

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



**Estudio de la dependencia de ácidos grasos
esenciales en células de Sarcoma 180 ascítico
mediante el análisis de parámetros
biológicos y bioquímicos**



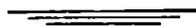
TESIS
ROBERTO JUSTO DE ANTUENO
1980

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



**Estudio de la dependencia de ácidos grasos
esenciales en células de Sarcoma 180 ascítico
mediante el análisis de parámetros
biológicos y bioquímicos**



T E S I S
ROBERTO JUSTO DE ANTUENO
1980

Director de Tesis:

Doctor Osvaldo F.MERÇURI

El presente trabajo de Tesis fue
realizado en la Cátedra de Bioquímica
del Instituto de Fisiología de la
Facultad de Ciencias Médicas de la
Universidad Nacional de La Plata.

Maria

A mi esposa

A mis padres

Mi reconocimiento:

A la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, a la cátedra de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Médicas, a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, a la Secretaría de Ciencia y Técnica, por haber brindado los medios para la realización de este trabajo.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, por las becas que me otorgara oportunamente.

Mi agradecimiento:

- A mis padrinos de Tesis, la Doctora María Elena De Tomás y al Doctor Osvaldo F. Mercuri, por su constante estímulo, por su guía, por su apoyo humano, por su tolerancia y comprensión, por su consejo amistoso.
- Al personal de la Cátedra de Bioquímica del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, que desde distintos ángulos me han brindado su colaboración.
- A la Doctora D.Pascualini de la Academia Nacional de Medicina por haberme facilitado el Sarcoma 180 ascítico
- A la Licenciada C.Apella por la realización de los espectros de infrarrojo en la Cátedra de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata
- A la Sra. C.Serres, a los esposos Gallardo, a todos los colegas y amigos del Laboratorio del 4to.piso del Instituto de Fisiología que han contribuido con su apoyo y colaboración para la realización de este trabajo.
- Al Departamento de Tecnología Educativa de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata por los dibujos y fotografías de esta Tesis
- Al personal de Biblioteca de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, por su disposición y cordialidad brindada en todo momento
- A la Sra. María S.C. de Salvans por su desinteresada colaboración para dactilografiar esta Tesis.

Abreviaturas

Å = Angstrom (10^{-10} m)

ACP = (acyl carrier protein), proteína portadora de acilos

A.G.E. = ácidos grasos esenciales

AMP = ϵ' adenosina monofosfato

CoA = Coenzima A

C.G.L. = cromatografía gas-líquido

Elong. = sistema enzimático de elongación

FAD = flavina adenina dinucleotido

g = aceleración de la gravedad

h = hora

KM = constante de Michaelis - Menten

Mal.CoA = malonil-coenzima A

mg = 10^{-3} gramo

min = minuto

ml = 10^{-3} litro

NADH = nicotinamida adenina dinucleotido reducida

NADPH = nicotinamida adenina dinucleotido fosfato reducido

mm = 10^{-9} moles

PM = peso molecular

T.L.C. = (thin layer chromatography) cromatografía en capa delgada

V/V/V = Volumen en volumen en volumen

μ Ci = 10^{-6} Curie

μ g = 10^{-6} gramo

μ l = 10^{-6} litro

μ M = 10^{-6} molar

μ mol = 10^{-6} mol

NOMENCLATURA DE ACIDOS GRASOS EMPLEADOS EN ESTA TESIS

a) Nomenclatura trivial: ej: ácido linoleico

b) Nomenclatura abreviada: ej: 18 : 2 ω^6

El primer número indica la cantidad de átomos de carbono que posee la molécula; el que está a continuación de los dos puntos, el número de dobles ligaduras; el que está ubicado después de ω , indica el número de átomos de carbono desde la última doble ligadura hasta el metilo terminal inclusive.

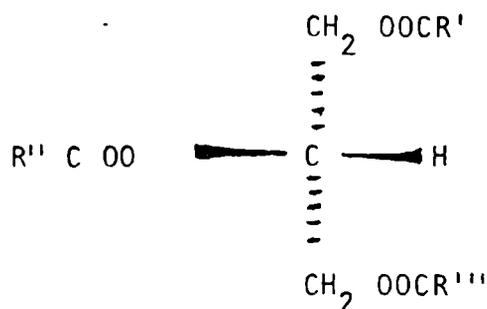
c) Nomenclatura sistemática

Ej ácido $\Delta^{9,12}$ octadecadienoico, donde $\Delta^{9,12}$ indica la posición de un doble enlace entre los carbonos 9 y 10 y otro entre los carbonos 12 y 13 también se ha utilizado en forma abreviada $\Delta^{9,12}$ 18 : 2 .

NOMENCLATURA DE GLICERIDOS

Sistema de numeración esteroespecífico (sn)

En la proyección de Fisher el grupo hidroxilo secundario es dibujado a la izquierda del C-2; el átomo de carbono arriba de éste recibe el número 1 (C-1) y el que está debajo C - 3.



1, 2, 3 - triacil - sn - glicerol

NOMENCLATURA DE ENZIMAS

Δ^n desaturasa : n indica que la enzima cataliza la apertura de un doble enlace entre los carbonos n y (n+ 1)

INDICE

	Página
Reconocimientos	-iii-
Agradecimientos	-iv-
Abreviaturas	-v-
Nomenclatura	
- De ácidos grasos	-vi-
- De glicéridos	-vi-
- De enzimas	-vii-
INTRODUCCION	
I.- Síntesis de ácidos grasos no saturados	2
a) Sistema de Δ^9 acil-CoA desaturasa: síntesis de ácidos monoetilénicos	3
b) Sistema de Δ^6 acil-CoA desaturasa: síntesis de ácidos polietilénicos	4
c) Sistema de Δ^5 acil-CoA desaturasa	5
d) Elongación	7
II.- Acidos Grasos Esenciales	8
III.- Deficiencia de ácidos grasos esenciales	13
IV.- Acidos grasos esenciales y células tumorales	16
V.- Objetivos del trabajo	17
MATERIAL Y METODOS	
Acidos grasos, alcoholes, aldehídos	19
Material para cromatografía	20
Solventes	20

	Página
Material para líquido de centelleo	21
Drogas	21
Gases	21
Material para dietas	21
Animales	22
a) Mantenimiento	22
b) Dietas	22
Células de Sarcoma-180	23
Determinación del tiempo de duplicación celular	26
Extracción de los lípidos	26
Cromatografía en columna	27
Cromatografía en capa delgada	27
Cromatografía gas-líquido	29
Determinación de la radioactividad	31
Hidrogenólisis de eter-lípidos	35
Análisis por espectroscopía de infrarrojo de los ester-lípidos	36
Identificación de los isómeros de los ácidos grasos monoetilénicos, método de ozonólisis reductiva	37
Estudio "in vitro" de la desaturación e incorporación de ácidos grasos radioactivos en células enteras de Sarcoma-180	38
Descripción del esquema de trabajo experimental	40
PRESENTACION Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS	
a) Composición de ácidos grasos en las dietas empleadas	44
b) Composición de ácidos grasos de lípidos totales de hígado de ratones huéspedes	46
c) Composición de los ácidos grasos de lípidos de células de Sarcoma-180	50
d) Presencia de ácido cis-vaccénico en la fracción de ácidos octadecenoicos	57
e) Determinación de la desaturación de los ácidos palmítico, esteárico y linoléico en células ascíticas de Sarcoma-180.	62
f) Incorporación del ácido linoléico C ¹⁴ en fosfolípidos y lípidos neutros de células ascíticas de Sarcoma-180	68

	Página
g) Incorporación del ácido linoléico C ¹⁴ en tri- glicéridos y eter-Lípidos	72
h) Incorporación de linoléico C ¹⁴ en eter-glicéridos de células de Sarcoma-180 empleando distintos <u>tiem</u> pos de incubación	77
i) Determinación del Tiempo de duplicación celular en células ascíticas de Sarcoma-180 mantenidas en ra- tones deficientes en A.G.E.	83
CONCLUSIONES	86
BIBLIOGRAFIA	90

INTRODUCCION

El enfoque de la Biología, la Medicina y específicamente la Patología ha permitido asignar a los lípidos roles metabólicos y estructurales tan importantes como insospechados.

Día a día, merced al aporte de investigadores de -- distintas disciplinas, éstos roles o funciones se amplían y se hacen -- más específicos, lo que conduce a un mejor entendimiento de los procesos metabólicos y constituye una ayuda inestimable para el conocimiento de la influencia de las estructuras lipoproteicas sobre los estados normales y patológicos celulares.

Los lípidos por sus características fisicoquímicas - presentan una gran ubicuidad en los organismos y particularmente en la célula. Si se toma como centro de análisis a ésta última, el estudio de los lípidos conduce inmediatamente al compartimiento subcelular que juega un papel fundamental en la síntesis de los mismos: el retículo endoplásmico. Es importante detenerse en él pues las estructuras de membranas que lo constituyen y que forman túbulos, cisternas y canales a lo largo del citoplasma, presentan una composición lipo-proteica con funciones estructurales y enzimáticas. Son precisamente esas enzimas las encargadas de la biosíntesis de los lípidos, ácidos grasos insaturados, prostaglandinas, esteroides, glicoproteínas y otras moléculas (1.-)

En el año 1941 Claude utilizando métodos de ultracentrifugación fraccionada aisló partículas de 100 y 1500 Å de diámetro a las que llamó microsomas. Estos correspondían a los fragmentos de las vesículas, túbulos y membranas del retículo endoplásmico (2 - 7-). Este fraccionamiento permitió el estudio "in vitro" de muchos procesos bioquímicos, abriendo así nuevos campos en la investigación de los mecanismos enzimáticos.

Los microsomas, recibirán a los ácidos grasos para sintetizar lípidos más complejos. Estos ácidos grasos tendrán un origen exógeno a la célula, o bien ser producto de una síntesis de "novo" por la acción del complejo enzimático citoplasmático: ácido graso sintetasa (8.-). En este último se reconocen siete estructuras proteicas diferentes, que se encuentran estrechamente unidas en hepatocitos de paloma (9)

o disociables, en bacterias tales como el *Clostridium Kluy-verii* y la *Escherichia coli* (10.-).

Lynen (11), Vagelos y col. (12.-) describen que una de esas proteínas (ACP) es capaz de llevar unido a un grupo -sulfhidrilo único de su estructura, el grupo ácido que se irá formando mediante la acción enzimática de las restantes proteínas. Se puede decir que existe una proteína portadora de grupos acilos, y enzimas -condensantes, reductasas, deshidratasa y transacilasas que tomarán mo léculas primordiales como el acetil CoA y malonil CoA para llegar a * conformar a través de varios ciclos de síntesis, un ácido graso de ca dena hidrocarbonada larga. La cadena podrá alargarse aún más mediante un mecanismo de elongación a nivel mito condrial merced a la incorporación de acetil CoA (13 - 14) o bien a nivel de los microsomas vía -malonil CoA (15 - 16).

Como se indicara anteriormente los ácidos grasos saturados exógenos o de síntesis "de novo" endógena se desti-- nan en los microsomas no sólo para la síntesis de lípidos sino también para la desaturación de su cadena hidrocarbonada, es decir, generar - en ella dobles enlaces. Estos ácidos no saturados podrán estructurar a posteriori, lípidos complejos.

Como primera etapa para cualquiera de los procesos enzimáticos mencionados se requiere que los ácidos grasos se encuentren activados bajo la forma de Acyl - CoA. La reacción se realiza por acción de la Acil - CoA sintetasa (ácido: CoA ligasa (AMP) - EC. 6.2.3.) microsomal (1).

1.- SINTESIS DE ACIDOS GRASOS NO SATURADOS

En los mecanismos de β - oxidación de los ácidos grasos se detectan etapas de síntesis de ácidos α - β no saturados, de existencia efímera y que rápidamente se hidratan para degrara darse en última instancia a acetil - CoA (17.-).

La apertura de estos dobles enlaces se lleva a cabo por acción de deshidrogenasas mitocondriales ligadas al FAD (18.-).

Entre 1937 y 1940 Schoenheimer, Rittenberg y colaboradores hallaron que las células animales eran capaces de formar ácidos grasos insaturados a partir de precursores saturados (19 -20.-). Años después los trabajos de Bernhand (21.-) demuestran que el ácido esteárico (18:0) podía ser desaturado aeróbicamente a ácido oléico (18:1) por un sobrenadante celular libre de mitocondrias. Estos resultados, -- junto a los de Stoffel (22.-) con sus estudios en microsomas de hígado y los trabajos de Nugteren y colaboradores (23.-) Holloway y col. (24.-) y Brenner y col. (25.-) que analizan el comportamiento de distintos ácidos grasos frente a la acción desaturante microsomal, permiten afirmar que las principales etapas de biosíntesis de ácidos grasos insaturados se producen en el retículo endoplásmico por un mecanismo aeróbico. Se - dejaban de lado procesos anaeróbicos, hallados en bacterias (26.-).

La capacidad de desaturación de ácidos grasos saturados y no saturados ha sido observada tanto en organismos inferiores (27.-) como en rata intacta (28.-) pulmón perfundido (29.-) y -- preparaciones microsomales de varios tejidos animales y humanos, tales como el hígado (30 - 33), pulmón (34), tejido adiposo (35.-36.-), glándulas mamarias en lactancia (37.-38.-) e incluso en células tumorales (39.- 42.-).

I.A) SISTEMA DE Δ^9 ACIL CoA DESATURASA: SINTESIS DE ACIDOS MONOETILENICOS

La Δ^9 desaturasa (EC 1.14.99.5) de mamíferos cataliza la conversión del acil CoA saturado en acil CoA monoinsaturado. Está ligado al retículo endoplásmico y tiene un requerimiento obligatorio por NADH, Oxígeno molecular, citocromo b_5 y NADH - citocromo b_5 reductasa (EC 1.6.2.2.) (43 - 45). En distintos laboratorios se ha demonstrado que además se requieren proteínas citoplasmáticas para lograr una - actividad máxima en preparaciones crudas de Δ^9 desaturadas (46 - 48).

Jeffcoat y col. (49.-) dan un esquema de los integrantes de la desaturación del ácido esteárico (18:0) ubicando a -- los mismos en la membrana microsomal de acuerdo a lo representado en la Fig.1.-

En microsomas de hígado de rata Spalt, Strittmater y col. han logrado purificar la Δ^9 desaturasa demostrando que se trata de un peptido simple de 53.000 Dalton con un 62% de aminoácidos -- no polares y un átomo de hierro no hemínico (50.-).

Mediante el estudio de diferentes organismos y sustratos se ha podido determinar que al menos existen dos desatura-- sas: una es más específica para los estearil - CoA (18:0) palmitoil CoA (16:0) que los convierte en oleil - CoA (18: 1 ω^9) y palmitoleil CoA (16: 1 ω^7) respectivamente, mientras que otra convertiría acil - CoA - de cadena más corta como el miristoil - CoA a miristoleil - CoA, dodeca-- noil - CoA a dodeca - 9 - enoil CoA y otros (51).

Los valores de Km para el ácido esteárico y palmítico son similares. Para el primero se determinó un Km = 4,5 μM y para el segundo Km = 4.7 μM . El ácido oleico actuaría como inhibi-- dor competitivo con un Ki = 5 μM (52.-).

Desde un punto de vista de la significación fisiológica el mejor sustrato para la Δ^9 desaturasa correspondería al estearil CoA. Esto es consistente con las observaciones de composición de ácidos grasos en hígado de rata, en el que se detectan al ácido oléi-- co como mayor constituyente de los ácidos monoetilénicos (53.-).

La estearil - CoA desaturasa ha sido detec-- tada en animales, vegetales y en microsomas de hígado humano (33.-).

Es una enzima que se ve modificada en su ac-- tividad por la composición de la dieta (54.- 57.-) y por estados pata-- lógicos tal como en la diabetes (58.- 59.-) y cáncer (41.- 42.-).

I.B. SISTEMA DE Δ^6 ACIL CoA DESATURASA: SINTESIS DE ACIDOS POLIETILENICOS

Otra enzima importante dentro de los mecanismos de desaturación de ácidos grasos, es la Δ^6 desaturasa cuya actividad se ha demostrado no solo en tejido de mamíferos (24, 57, 60, 61) sino también en animales de sangre fría (62).

Esta enzima integra un sistema microsomal de cadena transportadora de electrones, similar al utilizado por la Δ^9 desaturasa (Fig. 1) (60, 63).

La Δ^6 desaturasa utiliza como sustratos a los ácidos hexa y octadecenoicos con doble ligadura en posición 9 (24) abriendo un nuevo doble enlace entre los carbonos 6 y 7 con respecto al grupo carboxilo. Esta enzima demuestra una actividad manifiesta frente a los ácidos $\Delta^{9,12}$ octadecenoico (linoléico) y $\Delta^{9,12,15}$ octadecatrienoicos (α -linolénico) transformándolos en ácidos $\Delta^{6,9,12}$ octadecatrienoicos (γ -linolénico) y $\Delta^{6,9,12,15}$ octadecatetraenoico respectivamente (23, 64).

Esta enzima es clave y reguladora para la síntesis de ácidos grasos polietilénicos los cuales son componentes fundamentales para el mantenimiento de la estructura normal de membranas celulares (65). Su actividad se ve incluida por factores nutricionales, fundamentalmente por la carencia proteica en las dietas (66, 68) y hormonales como la epinefrina (69), el glucagón (70) e insulina (71, 74).

