la Literatura. El problema en Colombia". Posteriormente obtuvimos una copia de las "Noticias Historiales" de Fray Pedro Simón. Todo ello se enlaza perfectamente bien con los hallazgos de nuestros trabajos, y con el de los Dres. Jaffé, Chávez y Koifman sobre la toxicidad de muestras de ajonjolí con alto contenido de selenio.

No podíamos publicar pues nuestras observaciones, sin hacer un intento, de concatenación de los actuales conocimientos acerca del problema de la seleniosis en Venezuela, tal y como podemos apreciarlo, de acuerdo con la evidencia objetiva reunida.

En Venezuela existen en amplias zonas del país, árboles con un fruto leñoso en forma de olla, con un opérculo hacia el polo inferior, y semillas en su interior, conocidos con el nombre de "Coco de Mono", y pertenecientes desde el punto de vista botánico al género *Lecythis*.

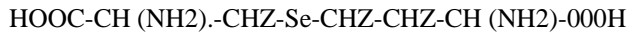
Es de conocimiento popular que la ingestión de las semillas de "coco de mono" produce caída del cabello. Esta creencia popular ha sido debidamente documentada en la literatura científica por los trabajos de M. Vegas, F. Vélez Boza y F. Kerdel-Vegas, quienes han descrito nueve casos de intoxicación por estas almendras, con caída subsecuente del cabello. Estos pacientes ingirieron las nueces en sitios bien determinados de los estados Guárico, Anzoátegui y Portuguesa.

Se han identificado por lo menos 45 especies de plantas pertenecientes a la familia de las Lecitidáceas, en la banda tropical del continente americano, en una extensa zona que va del Brasil a Costa Rica. En Venezuela se han identificado al menos 7 especies. Se ha podido determinar que la especie botánica responsable de uno de los casos de intoxicación y alopecia temporal, era la *Lecythis ollaria*.

A partir de semillas provenientes del árbol cuyas semillas resultaron tóxicas a uno de los casos relatados, se han llevado a cabo múltiples experimentos con el objeto de determinar : 1) la naturaleza y composición química del principio activo ; 2) el mecanismo de acción del mismo ; 3) su toxicología; 4) su efecto citotóxico.

Se ha podido establecer que el principio activo que determina la caída del pelo en humanos y en animales de laboratorio sometidos a la influencia de extractos de estas semillas, es un aminoácido selenífero,

hidrosoluble, termoestable, dializable, que se absorbe en la resina Dowex 50, cuya fórmula estructural es la siguiente:



Se trata de un análogo de la cistationina, donde el elemento selenio reemplaza al azufre.

El posible mecanismo de acción en lo que se refiere a la producción de alopecia está relacionado con el importante papel de la cistationina, que representa un paso intermedio de la transformación de metionina en 1-cistina. La cistina es un aminoácido indispensable en el mecanismo de la queratinización, ya que se ha establecido que sus enlaces disulfuro (S-S) permiten asociar entre sí cadenas de polipéptidos vecinos, que es lo que le da sus características propias a la queratina dura del pelo y de las uñas. Al ser reemplazado el azufre de la cistationina por el selenio, produciéndose la seleno-cistationina, posiblemente el nuevo aminoácido deja de tener las propiedades del original y esto afecta el proceso normal de la queratinización.

Se hicieron experimentos en animales de laboratorio con objeto de estudiar el efecto sobre los folículos pilosebáceos y observar otros fenómenos de toxicidad del aminoácido selenífero, pudiendo constatar el mismo efecto alopeciante e importantes alteraciones en el hígado, pulmones, bazo y suprarrenales.

En vista de que es bien conocido el efecto alopeciante de numerosas drogas con efecto citotóxico, actualmente usadas en el tratamiento de la leucemia y distintos tipos de cáncer, se pensó que era racional el estudio del efecto cito.óxico potencial del principio activo de la *Lecythis ollaria*. Esto se realizó de manera satisfactoria en cultivo de tejidos, concretamente se determinó la capacidad de inhibir in vitro el crecimiento de fibroblastos de ratón, pudiéndose constatar un fuerte efecto citotóxico.

Por otra parte, y al margen de nuestras investigaciones, los Dres. Jaffé, Chávez y Koifman del Instituto Nacional de Nutrición, habiendo observado problemas tóxicos en sus colonias de animales de experimentación, establecieron que se debía a un factor alimentario. Después de algunas pesquisas pudieron establecer que el problema radicaba en la torta de ajonjolí que constituye un elemento importante en la elaboración del concentrado con que se alimentan éstos y otros animales. Los análisis demostraron que había un elevado contenido de selenio en este concentrado alimentario.