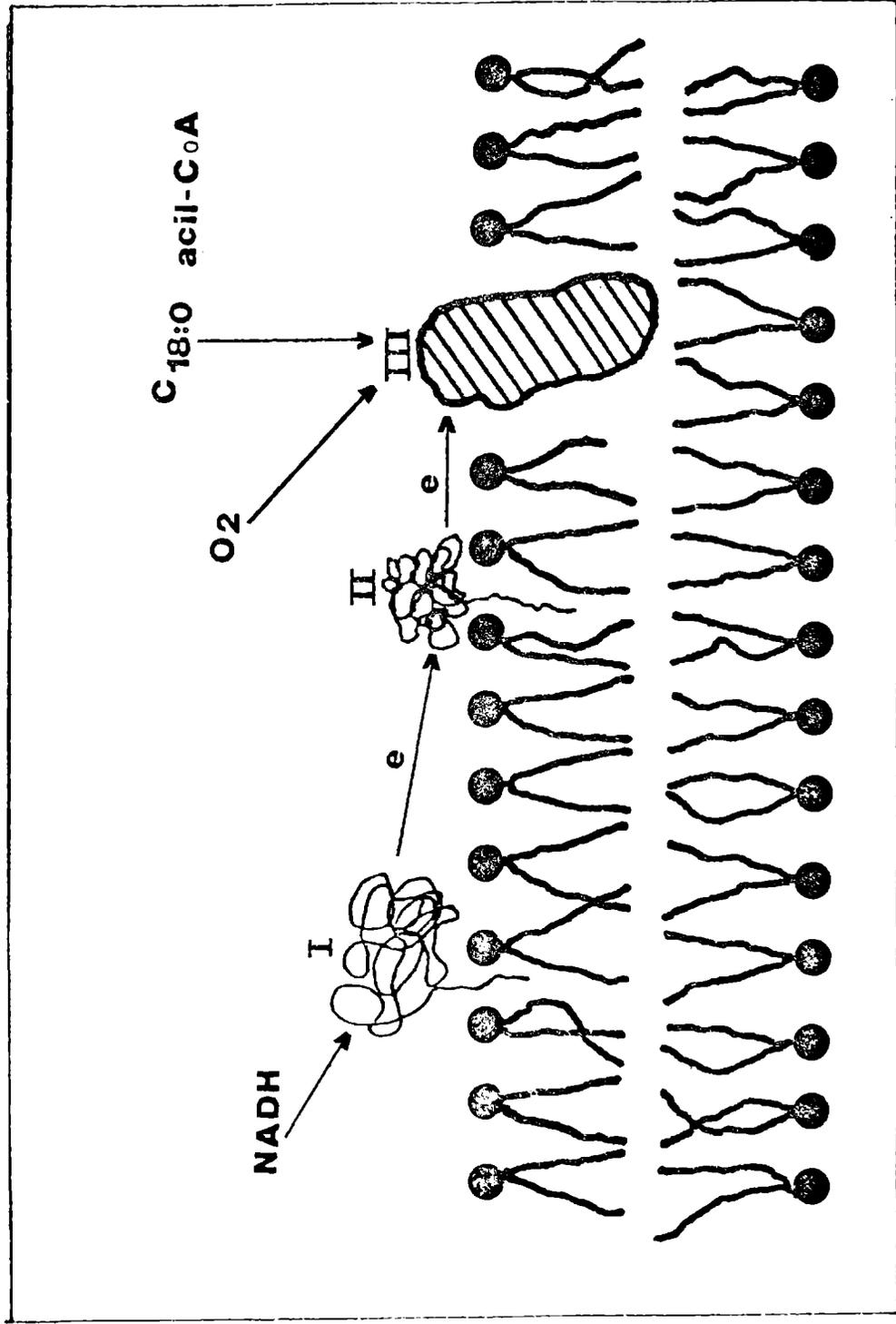
Estudios realizados en ratas demostraron que la Δ^6 desaturasa disminuye su actividad al avanzar la edad del animal (75).

I.C. SISTEMA Δ^5 ACIL CoA DESATURASA

La Δ^5 acil CoA desaturasa es un sistema microsomal (76, 78) desaturante, que a pesar de ser el menos estudiado de los mismos juega un rol biológico muy importante ya que por medio de su acción se sintetizan ácidos claves, no sólo para la formación de estructuras sino también como precursores de metabolitos biológicamente activos

Figura 1--.

Representación esquemática del sistema de la estearil - Co A desaturasa en la bicapa fosfolípida del retículo endoplásmico.



NADH - citocromo b_5 reductasa (I) y citocromo b_5 (II) transfieren electrones (e) desde el NADH a la estearil - CoA desaturasa (III)

como son las prostaglandinas y derivados.

Se considera que la enzima necesita de un sistema de transporte de electrones similar a los descritos para Δ^9 y Δ^6 desaturasas (60, 63, 79, 81).

Los sustratos normales para esta enzima -- son los ácidos eicosa - 8,11 - dienoico (20:2 ω^9), eicosa - 8,11,14 trienoico (20:3 ω^6) o eicosa - 8,11,14,17 tetraenoico (20:4 ω^3) (1).

I.D. ELONGACION

Junto a los sistemas desaturantes descritos anteriormente en los párrafos I.A., I.B. y I.C. existen a nivel - microsomal sistemas enzimáticos elongadores (15) que mediante el empleo de la malonil CoA (82) agregan en cada una de las etapas, en las cuales intervienen dos carbonos, a las cadenas de los ácidos grasos - que han sido desaturados previamente. Como resultado final de estos - procesos de desaturación - elongación, se obtienen los ácidos grasos polietilénicos.

No solamente el sistema elongante microsomal utiliza como sustrato los ácidos no saturados sino también puede elongar los ácidos saturados tales como el palmítico (16:0) que puede ser convertido a ácido esteárico (18:0), reacción que se ve influenciada por la lecitina (83).

La elongación microsomal de los ácidos grasos se realiza a través de intermediarios ácidos β - ceto, β - hidroxilados, y α - β enoicos (15).

Mohrhaurer H. y col. (84) demostraron que los ácidos grasos saturados y no saturados compiten en las reacciones de elongación.

R. Brenner en su revisión publicada en DRUG Metabolism Review del año 1977 resume en un esquema, todas las etapas

de desaturación y elongación microsomal que conducen a los ácidos poliinsaturados. Esos ácidos están agrupados en familias ω^9 , ω^6 , ω^3 , que se originan en el ácido esteárico, linoleico y α -linolénico respectivamente (1). Por su parte MEAD (85) y H. SPRECHER (86) dan los pasos de desaturación - elongación de la denominada familia ω^7 .

El término ω se refiere a la posición del doble enlace tomando como referencia el metilo terminal.

La secuencia de los pasos metabólicos de desaturación y elongación está graficado en las figuras 2,3,4 y 5.

Lo expuesto hasta el momento permite efectuar un análisis fisiológico de las familias de los ácidos grasos anteriormente descritos. El mismo nos permite clasificarlos en dos grandes grupos que son las familias capaces de ser sintetizadas totalmente por las células de mamíferos y que comprende a las familia de los ácidos palmítico y esteárico. El otro grupo presenta como precursores a los ácidos grasos que no son sintetizados "de novo" por la célula de mamífero, por lo cual deben ser aportados con la dieta. Estas familias son las de los ácidos linoleico y linolénico, es decir ω^6 y ω^3 respectivamente.

II.- ACIDOS GRASOS ESENCIALES

En el transcurso de las investigaciones bioquímicas existen descubrimientos que marcan etapas bien definidas en el conocimiento y desarrollo del metabolismo celular y que han llevado a profundizar las causas de ciertas alteraciones patológicas.

Este es el caso de los trabajos realizados por George y Mildred Burr (87, 88) los cuales publicaron entre los años 1929 - 1930 los resultados de sus investigaciones acerca de la importancia de la ingesta de ciertos ácidos grasos para el normal desarrollo de los animales de experimentación.

Figura 2 -

Familia de Acidos Grasos ω^7

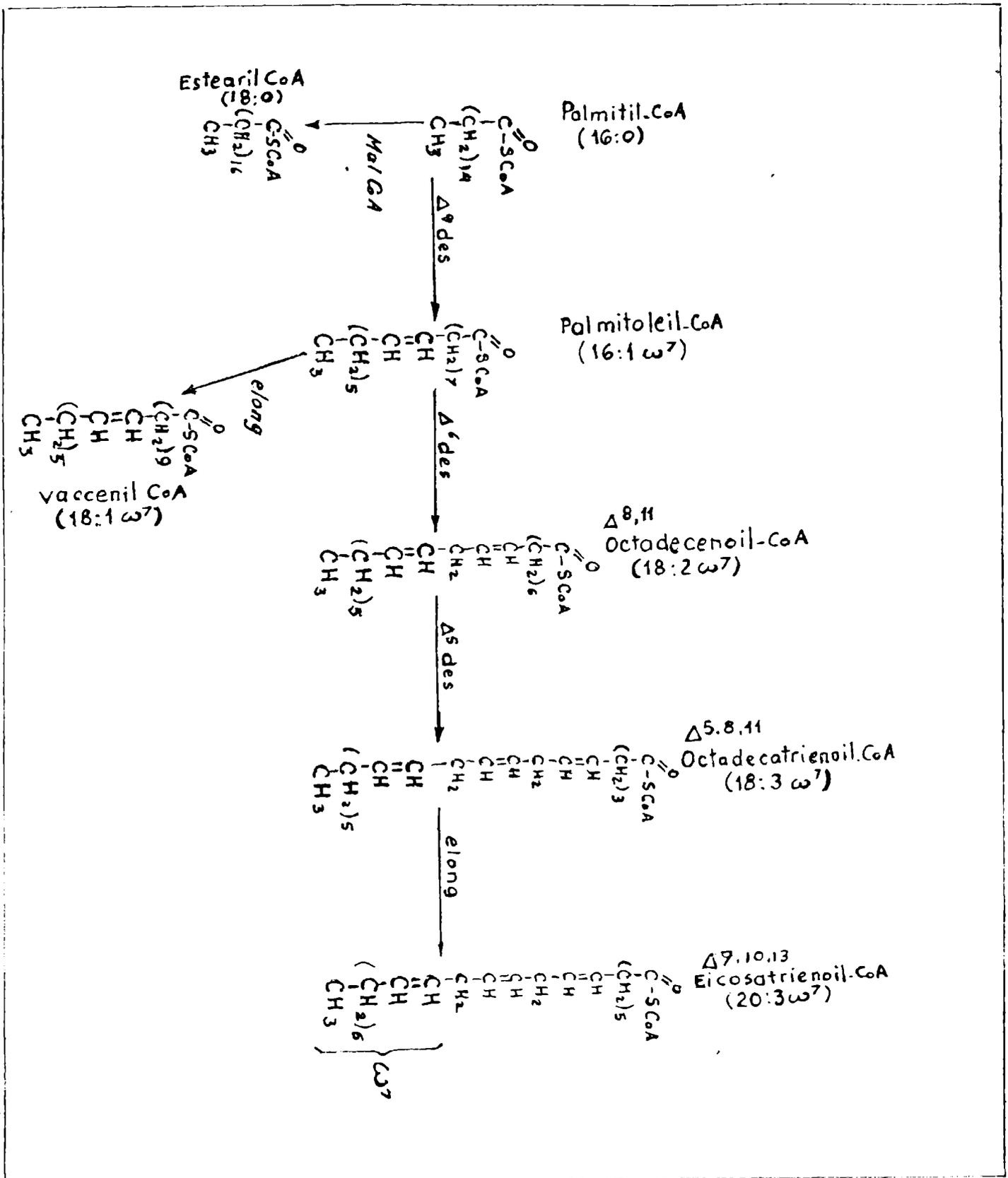


Figura 3.

Familia de Acidos Grasos ω^9

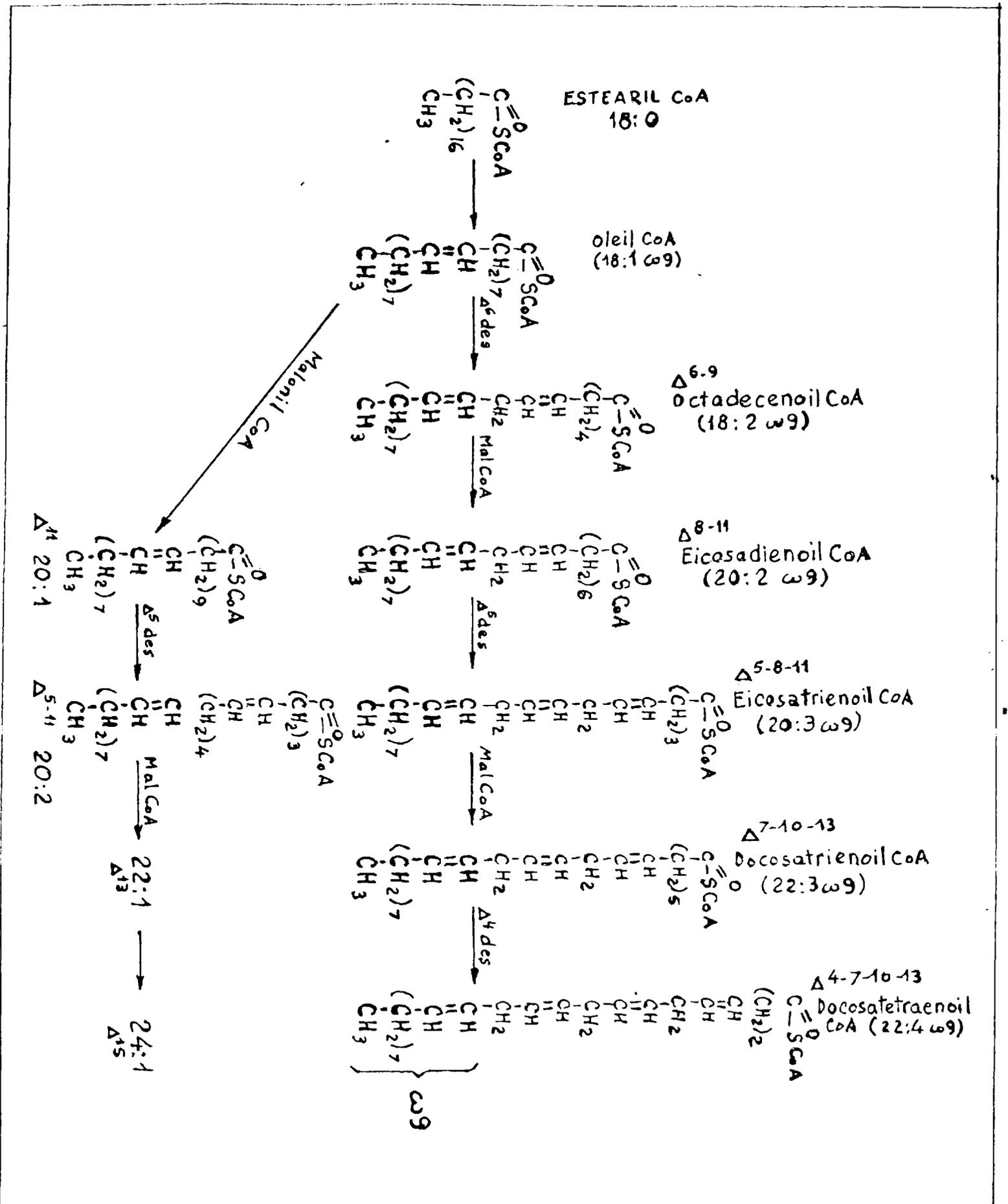
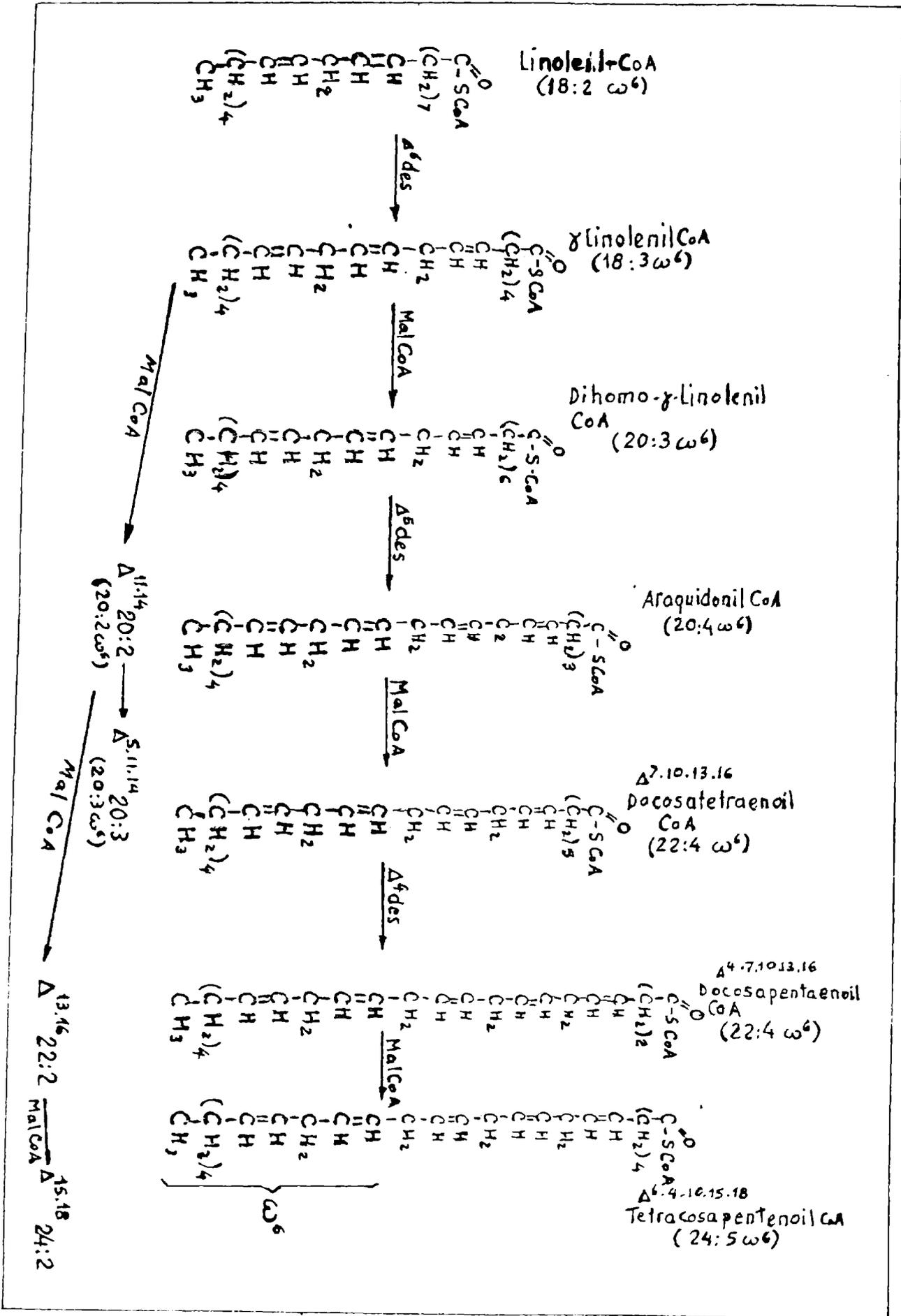


Figura 4.-

Familia de Acidos Grasos ω 6



Trabajos posteriores establecieron que los ácidos polietilénicos con una estructura de 6 - 9 - di - cis decadienilo es requerida para el mantenimiento de condiciones normales de crecimiento y reproducción (89). Esta estructura aparece en los ácidos - linoléico (18:2 ω^6), linolénico (18:3 ω^3) y araquidónico (20:4 ω^6). Los dos primeros ácidos grasos no son sintetizados en el organismo animal y deben ser aportados en forma exógena a través de la dieta, - por este hecho se los denomina Acidos Grasos Esenciales (A.G.E.). El ácido araquidónico es considerado un importante ácido graso. Por su estructura polietilénica es fundamental componente de membranas y precursor de prostaglandina (PGE_2) (90), tromboxano (TXA_2) y prostaciclina (PGI_2) (91). Se lo ubica dentro de los ácidos grasos esenciales a pesar de contar las células con los sistemas enzimáticos capaces de sintetizarlo, puesto que para su síntesis se requiere el aporte de su precursor exógeno que es el ácido linoléico. Este último sería entonces un ácido graso esencial solamente por ser precursor del mencionado ácido araquidónico (92).

Los requerimientos de ácidos grasos esenciales ha sido demostrado no solamente en el hombre sino también en el perro, cobayo, ratón, conejo y algunas otras especies.

Todos los ácidos polietilénicos son metabolizados rápidamente. Sin embargo, los ácidos grasos polietilénicos no esenciales son metabolizados más rápidamente que los polietilénicos esenciales puesto que el animal trata de conservarlos. Tal es el ejemplo citado por Collins (93) que demuestra que los fosfolípidos que contienen ácido araquidónico en sus moléculas presentan una velocidad de recambio menor.

III. DEFICIENCIA DE ACIDOS GRASOS ESENCIALES

Los requerimientos nutricionales de los organismos animales por los ácidos grasos esenciales han sido reconocidos

a través de las investigaciones realizadas por Burr (87, 88) las cuales demostraban que ratas mantenidas con dietas libres de grasas representaban una serie de síntomas como retardo del crecimiento e infertilidad. Trabajos posteriores indicaron que los síntomas de deficiencia en ácidos grasos esenciales son tan variados como diversos, ellos van desde - síntomas externos caracterizados por la caída del pelo (94), el incremento de la permeabilidad y la formación de escaras en la piel a otros síntomas menos visibles pero extremadamente importantes, como son los - cambios en la reproducción, en el metabolismo de los lípidos, en la estructura de las mitocondrias (95) y en la actividad de enzimas. Muchas otras anomalías morfológicas y fisiológicas son inducidas por la deficiencia de ácidos grasos esenciales según lo puntualizara Holman (96).

La hiperplasia de la epidermis observada en animales deficientes puede provenir o bien de una actividad mitótica incrementada o de una disminución de la diferenciación de la epidermis y una pérdida de células. Menton (97) sugirió que la actividad mitótica aumentada en células de la epidermis podría deberse a una tentativa del animal para adaptarse a la deficiencia en ácidos grasos esenciales reduciendo la pérdida de agua por la piel.

Es necesario recalcar la importancia de los ácidos esenciales en la división normal de las células puesto que se han observado cambios en los índices mitóticos en las vellosidades del yeyuno de ratones sometidos a una dieta deficiente en ácidos grasos esenciales (98, 99).

Aunque las necesidades del hombre adulto por los ácidos grasos esenciales no han sido bien establecidos hasta el presente, se ha demostrado que en niños existe un requerimiento mínimo de ácidos grasos esenciales del orden del 1% de las calorías de la dieta (100, 101).. En una reunión realizada por la OMS/FAO llevada a cabo en Roma en 1977 sobre las grasas en la dieta humana, se acordó establecer el requerimiento humano de AGE al nivel del 3% de las calorías de la dieta a fin de asegurar el crecimiento normal del niño.

Todos estos síntomas de deficiencia están acompañados por alteraciones bioquímicas tales como un consumo incrementado de oxígeno, una oxidación acelerada de intermediarios del ciclo de Krebs (102), una actividad aumentada de la succínico - deshidrogenasa (103), modificaciones en las actividades de adenil y guanil ciclasa de plaqueta (104, 105), transporte de aminoácido (106), etc.

Respecto a las alteraciones observadas en el metabolismo de los lípidos es importante tener en cuenta las modificaciones que se producen en la composición de los ácidos grasos de los lípidos de los animales sometidos a dietas deficientes en AGE.

Lo más notable de esos cambios es la disminución significativa en el contenido de ácidos grasos dienoicos y tetraenoicos y un aumento concomitante de los ácidos monoenoicos y trienoicos (107).

Estas modificaciones en la composición de los ácidos grasos de los lípidos de animales sometidos a deficiencia en AGE ponen en evidencia ciertos cambios metabólicos que se producen por la necesidad del organismo de mantener un grado de insaturación en los ácidos grasos a nivel de membranas celulares necesarios para el funcionamiento normal de las mismas.

Ante la imposibilidad de contar con un aporte adecuado de ácido linoléico, las células deficientes en el mismo, recurren al ácido oleico, que sí lo pueden sintetizar. A través de él se crean nuevas dobles ligaduras lo que da como resultado un incremento notable de la síntesis del ácido eicosatrienoico $C_{20}: 3 \omega^9$ por acción combinada de la Δ^6 desaturasa y el sistema elongante correspondiente (107). Sin embargo esta tentativa de compensar la falta de ácidos grasos esenciales no tiene un efecto positivo ya que el animal muere si continúa con la dieta deficiente en AGE (87, 88)

Los cambios metabólicos observados especialmente a nivel de la composición en ácidos grasos de la fracción de fosfolípidos hepáticos pone en evidencia alteraciones a nivel de ciertos parámetros relacionados con estas modificaciones y que son consecuencia directa de la disminución en la cantidad de ácido $C_{18}: 2 \omega^6$ y $C_{20}: 4 \omega^6$ y homólogos superiores con un aumento concomitante del ácido $C_{18}: 1 \omega^9$ y $C_{20}: 3 \omega^9$.

La relación más importante como prueba de la deficiencia en AGE es la que corresponde a $C_{20}: 3 \omega^9 / C_{20}: 4 \omega^6$ que aumenta notablemente como consecuencia de la falta de aporte de ácido linoléico con la dieta (101).

IV. ACIDOS GRASOS ESENCIALES Y CELULAS TUMORALES

Cuando se demostró que las membranas de las células y de sus estructuras están formadas por lipoproteínas y que los lípidos son constituyentes importantes de las mismas se comenzó a estudiar el metabolismo de los lípidos en células tumorales ya que hasta ese momento los dos metabolismos más estudiados en éstas células -- eran el de proteínas y el de hidratos de carbono. Al respecto se puede generalizar diciendo que las necesidades metabólicas de la célula cancerosa está condicionada por la velocidad de su multiplicación. A medida que aumenta la velocidad de crecimiento tumoral, aumenta paralelamente el catabolismo de los hidratos de carbono y disminuye el de las proteínas y ácidos nucleicos (108).

Estas modificaciones tenderían a un mayor aporte energético destinado a la síntesis de nuevas estructuras lipoproteicas y a la provisión de intermediarios metabólicos.

No obstante es dificultoso poder determinar en qué medida la célula tumoral es capaz de sintetizar sus propios principios inmediatos frente a la posibilidad de obtenerlos del huésped en el cual éstas células se desarrollan, y esto es especialmente cierto respecto a los lípidos.

Los tumores requieren suficiente cantidad de lípidos para que sus membranas se sinteticen a una velocidad compatible con un crecimiento rápido.

Una pregunta fundamental es si la célula tumoral sintetiza "de novo" los lípidos que ella necesita o si los obtiene preformados a partir del huésped (109).

Está bien establecido que hay alteraciones significativas en la composición de los lípidos de membrana de las células cancerosas. Corrientemente se encuentran elevadas cantidades de lípidos con función éter(110) fundamentalmente como Oalquil diacil glicéridos. Además los ácidos grasos polietilénicos de los fosfolípidos

celulares están reemplazados parcialmente por ácidos grasos monoetilénicos siendo esta una característica común de las células tumorales (111, 113). Aparentemente el aumento de ácido monoetilénico se debería a la síntesis del ácido vaccénico ($18:1 \omega^7$) en éstas células (114).

Existirían posibles diferencias en los requerimientos absolutos de AGE por parte de las células tumorales.

Las células He La S₃ cultivadas en un medio deficiente en lípidos presentan defectos metabólicos que pueden ser parcialmente revertidos por el agregado de ácido linoléico al mismo (115).

Por otro lado las células de sarcoma 180 - ascítico y células de carcinoma ascítico de Ehrlich desarrollan normalmente cuando son transplantadas en ratones deficientes en AGE considerándose que los ácidos oleico y eicosatrienoico pueden sustituir funcionalmente a los AGE en estas células tumorales (116). Esto implicaría que estas células no dependerían de los ácidos grasos esenciales para su normal funcionamiento. No obstante no se puede descartar la posibilidad de que las mismas pudieran compensar el déficit de AGE por otros mecanismos.

V. OBJETIVOS DEL TRABAJO

Se ha considerado que para poder establecer la posible dependencia de las células tumorales por los ácidos grasos esenciales es necesario estudiar varios parámetros metabólicos indicativos de esta dependencia.

Los parámetros elegidos para el presente estudio fueron:

a) Tiempo de duplicación celular:

Este parámetro que corresponde al tiempo por medio de duplicación celular es indicativo de la adaptabilidad de la célula al medio en el cual se desarrolla y es una manifestación de la vitalidad de la misma.

b) Incorporación selectiva del radio linoléico en las distintas fracciones lipídicas:

Estudios realizados en animales deficientes en AGE - han puesto en evidencia que la incorporación in vivo de radiolinoléico se realiza preferentemente en la fracción de fosfolípidos hepáticos y no en la fracción de lípidos neutros como se observa en los animales controles (117). Este hecho pondría en evidencia la necesidad de la célula deficiente de restablecer la composición en ácidos grasos poliinsaturados de sus fosfolípidos estructurales.

c) Modificaciones de la composición de ácidos grasos en la deficiencia de AGE:

La célula trata de compensar la deficiencia en AGE por el aumento de la síntesis de ácido octadecenoico y eicosatrienoico. Estas modificaciones traen como consecuencia alteraciones de ciertas relaciones entre los ácidos grasos, siendo la más característica la que corresponde al aumento de $C20:3 \omega^9 / C20:4 \omega^6$. Este índice es indicativo de deficiencia en AGE cuando su valor es mayor de 0.4 (101).

d) Capacidad de síntesis de ácidos no saturados:

La actividad de la enzima Δ^9 desaturasa se incrementa notablemente en la deficiencia en AGE. Este aumento sería un mecanismo compensador dirigido a aumentar la síntesis de ácidos grasos no saturados y condicionaría al parámetro anterior (118).

MATERIAL Y METODOSACIDOS GRASOS:a) Radioactivos

Se emplearon ácidos grasos radioactivos provistos por Radiochemical Center, Amersham, England.

La pureza y radioactividad específica - de los mismos se indica a continuación:

<u>ACIDO GRASO</u>	<u>PUREZA</u>	<u>RADIOACTIVIDAD</u>
- 1 C ¹⁴ palmítico	98%	58 μ ci / μ mol
- 1 C ¹⁴ esteárico	99%	56 μ ci / μ mol
- 1 C ¹⁴ linoléico	97%	52 μ ci / μ mol

b) no radioactivos

Nu - -chek prep. Inc. Minnesota ha provisto los siguientes ácidos con un 99% de pureza: ácido linoléico, ácido Δ^{11} eicosenoico (20: 1 ω^9); ácido $\Delta^{8,11,14}$ eicosatrienoico (20: 3 ω^6); ácido Δ^{11} octadecenoico (vacénico); ácido $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ docosahexaenoico (22: 6 ω^3).

Los ácidos palmítico y esteárico (99% de pureza) fueron obtenidos del Hormel Institute Austin Minnesota (USA).

ALCOHOLES: Linoleil - ol

ALDEHIDOS: Caprilaldehido, pelargonaldehido y caproaldehido provistos por Fluka A.G (Suiza).

MATERIAL PARA CROMOTOGRAFIACromatografía en capa delgada

Silicagel G., Macherey - Nagel Co. Duren
(Alemania).

Cromatografía en columna

Acido silícico - Mallinckrodt - New York (USA)
Hyflo - supercell - Johns Manville - New York (USA).

Cromatografía gas líquido

- Dietilenglicol succinato (DEGS) al 15% en
Chromosorb 80/100 W A W
- Etilenglicol succinato (EG S S X) al 15%
en Chromosorb 80/100 W A W
- Etilenglicol succinato (EGSSY) al 15% en
Chromosorb 80/100 W A W

Estas fases fueron obtenidas de Supelco, Pennsylva
vania (USA).

SOLVENTES:

Etanol RPE Carlo Erba Milán (Italia)
Cloroformo RPE Carlo Erba Milán (Italia)
Eter Etilico (secado con sodio metálico y destilado a 36°C)
Laboratorio Cicarelli (Argentina)
Metanol RPE Carlos Erba - Milán (Italia)
Pentano Normal Metheson. Coleman and Bell Ohio N.I. (USA)
Eter de Petróleo 30°- 50° RPE. Carlos Erba Milán (Italia)

Dioxano (estabilizado) Mallinokrodt New York (USA)

Tolueno-Gentilmente provisto por Petroquímica General Mosconi
(Argentina)

MATERIAL PARA LIQUIDO DE CENTELLEO

- Ommifluor (98% PPO y 2% bis - M.S.B.) New York. England Nuclear. Boston Mass. (USA).

DEGAS

- Albúmina bovina fracción V (pobre en ácidos grasos). Mills Laboratories Inc. Indiana (USA)
- Silicona Rodosil. Lab. Ocefa. Bs.As. (Argentina)
- Glucosa P.A. Mallinckrodt. New York. (USA)
- Heparina 5.000 USP "Liquemine". Roche. (Argentina)
- Vitride $(\text{Na Al H}_2) (\text{OCH}_2 \text{ CH}_2 \text{ OCH}_3)_2$ Fluka A.G. (Suiza)
- Acido acético glacial RPE Carlo Erba. Milán (Italia)
- Nitrato de plata RPE. Carlo Erba. Milán (Italia)
- Trifenilfosfina. Supelco Co. Pennsylvania (USA)
- Hidroxido de Hyamina 10 X Packard Co. Illinois (USA)
- Etilen Glicol merck (Alemania)

GASES:

Nitrogeno purísimo. AGA (Argentina)

Hidrógeno purísimo. AGA (Argentina)

MATERIAL PARA DIETAS

Caseína en polvo, dextrina comercial en polvo y aceite de maíz comestible adquiridos en comercios locales.

Las vitaminas utilizadas en la preparación de las dietas fueron provistas por laboratorios Abbot (Argentina)

ANIMALES

Se utilizaron ratones Albino Swis de 25 - 30 gramos de peso - provistos por el Bioterio del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.

a) Mantenimiento:

Los animales se alimentaron ad-libitum con dieta balanceada de Purina y sometidas a un período de luz de 12 horas y a una temperatura de 18 a 22 °C

b) Dietas:

Los animales se separaron en dos lotes. Un lote fue alimentado con dieta testigo y el otro con una dieta deficiente en ácidos grasos esenciales, cuyas composiciones se observan en la tabla I.

La composición en sales de la dieta está de acuerdo a la denominación Mc Collum - Davis N°4 (119) que contiene por 100 gr. de mezcla de sales:

$PO_4 H K_2$ - 25,8%

Lactato de Calcio 25,6%

$(PO_4 H_2)_2 Ca H_2O$ 14,6%

$PO_4 H_2 Na H_2O$ 9,4%

$SO_4 Mg$ anhidro 7,2%

Cl Na 4,7%
 citrato de hierro y amonio 3,2%

La composición en vitaminas (120) de las dietas es la siguiente. Cada kilogramo de dieta contiene en mg;

Tiamina	10
Riboflavina	10
piridoxina	10
Pantotenato de Calcio	50
Niacina	25
Inositol	1000
Biotina	2
Acido P.aminobenzoico	10
Acido fólico	2
Cloruro de colina	1000
Vitamina B ₁₂	0,1
α-tocoferol	30
Menediona	50
Vitamina A	3000 U I
Vitamina D	800 U I

CELULAS DE SARCOMA 180

Las células empleadas en los estudios realizados son las del Sarcoma 180 o tumor de Crocker, originados en ratones como una neoplasia epitelial espontánea localizada en la región axilar (121).

Este tumor se descubrió en 1914 por el Dr.W.H. Woglom en los laboratorios Croker de Estados Unidos y se mantuvo desde entonces por sucesivos transplantes (122).

Tabla I

Composición de dietas

a) *Composición porcentual*

	NORMAL (testigo)	DEFICIENTE EN A.G.E
ACEITE DE MAIZ	3 %	0 %
CASEINA	24 %	24 %
DEXTRINA	67 %	70 %
VITAMINAS + CASEINA	2 %	2 %
SALES	4 %	4 %

b) *Composición en ácidos grasos*

ACIDO GRASO	NORMAL (testigo) mg/g dieta	DEFICIENTE EN A.G.E. mg/g dieta
14:0	0.66	0.3
16:0	4.5	1.87
18:0	1.37	1.30
18:1	9.6	3.77
18:2	11.66	2.36

c)

	NORMAL	DEFICIENTE EN A.G.E
Cantidad de 18:2 ingerido diariamente	58.3 mg	11.8 mg
Porcentaje en Kcal que aporta diariamente el 18:2 a la dieta	2.6	0.57

En 1951 C. Friend desarrolla el Sarcoma 180 ascítico en ratones Albino Swiss a partir de un inóculo intraperitoneal de una suspensión de células provenientes del Sarcoma 180 sólido (123). El número modal de cromosomas de esta sublínea ascítica es 74 (124). La misma fue provista por la Dra. Pasqualini de la Academia Nacional de Medicina.

Las células se mantuvieron rutinariamente en la cavidad peritoneal de ratones Swiss y se transplantaron cada 7 -10 días. Después de tres pasajes, 0,5 ml a 1 ml de la suspensión celular en plasma ascítico conteniendo entre 40 a 90×10^6 células/ml adicionadas de 10 unidades/ml de heparina y 10% de glicerina V/V, se colocaron en viales estériles, enfriadas a 0°C, luego a -20°C durante una hora y posteriormente a -80°C por un período no mayor de dos meses.

Para su utilización, la suspensión de células se descongeló rápidamente colocándolas en un baño de agua a 37°C. Esta técnica constituye una modificación de la original de Peterson y col. (125) y aseguró una buena viabilidad celular.

Halder y col. consideran que el uso de un stock congelado de células evita cualquier tipo de alteraciones que se pudieran originar en la misma cuando éstas se mantienen por repiques sucesivos en animales sin efectuar interrupciones (126).

El trasplante de las células se llevó a cabo mediante la inyección intraperitoneal de 0.2 ml de una suspensión conteniendo 14×10^6 células ascíticas en solución isotónica estéril de Na Cl.

Las células se obtuvieron de la cavidad peritoneal sacrificando previamente al animal por fractura cervical.

Para evitar la coagulación del líquido ascítico se inyectó en la cavidad peritoneal 1 ml de solución de heparina (10 unidades / ml). Se abrió la misma en forma aséptica y se aspiró el contenido con pipeta Pasteur modificada, cuyo orificio terminal se encuentra a los lados y no en el extremo, lo que evita las hemorragias por lesiones en los órganos durante la aspiración. Finalmente la cavidad peritoneal se lavó repetidas veces con solución fisiológica con la finalidad de obtener el total de células.

DETERMINACION DEL TIEMPO DE DUPLICACION CELULAR

Obtenidas las células de acuerdo a lo descrito anteriormente, se centrifugaron a 800 x g a 4°C se lavaron dos veces con solución fisiológica estéril y se resuspendieron en el doble de su volumen con la misma solución.

Se determinó el tiempo de duplicación empleando la siguiente ecuación (116):

$$T = \frac{0,301 \cdot t}{\log. \frac{N}{N_0}}$$

T = tiempo de duplicación celular

N₀ = Número de células en el inóculo inicial

N = número de células al tiempo t después del inóculo

El conteo de las células se realizó en cámara cuentaglóbulos de Neubauer, previa dilución de las mismas con Azul de Tripán al 0,5% en solución fisiológica para determinar al mismo tiempo la viabilidad celular.