Análisis recientes hechos a petición nuestra por una firma muy seria de Estados Unidos de América, la "Union Carbide Corporation Nuclear Division" en diferentes materiales enviados por nuestro grupo, revelan cifras altamente significativas:

1. Semillas secas y desgrasadas de
Lecythis ollaria.....2,23% de Se por peso
2. Semillas completas sin cáscara de
Lecythis ollaria.....0,58% de Se por peso
3. Alimento de ratas.....0,0035% de Se por peso

Desde que está bien establecido, que cualquier nivel de selenio por encima de 10 partes por millón, constituye un nivel tóxico, de una vez podemos asentar que estos hallazgos tienen una importancia que sobrepasa los límites del mero interés académico.

Una vez determinada la naturaleza del problema que confrontábamos, pudiendo centrarlo en el elemento selenio, se ha hecho necesaria una revisión de lo que hasta el presente sabemos sobre este elemento y los múltiples problemas a que da origen. Esta revisión ha sido hartamente compleja, pero afortunadamente en septiembre del presente año ha aparecido una monografía completa sobre el problema, con una revisión exhaustiva de la literatura científica hasta 1964.

Solamente vamos a mencionar algunos hechos que nos parece indispensable señalar para la mejor comprensión del problema.

Desde 1857, se describió en la literatura científica, una enfermedad del ganado denominada "enfermedad alcalina", que producía pérdida de los pelos largos de la cola y de la crin, y los cascos se hacían dolorosos, en tal forma, que les impedía moverse en busca de alimentos. Esta enfermedad del ganado es predominante en Dakota del Sur (Estados Unidos). Luego se describió la forma aguda de la misma intoxicación, denominada "ceguera tambaleante" ("blind staggers"), que señala dos de los síntomas comunes de la enfermedad, que termina produciendo parálisis y muerte de los animales. La causa de estas enfermedades no se relacionó con el selenio hasta el año de 1931.

Previamente, en Colombia, Fray Pedro Simón en 1560, había descrito enfermedades semejantes a la "enfermedad alcalina" en animales domésticos, malformaciones en pollos y en niños, y pérdida del cabello y de las uñas en personas, todo lo cual podemos relacionar con la intoxicación por el selenio, presente en el suelo de la zona de Colombia donde realizó sus importantes y acertadas observaciones. El Padre Simón decía que el maíz y otros vegetales crecían bien en ciertas regiones, pero quienquiera que los come -hombre o animal- se le cae el pelo. Las mujeres indias daban a luz niños monstruosos que eran abandonados por los padres. Los naturalistas asociaron esta enfermedad al suelo más bien que a determinadas especies de frutas, vegetales o cereales, por la simple y convincente razón, de que cuando crecían en otras áreas no poseían propiedades tóxicas. El fenómeno se registraba en zonas llamadas "peladero" y allí se observaban: pérdida del pelo y de los cascos del ganado, malformaciones de los labios y patas, gran número de animales abortaban, los huevos no eran fértiles en un porcentaje apreciable, e incluso pérdida del pelo y uñas en seres humanos. Sólo en 1936 pudo determinarse la causa real de estos fenómenos, observados por siglos en Colombia, y atribuirlos al selenio. En 1955 se informó que en un determinado distrito del país hermano, se cultivaba maíz tóxico y que había arroyos sin vida animal; los hombres y animales que bebían esas aguas contaminadas presentaban caída del pelo; los pequeños mamíferos se volvían estériles, y los caballos sufrían alteraciones de los cascos.

En México se describió una enfermedad en las vecindades de Irapuato hace más de 200 años, caracterizada por caída del pelo y de los dientes y una forma peculiar de parálisis, todo ello atribuible a una seleniosis crónica.

EL PROBLEMA

Es evidente de lo expuesto. que existe un problema de seleniosis potencial en Venezuela que afectaría no solamente a los cultivos, sino también a los animales y seres humanos. Del estudio de los casos de intoxicación humana, y de la distribución de las plantas de *Lecythis* en el país, es factible presumir que amplias zonas del país tienen tierras seleníferas. Se puede pensar que por lo menos los llanos, en toda su amplia extensión, presentan zonas con suelos ricos en selenio.