EXTRACCION DE LOS LIPIDOS

Los lípidos de las células tumorales y del hígado de los animales huéspedes se extrajeron de acuerdo al método de Folch, Pi y col. (127) empleando cloroformo - metanol 2:1 (V/V) en una relación de una parte de muestra a 20 partes de mezcla.

Los lípidos se obtuvieron de la fase cloro-
fórmica, después de evaporar el solvente y se fraccionaron en sus com-
ponentes mediante cromatografía en columna y en capa delgada.

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

Se empleó cromatografía en columna de áci-
do silícico. Para ello se activó el mismo durante 12 horas a 120°C pa-
ra rellenar luego las columnas (128) de 10 mm de diámetro.

Se utilizó una relación de 1 g de ácido si-
lícico activado por 1 mg de P de fosfolípidos con 0,4 g de Hyflo super
cell.

Los lípidos neutros se eluyen con 50 ml de
cloroformo y posteriormente los fosfolípidos con 70 ml de metanol. Las
fracciones así separadas se resuelven en sus componentes mediante cro-
matografía en capa delgada.

CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA

a) Fraccionamiento de lípidos neutros

La fracción de lípidos neutros ob-
tenida por cromatografía en columna, se separó en sus componentes
utilizando placas de 20 cm x 20 cm de 0,5 mm de espesor de silicagel
G según Stahl. El solvente utilizado en el desarrollo cromatográfico
corresponde a una mezcla de éter de petróleo: éter etílico: ácido ac-
ético (80: 20: 1 v/v). De esta manera se separaron las fracciones
de diglicéridos, triglicéridos, ácidos grasos libres, éteres lípi-
dos y ésteres de colesterol (129). Las bandas correspondientes a és-
tas fracciones reveladas con vapores de yodo se reconocieron median-
te el empleo de patrones puros.

b) Elución de los triglicéridos y éter-lípidos

Los triglicéridos y éter-lípidos separados mediante la técnica cromatográfica explicada en el párrafo anterior se eluyeron de la silicagel mediante el empleo de cloroformo: metanol 2: 1 (v/v) a 40°C con agitación y atmósfera de nitrógeno. Las fracciones así extraídas se destinaron para el estudio analítico, según se detalla más adelante.

c) Análisis de las fracciones de éter-lípidos y triglicéridos

Estas -- fracciones se cromatografiaron nuevamente empleando cromatografía en capa fina con silica gel G según Stahl y como solvente desarrollante se utilizó una mezcla de hexano: éter etílico 90 : 10 v/v (130) obteniéndose así una mejor resolución de las mismas.

Las bandas se eluyeron de la silica con la mezcla ya mencionada en (b) y los productos así obtenidos se sometieron a diversos procesos para proceder a su identificación.

d) Cromatografía en capa delgada con nitrato de plata

Para la separación de los ésteres metílicos de ácidos grasos de acuerdo al número de dobles ligaduras presentes en sus cadenas carbonadas se empleó cromatografía en capa fina de silicagel G/Nitrato de plata al 10%. Para separar ésteres de ácidos saturados, de monoetilénicos se utilizó como solvente de desarrollo una mezcla de éter de petróleo: éter etílico (90:10 v/v) (131) y para separar entre sí los ésteres de ácidos polietilénicos se empleó una mezcla de cloroformo: metanol (97: 3 V/V) (132). Las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta después de rociar la placa con una solución etanólica al 0.05% de diclorofluoresceína

CROMATOGRAFIA GAS LIQUIDO

- a) Determinación analítica de la composición en ácidos grasos de los lípidos de las células tumorales e hígado del animal huésped.

Se empleó un equipo marca Antek modelo 464 L P con detector de ionización de llama utilizando columnas - de vidrio de longitudes de 1,50 m y 2,10 m de 4 mm de diámetro in terno rellenas con DEGS al 15%; EGSSX al 15% y EGSS Y al 15% en Chromosorb 80/100 W A W.

El gas eluyente utilizado fue el nitrógeno purísimo y la temperatura de trabajo fue de 170°C.

- b) Para la determinación de los productos de ozonólisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos octadecenoicos se utilizó una columna de 1,50 m rellena con DEGS al 15% a -- una temperatura de 50°C.

- c) Obtención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos para estas cromatografías se obtuvieron después de tratar una alí cuota de la muestra de los lípidos con metanol-H Cl durante tres horas a 66°C (133) y posterior extracción de los ésteres metílicos de la fase metanólica con 2 ml de éter de petróleo.

- d) Identificación de los ácidos grasos.

La composición en ácidos grasos se determinó cromatografiando las muestras con las fases líquidas ya indi cadas y con dos longitudes de columna para resolver los distintos isómeros de posición de los ácidos polietilénicos. Para la identi ficación de los picos en los cromatogramas se emplearon muestras puras de ésteres metílicos de ácidos grasos, el tiempo de retención

relativo y gráficos del logaritmo del tiempo de retención relativo versus longitud en cadena

Tiempo de Retención:

Es el tiempo que tarda un compuesto dado en salir de una columna en determinadas condiciones.

Tiempo de Retención Relativo:

Es el cociente entre el tiempo de retención de un componente dado y el correspondiente a otra sustancia tomada como patrón de referencia (por lo general el ácido esteárico). Este valor depende solamente del sistema de partición utilizado (relleno de columna) y de la temperatura y lo que es más importante, es independiente de otras condiciones experimentales. Se lo utilizó en la identificación de ácidos grasos por comparación de sus tiempos de retención relativos con los de ácidos grasos testigos analizados en las mismas condiciones (134)

Logaritmo decimal del Tiempo de Retención Relativo VS Longitud de Cadena:

Ackam (135, 136) ha demostrado la existencia de correlaciones entre los ácidos y sus tiempos de retención relativos. Tanto los ésteres metílicos de los ácidos grasos monoenoicos de la misma familia, como aquellos de los ácidos grasos poli^enoicos de igual número de dobles enlaces e idéntica familia presentan una correlación lineal entre el logaritmo decimal de sus tiempos de retención y la longitud de cadena total.

Este método de identificación es de gran utilidad ya que se interrelacionan los ácidos grasos de un análisis dado independientemente de la naturaleza de las columnas y condiciones operativas (temperaturas, flujo del gas portador, etc.) (137).

El porcentaje de cada ácido en la composición se determinó -- por triangulación de los picos correspondientes.

DETERMINACION DE LA RADIOACTIVIDAD

A) Determinación de la radiactividad en ésteres metílicos de ácidos grasos.

En los experimentos en los cuales se midió la desaturación y elongación de ácidos grasos, se procedió a interesterificar los lípidos totales extraídos de las células ascíticas que se habían incubado con ácidos radiactivos ^{14}C .

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos así obtenidos se cromatografiaron para su separación y determinación de radiactividad en equipos de cromatografía gas líquido:

1. Radiocromatografía

El equipo empleado fue un radiocromatógrafo Packard con contador proporcional de radioactividad.

En éste método los ésteres metílicos de los ácidos grasos son separados mediante una columna de cromatografía gas-líquido y a medida que emergen de la misma ingresan a un horno de combustión (138). Esta unidad consiste en un tubo metálico que contiene 0Cu como catalizador, colocado dentro de un horno eléctrico cuya temperatura es de 900°C .

El agua es retenida por $(\text{Cl.O}_4)_2 \text{Mg}$ que se encuentra en un tubo a continuación del catalizador, mientras que el $^{14}\text{CO}_2$ penetra en la cámara de conteo. Al gas eluyente Argón junto con el $^{14}\text{CO}_2$ se le agrega propano seco en proporción del 10% y la mezcla circula por el contador proporcional y la radioactividad se registra en un equipo Honeywell.

2. Radiocromatografía con recolección fraccionada de las muestras

Cuando la radioactividad de las muestras a ser analizadas fue muy baja (menor de 10,000 cp.m) (139) se utilizó un equipo de cromatografía gas-líquido analítico marca Antek modelo 464 L P con columna de 2.10 m de largo por 4 mm de diámetro interno rellenas con EGSSY al 15% en Chromosorb W A W. Las condiciones de trabajo se indicaron en el párrafo correspondiente a "cromatografía gas-líquido".

Para recolectar en el detector el $^{14}\text{CO}_2$ proveniente de la combustión de los ésteres metílicos de los ácidos grasos en estudio, se colocó una chimenea adicional sobre la salida de los gases del mismo (Fig.6). Sobre éste se apoyó un vial invertido conteniendo un papel de filtro plegado embebido en 100 μl de hidróxido de Hyamine 10 x 1 en metanol. Esta sustancia es el hidróxido de p (diisobutil -cresoxi - etoxietil) dimetil bencil amonio capaz de fijar el $^{14}\text{CO}_2$. Los viales se dejaron enfriar, se les agregó 10 ml de solución de centelleo Brays y se los agitó fuertemente durante tres minutos, para contar la radioactividad en un contador de centelleo líquido.

Este método demostró ser reproducible en sus resultados, con alta sensibilidad y comparable con los datos obtenidos por otras técnicas. Estos parámetros se midieron mediante mezclas patrones de ésteres metílicos de ácidos grasos radioactivos.

B) Determinación de radioactividad en un contador de centelleo líquido:

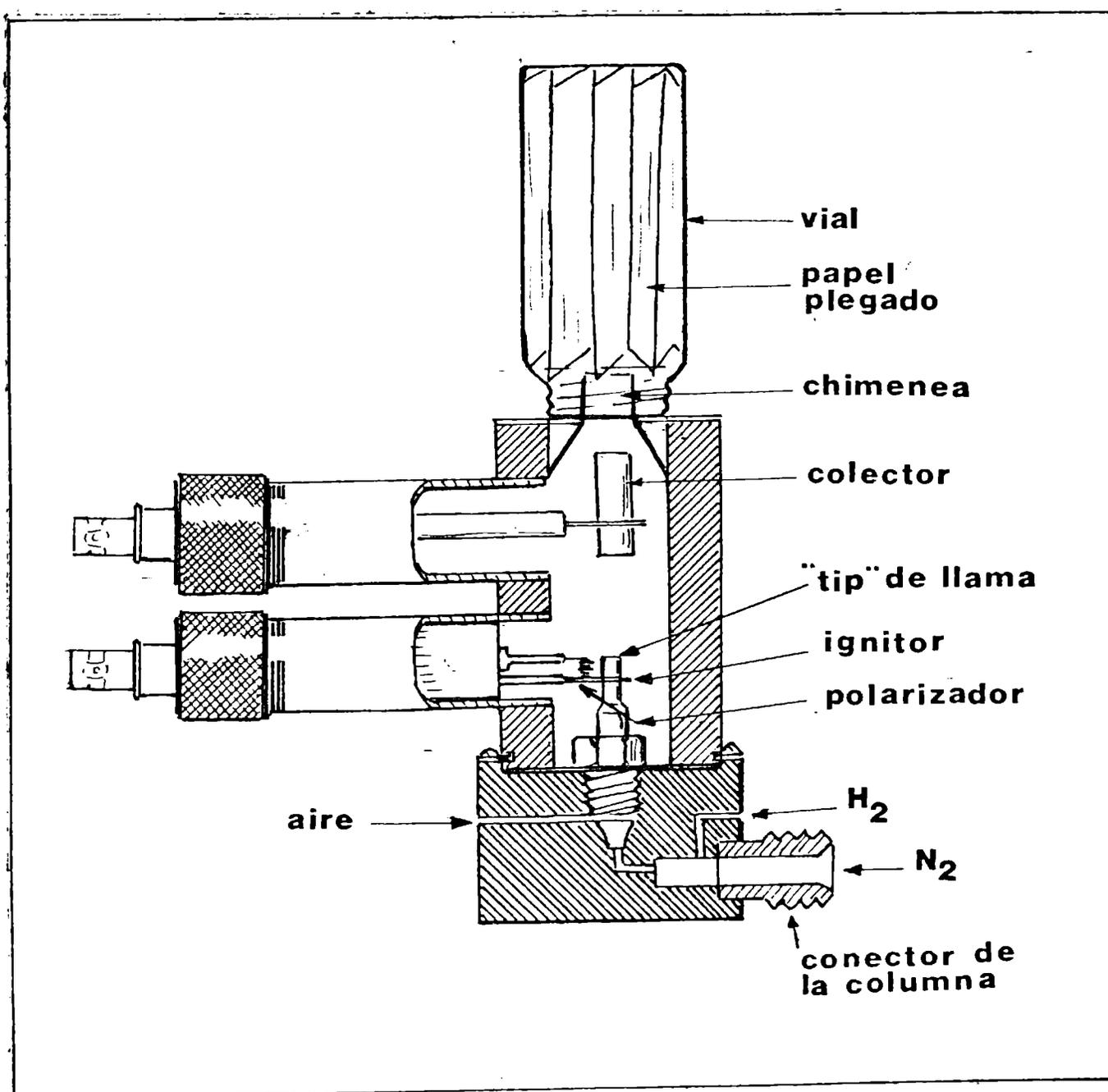
El equipo empleado fue un contador de centelleo líquido Beckman L C 100.

Se utilizaron las siguientes soluciones de centelleo según el material radiactivo en estudio.

1) Solución de centelleo para muestras disueltas en solventes

Figura 6 —.

Esquema del Detector de ionización de llama con dispositivo de recolección de $^{14}\text{CO}_2$ —.



orgánicos

Omnifluor 4 g

Talueno 1 l

2) Solución de centelleo para muestras acuosas.

Se empleó solución de Bray (140)

omnifluor 8 g

naftaleno 60 g

metanol 100 ml

etilenglicol 20 ml

dioxano 880 ml

C) Determinación de la radioactividad de las muestras desarrolladas en cromatografía en capa delgada.

Los cromatogramas desarrollados mediante cromatografía en capa delgada se analizaron con un equipo Berthold Scanner II con detector proporcional 2 π

Las placas se colocaron directamente sobre una bandeja móvil que pasa debajo del detector de radiación, registrándose automáticamente la radioactividad con un trazado continuo de picos.

El contador 2 π utiliza metano como gas de conteo y un voltaje de 3000 voltios con un amplio rango de sensibilidad.

Los parámetros que corresponden a velocidad de lectura, la constante de tiempo y flujo de gas se obtuvieron mediante tablas provistas por la Compañía Berthold de Alemania.

Los valores elegidos fueron los siguientes:

Constante de tiempo:	10 segundos
Ventana del detector:	1 mm x 16 mm
Velocidad de lectura:	300 mm / hora
Sensibilidad	0,5 a 2 K

HIDROGENOLISIS DE ÉTER - LÍPIDOS

Separación y extracción de sus productos

Los éter lípidos de la fracción de lípidos neutros de las células de Sarcoma 180 ascítico incubadas con radiolinoléico fueron purificados por cromatografía en capa fina de acuerdo a lo expuesto anteriormente. Una vez extraídos de la silica gel se procedió a realizar sobre ellos técnicas de hidrogenólisis.

Este método utiliza un reductor que transforma los ácidos grasos que esterifican el glicerol a alcoholes grasos, quedando solo la función éter como O-alkil glicerol o O - alquenil glicerol (141, 142), según se trate de alkil gliceridos o plasmalógenos neutros respectivamente.

Como agente reductor se empleó $\text{NaAlH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)_2$ conocido con el nombre comercial de Vitride (143). Este producto ofrece una mayor seguridad y simplicidad en el trabajo que el LiAlH_4 .

A la muestra disuelta en 1 ml de dietil - éter y benceno al 20% (V/V) perfectamente secos, se le agregó 0.2 ml de Vitride en benceno al 70%. Se llevó el tubo de reacción cerrado a un baño a 37°C y se agitó durante 30 minutos.

Los productos de reacción fueron extraídos con dietil éter previo agregado lento de 3 ml de ácido ascético al 4% (144).

Posteriormente se cromatografiaron en capa delgada para separarlos, utilizándose standards de linoleil-ol. Se empleó como solvente de desarrollo hexano/éter etílico/metanol/ácido ascético, 80/20/10/1/ (V/V/V/V/) (145).

Se leyó la distribución de la radioactividad por Scanner y se eluyó la zona correspondiente al éter glicerol con éter etílico y metanol al 15% mientras que la correspondiente a los alcoholes grasos se extrajo con cloroformo - metanol 2:1.

ANALISIS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO DE LOS ÉTER - LÍPIDOS

La unión éter en alquil digliceridos y plasmalógenos neutros produce bandas características a $9\ \mu\text{m}$ ($1111,1\ \text{cm}^{-1}$) y $6,1\ \mu\text{m}$ ($1666,6\ \text{cm}^{-1}$) respectivamente en sus espectros de infrarrojo (146,147).

El alquil -1- glicerol o sus derivados tiene espectros de infrarrojos similares a los alquil digliceridos excepto que los grupos hidroxilos introducen bandas adicionales (148). En base a estas características se estudiaron por espectroscopia de infrarrojo los productos de hidrogenolisis obtenidos por la acción del Vitride sobre los éter -lípidos de la fracción de lípidos neutros de las células de Sarcoma 180.

Se empleó un equipo Perkin Elmer 457.

Las muestras disueltas en éter de petróleo se colocaron entre dos ventanas de KBr y se montaron en el portamuestra. Se recorrió el espectro entre 4000 y $250\ \text{cm}^{-1}$ bajo las siguientes condiciones de trabajo:

velocidad de barrido: media

ventana: normal

IDENTIFICACION DE LOS ISOMEROS DE ACIDOS GRASOS MONOETILENICOS

METODO DE OZONOLISIS REDUCTIVA

Con el fin de determinar la posición de la doble ligadura en la cadena carbonada de los ésteres metílicos de los ácidos monoetilénicos se empleó la técnica de ozonólisis reductiva.

La reacción del ozono con las dobles ligaduras y posterior reducción del ozonido intermediario se puede resumir en el siguiente esquema:



Cuando se realiza ozonólisis reductiva de ésteres metílicos de ácidos grasos monoetilénicos se obtienen por ruptura de la molécula a la altura de la doble ligadura, un aldehído éster y un aldehído (149).

Para el estudio de los isómeros de posición de los ácidos octadenoicos se empleó la técnica de Beroza y Bierl (150) con un micro-ozonizador Supelco provisto de una bobina Tesla - Coil de alta frecuencia.

El éster-metílico del ácido monoetilénico colocado en un tubo de Kahn, se disolvió en pentano, ya que en metanol es menos soluble a - 70°C, y se colocó a - 71°C en una mezcla frigorífica de nieve carbónica y acetona en el vaso Dewar del equipo. El tubo de Kahn se tapó con un septum de silicona a través del cual se pasó una aguja conectada con la bobina generadora de O₃ haciendo burbujear el gas a través de la muestra.

Por un tubo de desprendimiento el O₃ que no ha reaccionado pasa a un Erlenmeyer que contiene una solución indicadora compuesta por KI al 5% en solución acuosa sulfúrica al 5%

más el agregado de almidón. Se detiene el pasaje de gas ózono cuando aparece el color azul de la solución indicadora. Se hace pasar luego N_2 seco sobre la muestra para evacuar el exceso de O_3 . Se retira el tubo de reacción de la mezcla refrigerante y se le agrega 1 mg de trifenilfosfina para una cantidad de muestra de 25 ~~mg~~.

Se tapa herméticamente para evitar pérdidas de compuestos volátiles y se agita. Una vez alcanzada la temperatura ambiente se siembran los productos de la reacción en una columna de cromatografía gas líquido para su análisis cuali y cuantitativo, como se indicara en el párrafo correspondiente a cromatografía.

ESTUDIO "IN VITRO" DE LA DESATURACION E INCORPORACION DE ACIDOS GRASOS RADIATIVOS EN CELULAS ENTERAS DE SARCOMA 180

Una vez obtenidas las células del Sarcoma 180 ascítico del animal huésped se los separó del líquido ascítico y se lavaron dos veces con solución de incubación. Después de centrifugar a 800 x g se resuspendieron en un volumen doble del pellet celular y se contaron.

La incubación de las células intactas se realizó en Erlenmeyer de 50 ml siliconadas en un volumen de 4 ml. El medio de incubación utilizado fué el de Hanks modificado (151) consistente en:

NaCl 0,8 g %: KCl 0,04 g %

Ca Cl_2 0,014 g %

Mg SO_4 7 H_2O 0,01 g %

Mg Cl_2 6 H_2O 0,01 g %

Na CO_3 H 0,034 g%

buffer $PO_4H_2^-/PO_4H^-$ Ph: 7.4 0,01 M, glucosa 270 mg %.

Se incubaron $1\mu\text{Ci}$ de ácido palmítico 1 C^{14} ; $1\mu\text{Ci}$ de ácido esteárico 1 C^{14} o $1\mu\text{Ci}$ de ácido linoleico 1 C^{14} .

Los ácidos se complejaron con albúmina bovina (dializada contra solución de Hanks y liofilizada) en la relación molar de ácido graso/albúmina = 2 (152). Para ello se formó el jabón de sodio del ácido graso a 45°C y se agregó la albúmina en 0,2 ml de solución de buffer fosfato 0,1 M pH = 7.4.

Se agitó toda la noche a temperatura ambiente para formar el complejo. La cantidad de células tumorales incubadas en todos los experimentos realizados fue de 200×10^6 con una concentración de ácidos radioactivos y no radioactivos de $51\mu\text{g} / \text{ml}$

Se utilizó un incubador Dubnoff agitado a una velocidad de 100 oscilaciones por minuto durante 3; 5; 10 y 60 minutos a 37°C .

Transcurrido el tiempo de incubación se colocaron los Elenmeyer en hielo y se transfirió el contenido de los mismos a otros Erlenmeyer que poseían una mezcla de cloroformo - metanol 2:1. Esta técnica se utilizó para las incubaciones de entre 3' y 10' asegurando así correctamente el tiempo de incubación empleado.

Las células incubadas durante 60 minutos se centrifugaron a 0°C a $800 \times \text{g}$ durante 5 minutos para separarlas del medio de incubación. Las mismas se lavaron dos veces con 15 volúmenes de solución de albúmina conteniendo $1\mu\text{mol}$ de albúmina $\times 10^8$ células durante 3' a 0°C (153).

Según Spector y col. el tiempo de contacto de esta solución de lavado con las células debe limitarse a tres minutos para evitar pérdida de radiactividad incorporada ya que ha demostrado que la albúmina libre de ácidos grasos actúa como aceptor de exógeno de los ácidos grasos incorporados en la célula. Una vez lavadas, se extrajeron los lípidos de las células con solución de cloroformo - metanol 2: 1.

Tanto en el caso de las incubaciones realizadas en tiempos muy cortos ^{como} en la que se incubó durante una hora, el extracto clorofórmico conteniendo los lípidos totales se evaporó a se quedad en un rotavapor Buchi y el residuo se tomó en éter de petróleo para lavarlos dos veces con igual volumen de solución al 1% de KOH en alcohol al 50% (154). Este lavado se realiza con el propósito de eli minar los ácidos grasos radiactivos libres de la incubación, no incor porados en las fracciones lipídicas celulares.

Las muestras se guardaron en solución de éter de petróleo con atmósfera de Nitrógeno seco a 4°C para someterlas a las distintas técnicas de análisis de acuerdo al esquema de tra bajo que se dará más adelante.

DESCRIPCION DEL ESQUEMA DE TRABAJO EXPERIMENTAL

Con el propósito de elucidar los parámetros expuestos en el párrafo de objetivos se diagramó el esquema de trabajo que muestra la fig.7.

Se utilizaron cinco ratones Albino Swiss de 25-30 g que se mantuvieron durante 50 días (155) con dieta deficien te en ácidos grasos esenciales. Otro lote de cinco animales se alimen tó con dieta normal.

A ambos lotes se les inyectó $14 \cdot 10^6$ células de Sarcoma 180 ascítico y al cabo de 234 horas se las extrajo de acuerdo a lo expuesto en materiales y métodos y se las contó para de terminar el tiempo de duplicación celular. A esta etapa se la denominó PRIMER REPIQUE .

De cada animal se tomaron 200 millones de células ascíticas, se lavaron y se incubaron durante 3, 5 y 10 minutos con ácido linoléico C^{14} . Otra alicuota de células se incubó 60 minutos

con distintos ácidos grasos, tales como el ácido palmítico C^{14} , el ácido esteárico C^{14} y el ácido linoléico C^{14} .

Cumplido los tiempos de incubación se extrajeron los lípidos celulares por la técnica del Folch. Una alícuota de las distintas muestras se interesterificó. Con los ésteres metílicos así obtenidos se realizó cromatografía gas - líquido analítica y radio - cromatografía para determinar la composición en ácidos grasos y la distribución de la radiactividad en los mismos; también se realizó cromatografía en capa delgada de sílica gel- G/NO_3 Ag con el fin de detectar si dichos ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron desaturados. Por otra parte se aprovechó esta técnica para aislar el ácido octadecenoico. A este ácido se le aplicó técn. de ozonólisis. Los productos de la misma se analizaron por cromatografía gas - líquido con el propósito de calcular el porcentaje de cada uno de los isómeros de posición del ácido monoetilénico.

Otra alícuota de los lípidos totales de las células ascíticas se pasó por columna de ácido silícico. Se separaron las fracciones de lípidos neutros y fosfolípidos y se determinó la radiactividad incorporada en cada una de ellas por medio de contador de centelleo líquido.

Los lípidos neutros se cromatografiaron en capa delgada, se revelaron con I_2 y se localizó la radiactividad incorporada en las distintas fracciones por lectura de Scanner.

Las zonas correspondientes a los alquildiacil glicéridos, plasmalógenos neutros y la correspondiente a triglicéridos se eluyeron para purificarlas luego por cromatografía en capa delgada. Las muestras purificadas se redujeron con Vitride y los productos de hidrogenólisis se aislaron también por cromatografía en capa delgada. A estos últimos se los analizó por espectroscopía de infrarrojo.

2do. REPIQUE: Células ascíticas de Sarcoma 180 desarrolladas en los primeros animales deficientes en A.G.E. se inyectaron nuevamente en un segundo lote de ratones alimentados con la misma dieta transcurridas 208 horas se las extra_{jo} del animal y se procesaron de la misma forma que en el primer repique.

3er. REPIQUE: Se procedió de igual manera que en el primer y segundo repique.

PRESENTACION Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS

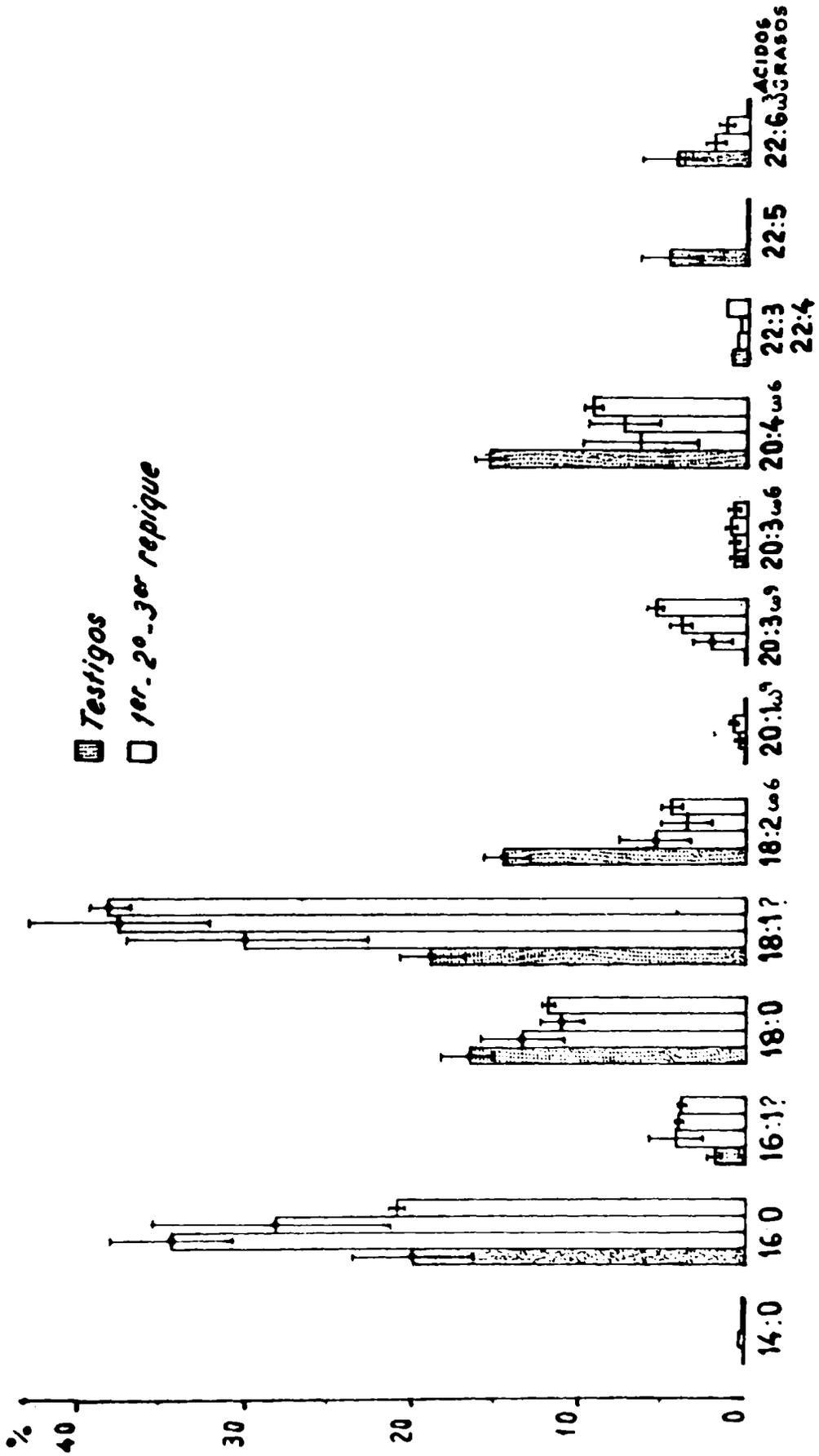
A) Composición de ácidos grasos en las dietas empleadas:

Los ratones que soportaron las células ascíticas del Sarcoma 180 utilizadas en los experimentos que aquí se presentan, fueron alimentados con dos tipos de dietas producidas en el laboratorio. La composición cuali-cuantitativa en ácidos grasos de las mismas fue analizada por cromatografía gas-líquido utilizando un éster metílico del ácido Δ^{11} eicoenoico como standard interno. La tabla I representada en materiales y métodos en el párrafo correspondiente a dietas, muestra la composición de ácidos grasos en miligramos por gramo de alimento. Se puede apreciar que no se ha trabajado con una dieta carente de ácidos grasos, de allí que se la ha denominado deficiente en ácidos grasos esenciales pues contiene 2.36 mg de ácido linoléico por gramo de dieta, es decir, 5 veces menos que la llamada dieta normal o testigo que cumple con el aporte mínimo de lípidos aceptado por distintos laboratorios para un mantenimiento normal de ratones adultos (156)

A los demás ácidos que muestra la tabla I se los ha tenido en cuenta al expresar la composición de la dieta, a pesar de no presentar la estructura 6-9 dicitadecadienilo y de poder ser sintetizados "de novo" por el organismo animal, pero su presencia en el alimento podría influir en los resultados de los experimentos.

Si se considera que un ratón adulto normal ingiere aproximadamente 5 g de alimento diarios (157), se puede deducir que los animales alimentados con la dieta deficiente en A.G.E. reciben diariamente 11.8 mg de $18:2 \omega^6$ equivalente a 0.57 K cal.% de la dieta, mientras que los ratones mantenidos con dieta normal ingieren 58.3 mg de $18:2 \omega^6$ correspondiendo a 2.6 K cal por cien K cal de la dieta.

**Composición Porcentual en Ácidos Grasos de Lípidos Totales de Hígados
Huéspedes Deficientes en A.G.E.**



Holman y col. (101) al estudiar los lípidos de hígado de rata macho y la variación de la relación entre los ácidos 20:3 ω^9 y 20:4 ω^6 , cuando se modifica el porcentaje de calorías que aporta el linoleato en la dieta, sugirieron que aproximadamente el 1% de las calorías de ésta última en forma de linoleato satisface el requerimiento de ácidos grasos esenciales. Greemberg y col. (158) revelaron que la rata macho requiere mayores niveles de ácido linoléico que la rata hembra para prevenir los síntomas de deficiencia. Puldekkiewicz y col. calcularon que las necesidades de ácido linoléico para la rata macho eran del orden del 1.3% de las calorías de la dieta (159).

Si se toma entonces el valor del 1% como límite inferior de normalidad, se puede decir que en los experimentos -- que aquí se presentan se ha trabajado con animales que han recibido más del doble del porcentaje de calorías de linoléico propuestos por Holman, en la dieta normal, y aproximadamente la mitad del mínimo necesario de calorías de linoleato, en la dieta deficiente en A.G.E.

B) Composición de ácidos grasos de lípidos totales de hígados de ratones huéspedes:

Los ratones utilizados, por ser adultos (aproximadamente 3 meses de edad) no acusaron cambios morfológicos notables, característicos de la deficiencia en A.G.E. (160), por ello para tener una idea de las posibles modificaciones producidas por dietas deficientes en A.G.E. ya mencionadas, se extrajeron los lípidos hepáticos y se analizó su composición en ácidos grasos por C.G.L. -- Los porcentajes correspondientes a cada ácido se muestran en la Fig. 8. Las barras en blanco representan los valores porcentuales de los ácidos grasos de los lípidos hepáticos de los lotes de animales utilizados en el 1er., 2do. y 3er. repique de las células ascíticas del Sarcoma 180. Las barras punteadas corresponden a los hígados de animales

Parámetros de evaluación de la deficiencias de ácidos grasos esenciales en hígados de ratones huéspedes.

Hígado de ratones huéspedes alimentados con dieta	$\frac{20:3\omega_3}{20:4\omega_3}$	$\frac{18:2\omega_6+20:4\omega_6}{20:3\omega_3}$	Metabolitos ω_6	Total de ácidos ω_6	Ácidos Saturados	Ácidos Monoeno	$\frac{18:2\omega_6}{20:4\omega_6}$	Total de ácidos P.I	Índice de dobles ligaduras
Testigo	0.013 ± 0.001	29.88 ± 1.34	20.94 ± 2.20	35.46 ± 1.91	36.76 ± 5.2	21.26 ± 2.78	0.93 ± 0.09	39.98 ± 3.8	1.62 ± 0.17
Deficiente en AGE (1er Repique)	0.85 ± 0.46 P<0.1	6.00 ± 2.89 P<0.01	7.18 ± 3.69 P<0.01	12.51 ± 5.69 P<0.01	48.03 ± 3.87 P<0.05	39.99 ± 2.00 P<0.001	0.99 ± 0.50 N.S.	16.54 ± 6.3 P<0.01	0.81 ± 0.12 P<0.01
Deficiente en AGE (2o Repique)	0.55 ± 0.06 P<0.001	7.24 ± 2.6 P<0.001	8.35 ± 1.95 P<0.01	12.19 ± 3.37 P<0.001	39.27 ± 8.34 N.S.	42.84 ± 6.95 P<0.01	0.50 ± 0.10 P<0.01	17.48 ± 4.3 P<0.01	0.83 ± 0.38 P<0.05
Deficiente en AGE (3er Repique)	0.56 ± 0.06 P<0.001	8.91 ± 0.91 P<0.001	10.16 ± 0.19 P<0.01	14.83 ± 0.40 P<0.001	34.77 ± 0.18 N.S.	42.06 ± 0.73 P<0.01	0.47 ± 0.02 P<0.01	22.00 ± 0.60 P<0.01	1.135 ± 0.005 P<0.05

Los datos corresponden al promedio de 3 animales. Los valores indican la media y desviación estandar. Probabilidad (P) está referida a los testigos. N.S. = No significativo. P.I = Poliinsaturados.

huéspedes con dieta normal. En absisas se han indicado los ácidos grasos de acuerdo a la nomenclatura bioquímica. A algunos de ellos no se les pudo identificar exactamente la familia a la que pertenecen a pesar de haber utilizado distintas longitudes de columnas y rellenos de cromatografía gas-líquido, los tiempos de retención relativos y gráficos logarítmicos de tiempo de retenciones vs. longitud de cadena, tal como se explicara en materiales y métodos. Un análisis por ozonólisis podría haber arrojado un resultado más específico sobre los distintos isómeros de posición de los ácidos grasos hallados, pero el objeto de esta parte del estudio apunta a determinar solamente si los animales habían sufrido algún cambio en la composición de ácidos grasos característico de un estado de deficiencia, en especial en el ácido linoléico y los pertenecientes a su familia.

En lo que respecta a las modificaciones en el valor porcentual de algunos ácidos grasos considerados claves en la deficiencia de A.G.E. se aprecia que la fracción de ácidos octadecenoicos (18:1) aumenta hasta un 100% respecto a un hígado de ratón alimentado con dieta normal (testigo), mientras que el ácido Δ^{5-8-11} eicosatrienoico (20:3 ω^9) prácticamente no es detectado en los lípidos de hígado normal apareciendo en la deficiencia de A.G.E. hasta en un 5% del porcentaje de ácidos grasos totales.

En cuanto a los ácidos grasos que denotan una marcada disminución porcentual, se puede decir que el ácido linoléico (18:2 ω^6) disminuye hasta un 72% respecto al testigo y el ácido araquidónico (20:4 ω^4) decrece alrededor del 60% en la deficiencia de A.G.E.

En trabajos recientes Holman (101) presenta parámetros que evalúan la deficiencia de ácidos grasos esenciales. Este autor los considera de utilidad para diagnosticar un estado de deficiencia.

La tabla II muestra algunos de esos parámetros correspondientes a los hígados de los ratones huéspedes, calculados en base a los porcentajes hallados para cada uno de los ácidos grasos.