No todas las plantas son capaces de absorber y utilizar el selenio inorgánico que se encuentra en el suelo, concentrarlo, sintetizar aminoácidos que lo contengan y convertirse en agentes potencialmente tóxicos. Es evidente que en nuestro medio el "coco de mono" (diversas especies de *Lecythis*) y el ajonjolí realizan esta absorción, concentración y síntesis. Es muy probable que el maíz también lo haga, de acuerdo con la evidencia reunida en Colombia. En los Estados Unidos de América se han descrito cuatro grupos de plantas denominadas "plantas indicadoras de selenio", debido a que su crecimiento está restringido a áreas seleníferas ; hasta este momento se incluyen : 1) 24 especies y variedades de *Astragalus*; 2) *Xylorhiza de Machaeranthera*; 3) *Oónopsis de Haplopappus*; y 4) *Stanleya*. Todas estas especies exigen la presencia de selenio para su crecimiento y desarrollo. Es posible que en nuestro medio existan plantas con similares características.

Con los nuevos desarrollos agropecuarios de extensas zonas con tierras presumiblemente seleníferas, como son las tierras del estado Portuguesa, actualmente en franco proceso de expansión agrícola, es posible que comiencen a cultivarse plantas capaces de acumular selenio (ajonjolí, maíz, etc.), lo que va a originar -si es que ya no lo está haciendo- importantes problemas económicos (enfermedad y muerte de los animales alimentados con concentrados tóxicos), y lo que es aún más grave, problemas de salud pública, por la intoxicación crónica por el selenio de personas que ingieran estos cereales, vegetales, frutas, o bien indirectamente a través de carnes, leche o huevos contaminados.

RECOMENDACIONES

Se impone de inmediato un estudio concienzudo del problema, que permita determinar sus verdaderas proporciones y los peligros potenciales y maneras de evitarlos. Para ello es necesario analizar en forma sistemática y organizada muestras de suelos de diferentes zonas del país, comenzando por aquellas donde se tiene evidencia circunstancial de que hay contaminación por el selenio. Al mismo tiempo se deben hacer análisis de diferentes cultivos y pastos de las zonas sospechosas, estableciendo su exacto contenido en selenio. La determinación por parte de los investigadores encargados del proyecto de niveles tóxicos en selenio en determinados productos agrícolas, debe conducir a un cambio de cultivos en el área estudiada. La ingerencia del Ministerio de Agricultura y Cría y su responsabilidad en el problema es pues directa y permanente.

Para los efectos de llevar a cabo el proyecto esbozado, recomendamos que el Ministerio de Agricultura y Cría, de común acuerdo, y mediante un proyecto cooperativo con el Ministerio de Sanidad y Asisten-

cia Social, cree una Comisión para el Estudio de la Seleniosis, que por tratarse de una materia compleja y multidisciplinaria debería estar integrada por especialistas o técnicos en geología, geobotánica, bioquímica, toxicología, salud pública y nutrición.

Creemos también que al lado de las entidades y organismos oficiales, en esta Comisión se debe dar cabida a representantes calificados de la iniciativa privada, que en forma directa están afectados por el problema, como es concretamente el caso de los productores de concentrados alimentarios para animales.

Desde que el descubrimiento inicial del problema se originó en los laboratorios de investigación dermatológica del Servicio de Dermatología del Hospital Vargas, y allí se cuenta con personal idóneo y equipo adecuado para llevar a cabo estas investigaciones propuestas, podría centralizarse este estudio en estas dependencias universitarias, y desde allí planificar adecuadamente las diferentes fases del estudio.

BIBLIOGRAFIA ADICIONAL

1. Rosenfeld, I. y Beath, O. A.: Selenium. Geobotany, Biochemistry, Toxicity, and Nutrition. Academic Press, New York, 1964.
2. Benavides, S. T. y Silva Mojica, F.: Seleniosis. Ocurrencia de Selenio en Rocas, Suelos y Plantas. Intoxicación por Selenio en Animales y en Humanos. Revisión de la Literatura. El Problema en Colombia. Publicación IT-3, Instituto Geográfico de Colombia "Agustín Codazzi", Departamento Agrológico, 1959.
3. Simón, Fray Pedro: Noticias Historiales de las Conquistas de Tierra Firme en las Indias Occidentales. Biblioteca de Autores Colombianos, Tomo IV. Editorial Kelly, Bogotá, 1953.
4. Jaffé, W. G., Chávez, J. F. y Koifman, B. de: Estudios preliminares sobre la toxicidad de muestras de ajonjolí con alto contenido de selenio. Archivos Venezolanos de Nutrición, Vol. XIV, N° 1, pp. 7-23, 1964.
5. Russell, P. B.: Comunicación personal.