Se pueden apreciar cambios significativos en los parámetros que tienen en cuenta los porcentajes de los metabolitos ω^6 del hígado del animal con dieta deficiente, respecto del control. El total de ácidos ω^6 que incluye a los metabolitos ω^6 y al ácido linoléico, presenta una modificación similar. En cuanto al total de ácidos poliinsaturados existe una diferencia significativa en los animales deficientes, en concordancia con los datos anteriormente descriptos.

Los parámetros citados demuestran, una disminución en el contenido de ácidos polietilénicos derivados del ácido linoléico, pero, por el contrario, hay un aumento significativo de los ácidos monoetilénicos con una aparente tendencia a compensar la disminución de los primeros; a pesar de ello el índice de dobles ligaduras tiende a ser significativamente menor en la deficiencia. - Esto concuerda con los resultados de Rahm y col. (161).

La relación $20:3 \omega^9 / 20:4 \omega^6$ muestra el estado característico de deficiencia en los animales mantenidos con dieta deficiente en A.G.E. Holman y col. (101) toman el valor 0,4 en esta relación como punto de referencia para considerar un estado de deficiencia; aquí se lo ha superado, es decir el ácido $20:3 \omega^9$ proveniente del ácido oleico ($18:1 \omega^9$) surge como ácido compensador -- junto con los ácidos octadecenoicos y hexadecenoicos en procura de mantener la relación de ácidos saturados a no saturados. Por último, los ácidos grasos saturados no manifiestan cambios significativos en la deficiencia.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante el estudio de los parámetros propuestos, se llegó a la conclusión de que los animales sometidos a una dieta deficiente en A.G.E. presentaban un cuadro de composición de ácidos grasos característico de esa deficiencia.

C) Composición de los Ácidos Grasos de Lípidos de células de Sarcoma 180:

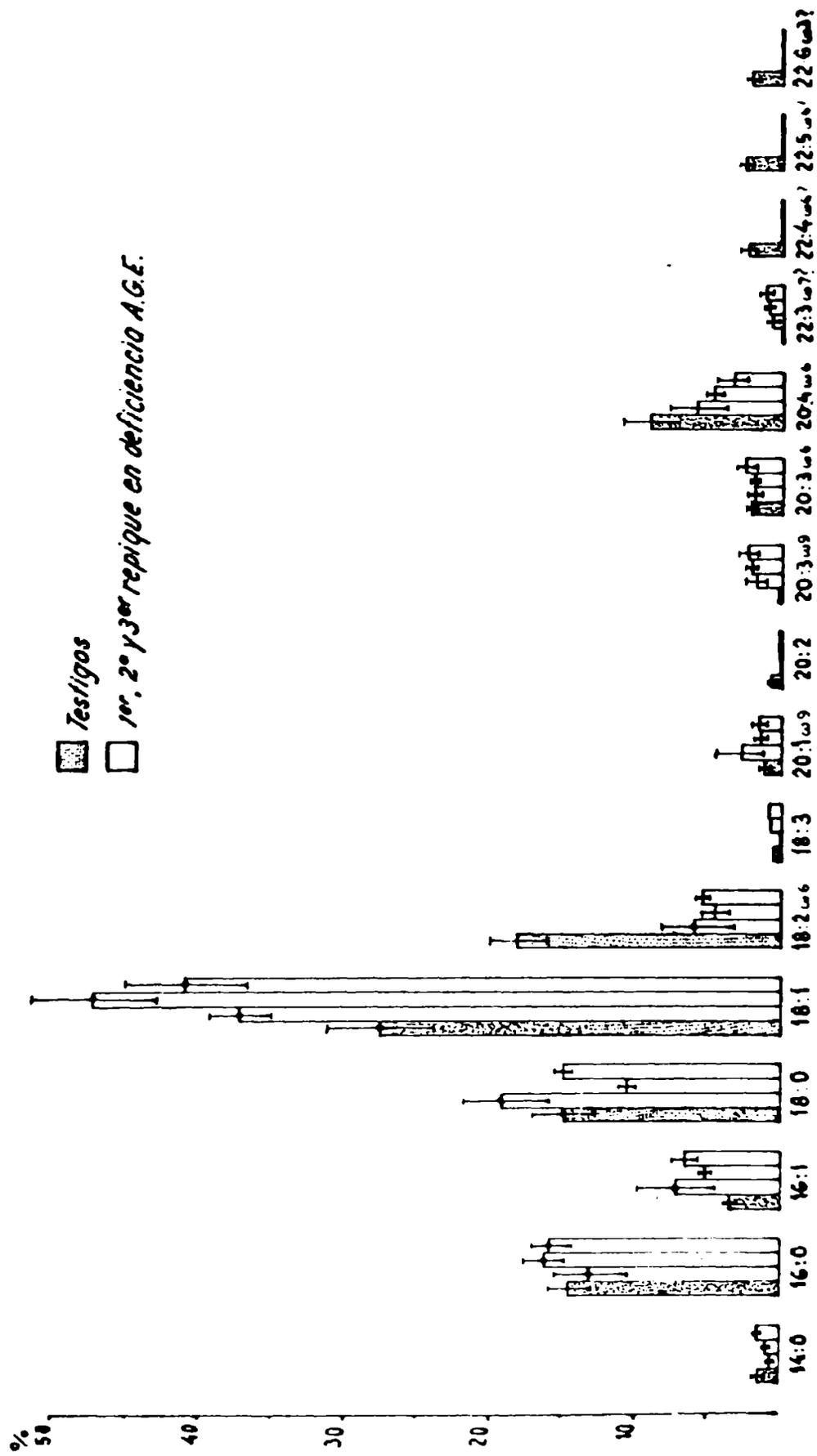
Las células de Sarcoma 180 ascítico desarrolladas en los animales anteriormente estudiados fueron extraídas de la cavidad peritoneal en cada uno de los repiques según se describe en el esquema de trabajo experimental. Los lípidos de las células ascíticas fueron interesterificados, y al igual que los ésteres metílicos hepáticos, se analizaron por C.G.L. Los valores porcentuales de cada uno de ellos se aprecian en la Fig. 9. Aquí se utilizó el mismo código de barras, es decir las punteadas para los ácidos grasos de células mantenidas en animales con dieta testigo y las blancas para las células ascíticas desarrolladas en los ratones con dietas deficientes en AGE a través de los 3 repiques.

Como se observa en la figura, los valores porcentuales de los ácidos grasos de células testigos son diferentes a los estudiados en el hígado del animal huésped.

Aquí se plantea la pregunta que surge - cuando se trabaja con este tipo de neoplasias y aún en aquellas cuyo origen es perfectamente conocido ¿Cuál es el tejido que puede usarse como control?

Según R. Wood (162) las actividades metabólicas de un tejido normal son la suma de un total de actividades de varios tipos celulares que constituyen el tejido. Un cambio en la proporción de los tipos celulares, que comúnmente ocurren cuando el tumor se adapta al trasplante, deja al tejido normal inapto para el control, pues éste no puede ser usado para distinguir entre diferencias en las actividades metabólicas debido a los cambios en la proporción de los tipos celulares y aquellas diferencias que deben ser atribuídas a la neoplasia. Con estas consideraciones "in mente" éste autor elige al hígado, por ser uno de los tejidos más utilizados en los estudios del metabolismo lipídico, para analizar en él

Composición porcentual de ácidos grasos de lípidos totales de células de sarcoma 180 ascítico.



los mismos detalles que en el carcinoma ascítico de Ehrlich con propósitos de comparación general. Si bien reconoce que no se trata de un "control" ideal, el cotejar los resultados hallados en el hígado y en las células tumorales puede revelar alguna anomalía en la estructura y metabolismo de lípidos de las células ascíticas en estudio.

En esta parte del estudio se pretende detectar si la célula tumoral sufrió modificaciones similares al hígado huésped cuando se la desarrollaba en animales que se consideraron deficientes en A.G.E.

Son de destacar los valores elevados de los ácidos octadecenoicos en la célula desarrollada en animales con dieta testigo.

Distintos autores analizando la composición de ácidos grasos en un número apreciable de células normales y tumorales han mostrado que el contenido celular de ácidos octadecenoicos está aumentado en células transformadas; y éste incremento parece estar relacionado con dicha transformación (163) que sufren las células al convertirse en células cancerosas (40, 111, 164, 166).

Wennerstrom y col. trabajando en células de Hepatoma de Novikoff encuentran que el ácido 18:1 se acumula en las células tumorales al ser captado preformado del medio circundante (167).

Wood y col. estudiando fosfatidiletanolamina de una serie de tumores de rata y ratón considera que el elevado porcentaje de 18:1 hallado en esos tumores sería una característica de las neoplasias, lo que bien podría servir como diagnóstico de las mismas (114).

Hasta el momento poco se sabe sobre el metabolismo del 18:1 en la célula cancerosa así como su significado fisiológico y efecto en el crecimiento tumoral.

En el trabajo aquí presentado se detecta un aumento del orden de 67.6% de los ácidos octadecenoicos y de un 40% en ácidos hexadecenoicos en las células ascíticas desarrolladas en animales con dietas deficientes en A.G.E. respecto a las células mantenidas en ratones con dieta testigo. Se denota una tendencia a aumentar los valores medios a partir del 2do. y 3er. repique en deficiencia. Existe un aumento de aproximadamente un 696% en el ácido eicosatrienoico ($20:3 \omega^9$) respecto a los valores testigo con una disminución de un 62.4% del ácido araquidónico ($20:4 \omega^6$) y de un 75% del ácido linoléico ($18:2 \omega^6$). Los ácidos polietilénicos de la familia ω^6 presentan una marcada disminución en la deficiencia.

Los parámetros de la evaluación de la deficiencia fueron calculados en las células ascíticas, en una forma similar a lo realizado con los datos obtenidos de los ácidos grasos hepáticos.

La tabla III muestra tales parámetros; a través de ellos se puede apreciar que los metabolitos ω^6 tienen una notable disminución que se acentúa a medida que se incrementa el número de repiques en animales con deficiencia. El total de ácidos ω^6 llega a descender significativamente hasta un tercio de los valores testigos y concomitantemente los ácidos poliinsaturados -- disminuyen aproximadamente la mitad.

Los ácidos monoenoicos muestran un aumento importante en los repiques efectuados en animales deficientes pero como sucede con los hígados huéspedes ese aumento no alcanza a mantener constante el índice de dobles ligaduras.

Por su parte los porcentajes de ácidos saturados no sufren modificaciones significativas.

Si se analizan los parámetros que relacionan a los ácidos $18:2 \omega^6$, $20:3 \omega^9$ y $20:4 \omega^6$ se puede apreciar la diferencia que existe entre los valores correspondientes a las células ascíticas controles respecto al hígado huésped. Esa diferencia es provocada fundamentalmente por el menor contenido porcentual del ácido $20:4 \omega^6$ en las células tumorales en estudio.

Parámetros de evaluación de la deficiencia de ácidos grasos esenciales en células de Sarcoma 180 ascítico.

Células de S-180 desarrolladas en animales:	$\frac{20:3\omega^3}{20:4\omega^6}$	$\frac{18:2\omega^6+20:4\omega^6}{20:3\omega^3}$	Metabolitos ω^6	Total de ácidos ω^6	Ácidos Saturados	Ácidos Monoeno	$\frac{18:2\omega^6}{20:4\omega^6}$	Total de ácidos P.I.	Índice de dobles ligaduras
Testigo	0.03 ± 0.01	26.9 ± 2.3	15.2 ± 2.8	33.4 ± 2.1	30.3 ± 3.6	32.4 ± 5.0	2.1 ± 0.6	35.3 ± 1.2	1.40 ± 0.02
Deficiente en AGE (1 ^{er} Repique)	0.29 ± 0.10 P < 0.01	9.3 ± 1.8 P < 0.001	7.1 ± 2.0 P < 0.01	13.2 ± 4.3 P < 0.001	34.9 ± 2.5 N.S.	47.8 ± 5.0 P < 0.01	1.0 ± 0.6 N.S.	15.4 ± 5.0 P < 0.001	0.94 ± 0.09 P < 0.001
Deficiente en AGE (2 ^{er} Repique)	0.48 ± 0.01 P < 0.001	7.0 ± 2.1 P < 0.001	6.9 ± 1.4 P < 0.01	10.3 ± 1.7 P < 0.01	28.0 ± 1.0 N.S.	53.3 ± 1.7 P < 0.01	0.9 ± 0.2 N.S.	16.5 ± 3.0 P < 0.001	1.05 ± 0.14 P < 0.01
Deficiente en AGE (3 ^{er} Repique)	0.67 ± 0.11 P < 0.001	6.8 ± 0.2 P < 0.001	5.0 ± 1.9 P < 0.01	10.5 ± 1.6 P < 0.01	32.6 ± 2.3 N.S.	49.5 ± 3.8 P < 0.01	1.7 ± 0.8 N.S.	14.5 ± 5.0 P < 0.001	0.91 ± 0.08 P < 0.001

Los datos corresponden al promedio de 3 animales. Los valores indican la media y desviación estandar. Probabilidad (P) está referida a los testigos. N.S. = No significativo - P.I.: Polinsaturados.

En lo que respecta a las células ascíticas repicadas en animales deficientes, los índices mencionados dan una dieta del estado de deficiencia, en particular la razón 20:3 ω^9 /20:4 ω^6 que supera el valor de 0.4 propuesto por Holman.

Por lo expuesto se puede decir que las células ascíticas del Sarcoma 180 acusan una importante modificación en la composición de ácidos grasos como consecuencia de sus repiques en animales con dietas deficientes en A.G.E. Esa modificación es aproximadamente del mismo orden que en los hígados de animales huéspedes. Por otra parte, no se observa una diferencia significativa en el estado de deficiencia entre las células de diferentes repiques; es como si las células ascíticas tomaran un nuevo patrón de composición en ácidos grasos que no lo alteran, a pesar de ser mantenidos en animales deficientes por más de 600 horas cumpliendo aproximadamente 15 generaciones celulares.

Este análisis del comportamiento de las células tumorales del Sarcoma 180 hizo que se probara la capacidad de la célula ascítica para restaurar su composición primitiva en ácidos grasos. Para ello se tomaron células de Sarcoma 180 obtenidas del tercer repique en animales deficientes y se inocularon a ratones alimentados con dieta normal. De este experimento se obtuvieron los siguientes porcentajes de ácidos grasos de lípidos totales:

Acido Graso	Porcentaje de ácidos grasos	
	Huésped Deficiente en A.G.E. (3er. repique)	Huésped Normal
14:0	1.3	2.1
16:0	17	17.1
16:1	6	2.5
18:0	15.1	20.6
18:1	40.4	22.2
18:2 ω^6	5.3	23.9
20:1	0.4	0.4
20:3 ω^9	2.9	0.8
20:3 ω^6	0.4	1
20:4 ω^6	5.0	7.4

Esta tabla muestra claramente el poder de adaptación que tiene la célula del Sarcoma 180 ascítico ante los cambios de composición en ácidos grasos producidos por distintas dietas. Esto contribuye a sostener lo propuesto por distintos laboratorios acerca de la dependencia de las células tumorales para la composición de ácidos grasos del animal que las soporta. Liepkalns y col. (155), trabajando en carcinoma ascítico de Ehrlich demuestran que éste tumor altera marcadamente la composición en ácidos grasos cuando se modifica la dieta de los ratones huéspedes. Esas alteraciones se detectan no sólo en las células enteras sino que también en las membranas de las fracciones subcelulares de los mismos (168).

Bailey y col (116) estudiando el Sarcoma 180 y el carcinoma ascítico de Ehrlich sublinea hipotetraploide estiman que cuando los grasos son excluidos de la dieta del animal -- huésped se produce un cambio en la composición de los lípidos de la sangre y tejidos. Ese cambio se verá reflejado en las alteraciones observadas en la composición de ácidos grasos de las células tumorales desarrolladas en los citados animales.

A. Spettor (169) sugiere que un porcentaje importante del requerimiento de ácidos grasos por las células ascíticas de Ehrlich es provisto por el huésped y que la mayor parte de éstos ácidos grasos son aportados al tumor como ácidos grasos libres. Por su parte Baker y col. (170) utilizando carcinoma de Ehrlich-Lettre coinciden al suponer que el transporte de ácidos grasos libres de la sangre al tumor puede abastecerlo en sus necesidades para el crecimiento neto y para sus requerimientos energéticos.

Otros autores consideran que la velocidad de síntesis "de novo" de lípidos en tumores de crecimiento rápido es muy -- lenta para satisfacer su demanda por lo que deben tomarlos preformados del animal huésped. (171)

Existen excepciones tal como ocurre con el hepatoma 9121 (172) de Morris, las células HTC que derivan del hepatoma 7288C de Morris (173) y un tumor inducido por el virus Rous sarcoma.

D) Presencia de ácido Cis-Vaccénico (18:1 Δ^1) en la fracción de ácidos octadecenoicos

Distintos laboratorios (111,163-164) han demostrado la presencia de altos niveles de ácido "oléico" en lípidos de neoplasmas, pero ninguno de ellos ha establecido la composición de los isómeros del ácido 18:1. R. Wood y col. en 1974 (174-175) fueron uno de los primeros en caracterizar la composición en isómeros de ácidos monoenoicos en tejidos neoplásicos. Estos autores consideraron que los elevados valores de "ácido oléico" observados en lípidos de muchos tumores no se debían exclusivamente a dicho ácido sino que contribuía significativamente en el porcentaje de la fracción de octadecenoicos, el isómero 18:1 Δ^{11} , vaccénico. Estudios posteriores (114) sobre la composición de isómeros de los ácidos octadecenoicos en triglicéridos, fosfatidil colina y fosfatidiletanolamina de una variedad de tumores de rata y ratón demostraron - que estos tres tipos de lípidos contenían 75% de oléico (18:1 ω^9) y 25% de ácido vaccénico (18:1 ω^7) completando el balance.

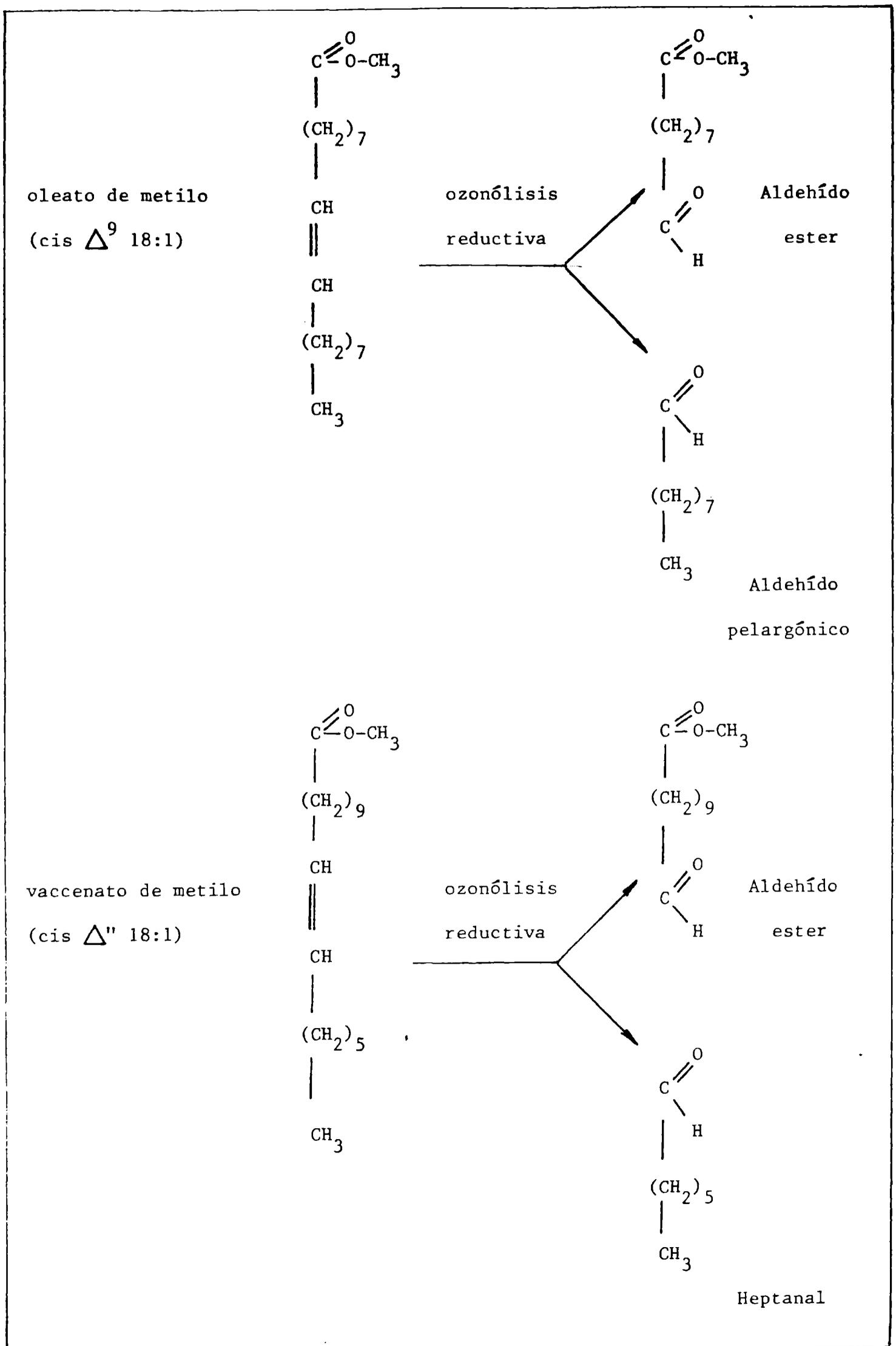
Otros trabajos realizados en hepatomas (176) y en hígado huésped de ratas alimentadas con dieta carente de grasas, revelaron que dicha alimentación no producía cambios en la proporción en que se encuentran los isómeros de 16:1, 18:1 y 20:1 en ningún tipo de lípido, ya fuera del hígado huésped como del hapatoma. Tampoco en el hígado normal se detectaron modificaciones. En todos los casos se tomó como referencia animales con dieta normal.

Por su parte Spence (177) ha demostrado que la composición de isómeros de los ácidos 18:1 de los lípidos totales de riñón, pulmón, cerebro y grasa lumbar de ratas es relativamente invariable ante una alimentación libre de grasas por un término de 17-20 semanas.

Para realizar éstos estudios de isomería de posición de los ácidos octadecenoicos se utilizan, por lo general, técnicas de ozonólisis reductiva.

En el presente trabajo en células de Sarcoma - 180 se empleó la ozonólisis reductiva con trifenilfosfina propuesto por Beroza y Bierl. Mediante ésta técnica, detallada en materiales y métodos, los ésteres metílicos de los ácidos octadecenoicos son transformados en aldehídos y aldehídos ésteres según muestra el siguiente esquema de la - Figura 10.

Figura 10 — .



Los octadecenoatos de metilo fueron separados - del resto de los ésteres de ácidos grasos de lípidos totales por cromatografía en capa delgada de sílica gel G/NO₃Ag. Se eluyeron de la sílica - gel y se cromatografiaron por C.G.L. para determinar la pureza de la fracción. El cromatograma obtenido indica un 98,4% de pureza según muestra la figura (11). El 16% restante correspondería a los demás ácidos monoetilenicos.

Una vez aislados los ésteres metílicos de los - ácidos 18:1 se ozonizaron, pasando de inmediato los productos de reacción por C.G.L. Se utilizaron aldehídos standard y se calculó el porcentaje de cada pico por el método de triangulación. La figura (12) muestra los - cromatogramas obtenidos. Ramachandran y col. (178) consideran que es más - exacto utilizar el área total de los aldehídos y aldehídos esterés productos de la reacción, en lugar del área de una de las sustancias. Esta forma de cálculo compensaría las diferencias en el peso molecular y en consecuencia la respuesta del detector para cada fragmento. Como en el presente trabajo los productos de la ozonólisis no diferían notablemente en sus pesos moleculares y al comprobar que los valores porcentuales de los isómeros de los ácidos 18:1 obtenidos, eran similares a los hallados por otros laboratorios en un número apreciable de tumores de ratón (114), se procedió a calcular solamente las áreas de los aldehídos heptanal y nonanal. Otros autores (174-175 y 179) han utilizado únicamente las áreas de los aldehídos esterés para el estudio de la isomería de los ácidos octadecenoicos.

Los porcentajes de ácido oléico y vaccénico en la fracción de ácidos octadecenoicos de lípidos totales de células de Sarcoma 180 desarrollados en animales con dieta testigo se muestra en la tabla: IV

TABLA IV

ACIDO	Porcentaje en la fracción de ácidos octadecenoicos	Porcentaje en Lípidos totales
Vaccénico (18:1 Δ^{11})	11.2	1.67
oléico (18:1 Δ^9)	88.7	13.30

Los valores corresponden a un pool de Lípidos totales de células de Sarcoma 180 ascítico desarrollados en 3 ratones testigos.

Figura 11: Cromatograma gas-Líquido de la fracción de esteres metílicos de ácidos 18:1 después de haber sido separados de los esteres metílicos de ácidos grasos de Lípidos totales de células de Sarcoma-180.

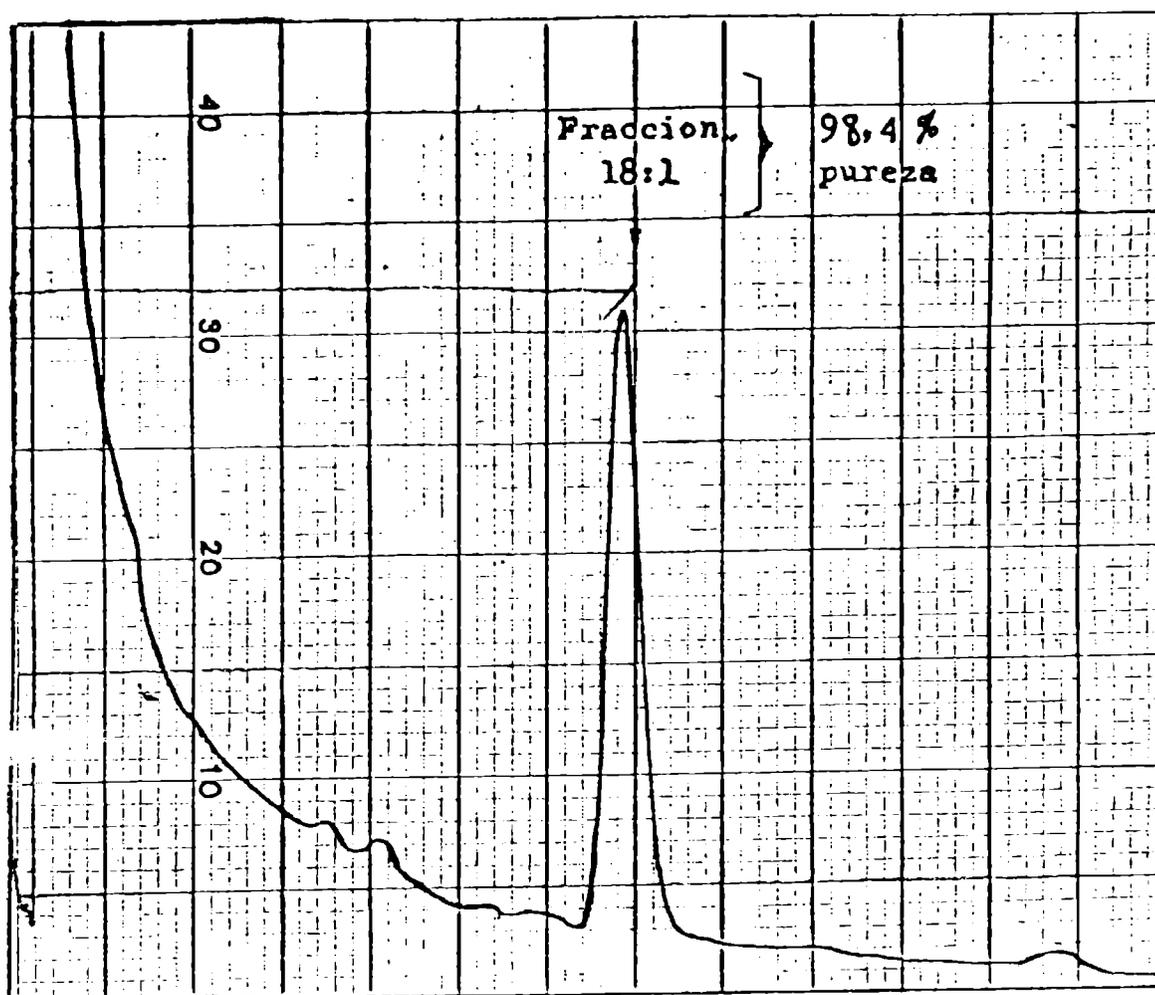
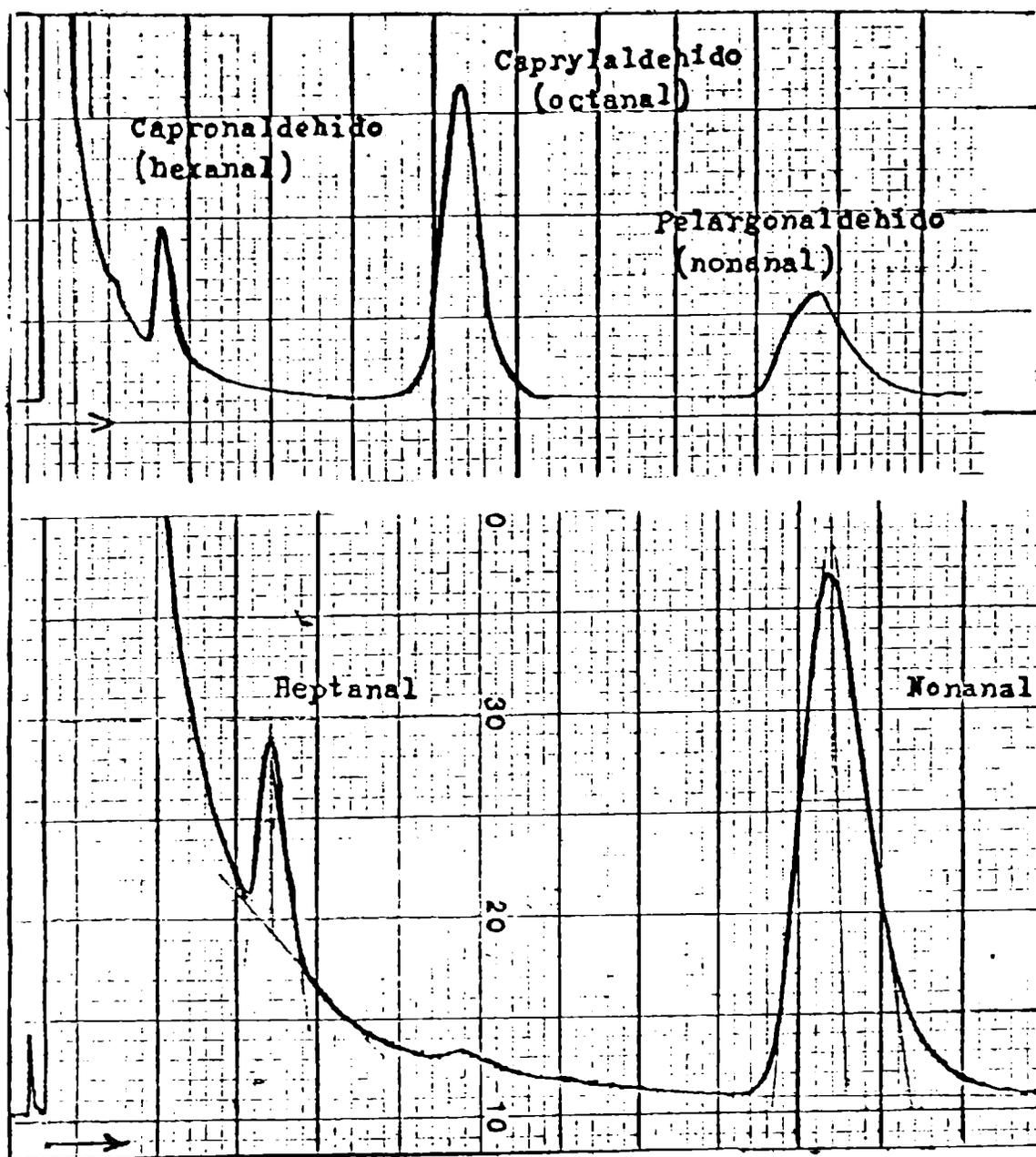


Figura 12: Cromatograma gas-líquido de los aldehídos producto de la ozonólisis de los ácidos octadecenóicos de células de Sarcoma-180



cromatograma de los aldehídos standars

cromatograma de los aldehídos obtenidos por ozonólisis de ácidos 18:1

Aquí se ha supuesto que el ácido vaccénico que se analiza corresponde a la estereosomería "cis", a pesar de que no se hicieron los estudios configuracionales correspondientes. Wiegand y col. (175) consideran que proponer la isomería "cis" para el ácido vaccénico hallado en tumores de mamíferos no es algo muy alejado de la realidad ya que el ácido vaccénico de mitocondrias de hígado de rata (14), de tejido adiposo de rata (28) y más aún de varios microorganismos, en el que suele ser el mayor constituyente y el único ácido graso de 18 carbonos insaturados (180) corresponden al isómero geométrico "cis".

Los isómeros de posición de los ácidos octadecenoicos de células de Sarcoma 180 mantenidos en ratones con dieta deficiente en A.G.E. no se analizaron por ozonólisis. De acuerdo a lo hallado por distintos autores (175,177) en tumores y tejidos normales el incremento de los ácidos 18:1 en la deficiencia se debería al aumento no sólo del ácido oléico sino también del ácido vaccénico.

En lo que respecta a los ácidos hexadecenoicos (16:1), trabajos de reciente publicación (181) muestran la variedad de isómeros de posición de dichos ácidos hallados en un tumor de ratón; por ésta razón en las figuras de composición de ácidos grasos que aquí se presentan no se ha indicado la isomería o familia a la que pertenecen los ácidos 16:1 pues implicaría un estudio centrado exclusivamente en ellos.

E) Determinación de la desaturación de los ácidos palmítico, esteárico y linoléico en células ascíticas de Sarcoma 180.

Como se explicará en la introducción, los sistemas de desaturación de ácidos grasos pueden estar influenciados por la alimentación del animal (54,57,182-183), sobre el que se hace el estudio como así también por estados patológicos tal como el cáncer (41-42).

Trabajos realizados en éste laboratorio en microsomas de hepatoma de Novikoff, en hepatoma de crecimiento rápido SSlK y de crecimiento lento SSlH demostraron una correlación entre el bajo contenido de araquidónico y la baja actividad de Δ^6 desaturasa, también se comprobó que la poca actividad detectada "in vitro" de la Δ^9 y Δ^6 desaturasas era independiente de la división celular en los tejidos malignos (39-40). Por otra parte, al estudiar enzimas de la cadena transportadora de electrones del sistema de Δ^9 desaturasa se dedujo que la baja capacidad de desaturar del tejido tumoral estaba localizada a nivel de la enzima desaturante propiamente dicha (41).

Morton y col. (42) corroboran estos resultados - estudiando los sistemas de Δ^9 , Δ^6 y Δ^5 desaturasas de hepatomas 7777 - de Morris hallándolos disminuidos en un 42, 39 y 4% respectivamente, cuando se toma como referencia al hígado normal.

Ookhtens y col. (184) en estudios realizados "in vivo" con el carcinoma ascítico de Ehrlich-Lettré hiperdiploide, no hallaron desaturación del ácido plamítico o ácido palmitoléico por acción de la Δ^9 desaturasa, en tanto que Lambremnt y col. (179) demuestran la falta de actividad de Δ^6 desaturasa sobre los ácidos linoléico y linolénico en fibroblastos transformados L-M, lo que conduciría a que dichos ácidos quedaran como dienos y trienos después de incorporarse en las membranas. Estos estudios se apoyaban en los resultados dados por Dumbar y col. (185) cuando estudiaron en un número apreciable de células diploides y heteroploides transformadas la desaturación del ácido linoléico. Estos autores consideraban que existía pérdida o modificación del sistema de Δ^6 desaturasa en las células transformadas de mamíferos.

En lo que respecta al efecto de las dietas sobre los sistemas de desaturación, se ha demostrado que la dieta deficiente en A.G.E. produce un aumento de la actividad de la Δ^9 desaturasa en hígado de rata (67), mientras que la Δ^6 desaturasa no acusa una modificación notable en tales condiciones (67) de deficiencia, pero con dietas totalmente libres de grasa se produce un incremento en la actividad (48,77).

e₁) En base a estos datos se pretendió detectar la actividad de la Δ^6 desaturasa en células de Sarcoma-180 desarrolladas en animales testigos, para compararla con las células ascíticas mantenidas en animales deficientes en A.G.E. En este modelo de trabajo se encontrarían presentes los dos factores que influyen en los mencionados sistemas enzimáticos: la deficiencia en A.G.E. y el cáncer.

Como se explicara en materiales y métodos y en el esquema de trabajo experimental, se incubaron células ascíticas obtenidas de cada uno de los tres repiques en animales deficientes con ácido linoléico C^{14} durante 1 hora. Paralelamente se trabajó con células tumorales desarrolladas en animales alimentados con dieta normal.

Concluida la incubación se extrajeron los lípidos de las células y se interestificaron. Los ester^{er}es metílicos radiactivos se analizaron por radiocromatografía gas-líquido. Este método por su limitada sensibilidad no permitió hallar ningún valor detectable de desaturación tanto en las células en deficiencia como en las controles. Se recurrió entonces a cromatografía en capa delgada de sílica gel G/NO₃ Ag con

el propósito de verificar el resultado hallado por la radiocromatografía. Por esta técnica se detectó un 1.68% de conversión de 18:2 ω^6 a 18:3 ω^6 , pero al comparar con una serie de standards puros empleando cantidades crecientes de linoléico C^{14} y, desarrollados en la misma placa, se vio que a medida que la radiactividad sembrada era menor, quedaba un "reguero" de radioactividad en la zona correspondiente al 18:3 ω^6 , del orden de 1.5% respecto a la radiactividad total. Este resultado hizo descartar como valedero el de 1.68% de desaturación hallado en las células del Sarcoma-180. Por último se recurrió al sistema de detección propuesto por Merle y col. (139) de cromatografía gas-líquido con detector de ionización de llama y viales con papel de filtro embebido en Hyamina. El detalle de esta técnica fue descrito en el párrafo correspondiente a detección de material radioactivos en la sección de materiales y métodos.

Para aprobar la eficiencia de este sistema para recolectar el $^{14}CO_2$ en el detector, producto de la combustión de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, se utilizó una muestra que contenía una proporción conocida de ácidos linoléico C^{14} y γ -linoléico C^{14} con una radioactividad de 10.000 cpm.

El conteo por centelleo líquido de los viales -- que contenían la Hyamina y el $^{14}CO_2$, demostró que se había recuperado un 70% de la radiactividad inyectada y que se mantenía la proporción de los ácidos de la muestra cromatografiada; todos los conteos se realizaron con un standard externo de Cs^{137} para controlar el "quenching" producido por la Hyamina. Los 100 μ l de hidróxido de Hyamina que embebían el papel de filtro de los viales producía cambios en el valor del standard externo, pero dentro de márgenes aceptables y en todas las mediciones con una igual magnitud.

Al contar con un método mucho más sensible que los anteriormente empleados, se hizo un cromatograma con recolección de radioactividad del ácido linoléico C^{14} utilizado en las incubaciones, con el propósito de determinar impurezas radioactivas o si quedaban "coñas" de radioactividad en la columna una vez que eluía el éster metílico en estudio. Todas estas pruebas fueron favorables para adoptar el método en las determinaciones de desaturación.

A pesar de haber encontrado una técnica más sensible, la desaturación del 18:2 ω^6 en las células del Sarcoma-180 arrojó valores prácticamente despreciables (entre 0.5 y 1%). Estos resultados se obtuvieron tanto en las células desarrolladas en animales testigos como en las deficientes: es decir el tumor desde un principio no presentó capa

Distribución Porcentual de la Radiactividad en Acidos Grasos, después de incubar 1 hora las células de Sarcoma 180 ascítico con:

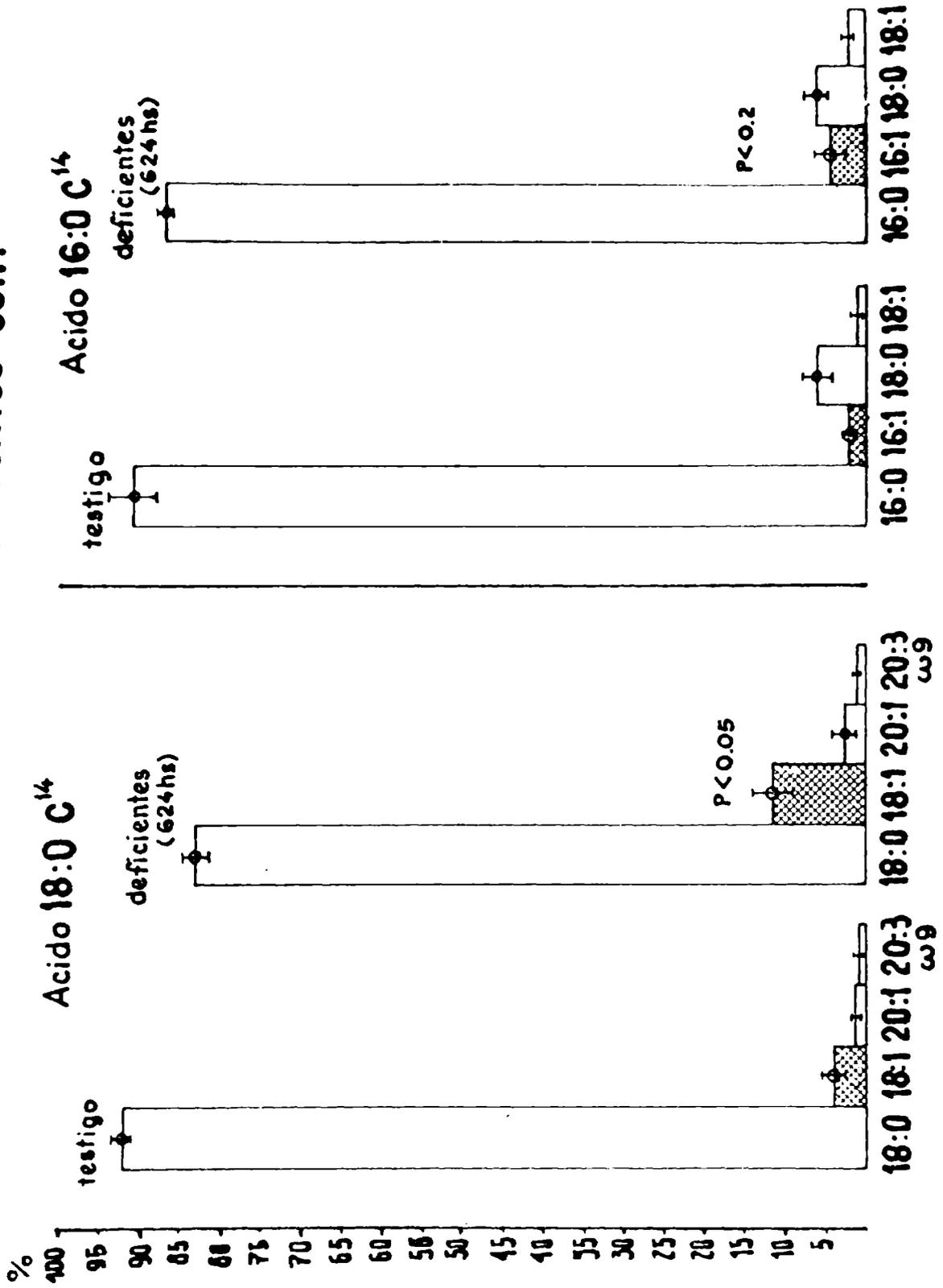


Figura 13

cidad de desaturación del ácido linoléico y el estado de deficiencia no alteró esa condición.

e₂) Cuando se estudió la desaturación de los ácidos esteárico y palmítico en las células del Sarcoma-180 utilizando la técnica de recolección de ¹⁴CO₂ con Hyamina pudieron obtenerse los valores porcentuales que muestra la figura 13.

Por la sensibilidad de la técnica se pudo recoger la radioactividad correspondiente a los ácidos monoetilénicos producto de la desaturación de los ácidos palmítico y estárico como así también los ácidos que resultan de la elongación de los primeros.

Como se puede apreciar, la célula ascítica demuestra capacidad de desaturar el ácido esteárico llevándolo a ácido oléico pero también es capaz de producir ácidos eicocenoico (20:1) y eicosatriénoico (20:3 Δ^9), siguiendo posiblemente los pasos de elongación-desaturación descriptos en la introducción.

Las células desarrolladas en animales deficientes (3er repique) manifiestan una tendencia a aumentar la síntesis de ácido 18:1 lo que estaría en concordancia con los resultados hallados en hepatocitos, los que responden ante la deficiencia en A.G.E. con un aumento de la actividad de la Δ^9 desaturasa. Las células tumorales estudiadas acusarían las modificaciones metabólicas (al menos a nivel de la Δ^9 desaturasa) características de la deficiencia en A.G.E.

En la misma figura se han volcado los resultados correspondientes a la incubación de las células tumorales con ácido palmítico C¹⁴. Se puede apreciar que no hay una diferencia significativa entre las células controles y las mantenidas en deficiencia, pero lo importante es destacar que se ha podido hallar una capacidad de desaturar y elongar el ácido palmítico en ambos tipos de células. Si a este resultado se le suma el obtenido por la incubación con el ácido esteárico, se tendría que el Sarcoma-180 ascítico presenta sistemas de desaturación y elongación de ácidos saturados.

R. Wood (162) considera que el carcinoma ascítico de Ehrlich, sería un modelo de estudio del metabolismo de ácidos monoenoicos sin un sistema de desaturasa y ésto sería concordante con los resultados de Ookhtens y col. (184) que no detectaron "in vivo" desaturación del ácido palmítico en células de Ehrlich-Lettré. Si bien en esta tesis se ha estudiado el Sarcoma-180 ascítico y los autores mencionados han analizado el carcinoma de Ehrlich, queda abierta la posibilidad de utilizar -

la técnica de detección de radioactividad aquí expuesta para verificar si estos tumores de crecimiento rápido presentan sistemas de desaturación. De todas maneras los valores bajos de conversión de ácidos saturados a monoetilénicos no alcanzarían a satisfacer las necesidades de las células ascíticas por los ácidos monoetilénicos por lo que deberían tomarlos preformados del huésped. (109).

En estudios realizados en Sarcoma-180, previos a los aquí presentados, se marcaron "in vivo" células ascíticas con una relación conocida de ácidos esteárico C^{14} y oléico C^{14} . Se extrajeron las células radioactivas y se reinyectaron en nuevos ratones. Se vio que la proporción de la radiactividad entre los ácidos en las células tumorales, se mantenía a través de 96 horas, disminuyendo solo la radiactividad total. Este resultado supondría una metabolización con igual velocidad del ácido saturado y monoetilénico en las células ascíticas. Aún considerando que la célula tumoral pudiera sintetizar "de novo" ácidos grasos a una velocidad compatible con el turn-over de los mismos, la baja capacidad de síntesis de ácidos monoetilénicos indicaría que deben tomarlos preformados del huésped.

Para cerciorarse que el plasma ascítico, es decir el medio donde ésta inmersa la célula tumoral, contenía los ácidos grasos requeridos, se realizó en esa oportunidad un análisis de los lípidos del mismo extrayéndolos por el método de Folch, interestificándolos y cromatografiándolos por C.G.L. La tabla V muestra que los porcentajes de cada ácido graso son similares a los hallados en las células de Sarcoma 180 y en los hígados huéspedes, por lo que podrían perfectamente cubrir las necesidades de la célula tumoral.

Los experimentos y consideraciones anteriormente planteados se ven sustentados por los estudios de Spector y col. (109) - que demostraron la capacidad que tienen las células del carcinoma ascítico de Ehrlich para utilizar los ácidos grasos del líquido ascítico. Este autor estudió además la composición de ácidos grasos del plasma ascítico, encontrando en las cromatografías, un perfil muy similar al que presentan las células tumorales inmersas en él.

TABLA V

Composición porcentual de ácidos grasos de plasma ascítico de células de Sarcoma 180 desarrolladas en animales testigos.

ACIDO GRASO	ACIDO GRASO %		
14:0	1.0	±	0.3 (1)
16:0	22.9	±	3.1
16:1	1.6	±	0.5
18:0	17.5	±	1.2
18:1	14.9	±	1.9
18:2	27.6	±	2.1
20:4	15.2	±	3.2

(1) Los valores representan la media de tres muestras individuales ± la derivación standard.

F) Incorporación de ácido linoléico 1 C^{14} en fosfolípidos y lípidos neutros de células ascíticas de Sarcoma 180.

Después de haber extraído los lípidos de las células ascíticas del Sarcoma-180 que se incubaron durante 3,5 y 10 minutos con el radiolinoléico, se procedió a separar la fracción de lípidos neutros y fosfolípidos por columna de ácido silícico (materiales y métodos)-tomando alícuotas de cada uno de ellos se determinó la radioactividad por centelleo líquido pudiendo entonces diagramar la figura 14 . En ésta se pretende mostrar la diferencia detectada en la incorporación del radiolinoléico en lípidos neutros respecto de fosfolípidos. Se puede apreciar -- que la radioactividad hallada en los fosfolípidos de las células controles como en las mantenidas en deficiencia es prácticamente despreciable -- frente al gran porcentaje ^{de} radioactividad detectada en los lípidos neutros. Se ve además que el tiempo de incubación no ha afectado esa incorporación selectiva en lípidos no polares. En experimentos previos al aquí presentado, se trabajó "in vivo", inoculando $18:2\ \omega^6\ \text{C}^{14}$ en la cavidad peritoneal

Incorporación del ácido linoleico $1C^{14}$ en lípidos neutros y fosfolípidos de S-180 a distintos tiempos de incubación.

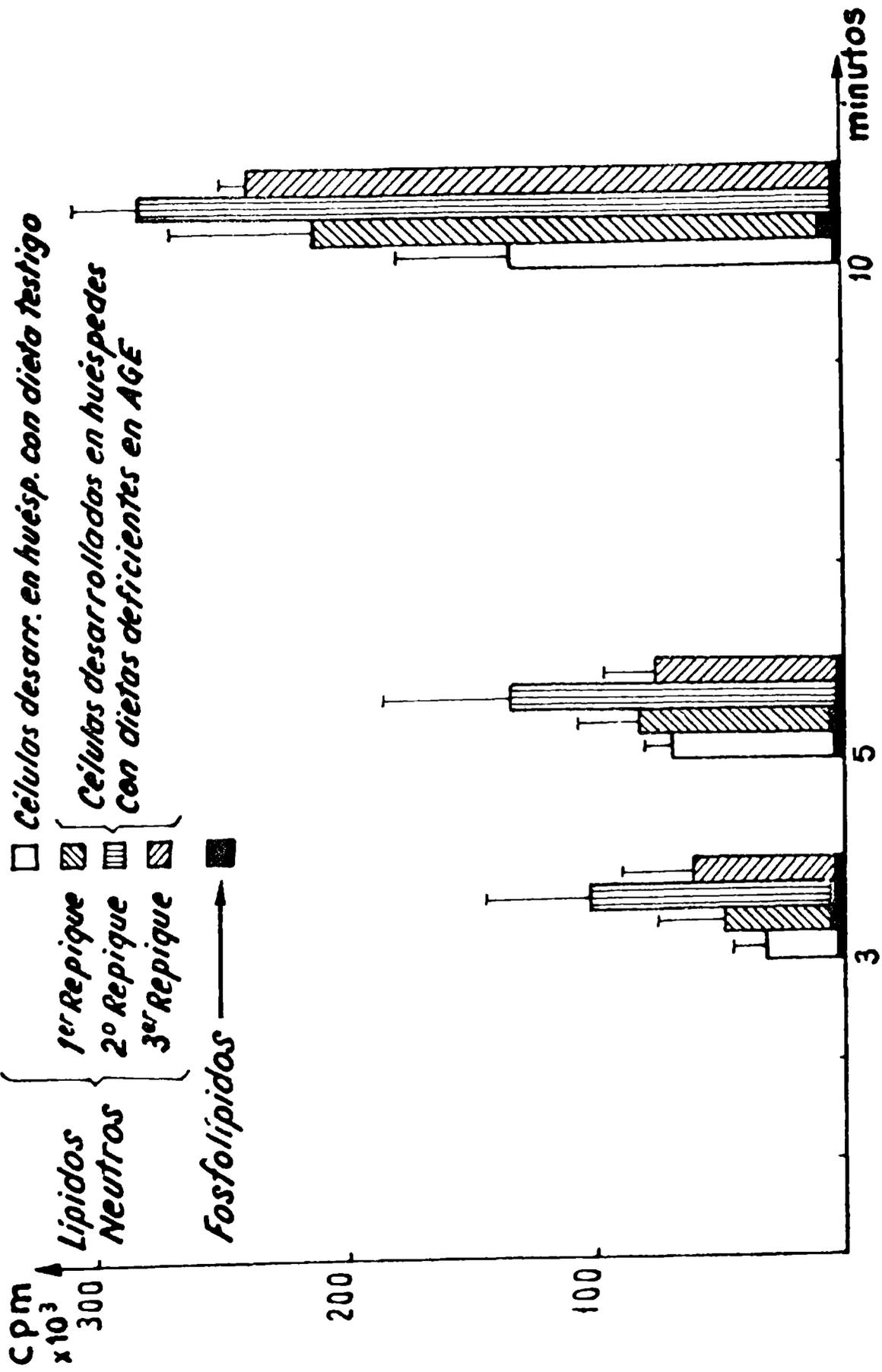


Figura 14

de ratones portadores del Sarcoma-180 ascítico alimentados con dieta normal. En esa oportunidad se pudo apreciar que la radioactividad, también, se incorporaba en más de un 90% en la fracción de lípidos neutros, cuando los mismos se analizaban a los 30 y 60 minutos después de haber inyectado el ácido radiactivo.

Analizando ahora particularmente la incorporación de la radioactividad en lípidos neutros en las células testigos y las mantenidas en animales deficientes, se puede apreciar que existiría una diferencia significativa en las células del 2do y 3er repique respecto de los controles incubados durante 10 minutos, mientras que las diferencias no serían de significación en tiempos menores, quizás por la dispersión que presentaron los resultados pero habría una tendencia a ser mayor los valores medios de las células deficientes.

La incorporación aparentemente mayor del ácido C^{14} linoléico en célula las deficientes y sobre todo en aquellas que se desarrollan por 2da y 3era vez en animales deficientes, se debería a la menor dilución en el pool de linoleil-CoA por deficiente en A.G.E. lo que aumentaría la radioactividad específica de C^{14} linoleil-CoA que se va a incorporar. Es decir, existiría un fenómeno de dilución de radioactividad y no de mayor incorporación del $18:2 \omega^6$ en las células deficientes(186).

Es de destacar el particular comportamiento de las células del Sarcoma-180 desarrollado en animales deficientes en A.G.E., al incorporar el ácido $1C^{14}$ linoléico fundamentalmente en lípidos neutros, ya que trabajos de De Tomás y col. (186) demuestran la incorporación selectiva del radiolinoléico en la fracción de fosfolípidos hepáticos cuando se inyecta dicho ácido por vía portal en rata deficiente en A.G.E., mientras que en ratas normales, el C^{14} 18:2 se incorpora preferentemente en la porción de triglicéridos. En esos trabajos se sugería la existencia de un --turn-over aumentado del ácido linoléico en las moléculas de fosfolípidos de las ratas deficientes utilizándose una vía de deacilación-reacilación. También se pueden citar los estudios de A. Spector (169) en carcinoma ascítico de Ehrlich. Este autor inyectando por vía intraperitoneal ácido C^{14} linoléico a ratones normales que soportan dicho tumor, demuestra que el 75% de la radioactividad se halla en fosfolípidos y el 25% restante en ésteres de lípidos neutros.

LIPIDOS NEUTROS

PLACA DE SILICA GEL 0.05 mm
 SOLVENTE: ETER DE PETROLEO ETER ETILICO
 ACIDO ACETICO 80/20 v/v

REVELADO CON I₂

HIGADO	HIGADO	CELULAS	CELULAS
HUESPED	HUESPED	S 180	S 180
(dieta	dieta	dieta	dieta
restigo)	deficien-	deficien-	restigo
re AGE	re AGE		
			Incubadas
			10 min con
			18.2 x 10 ⁴

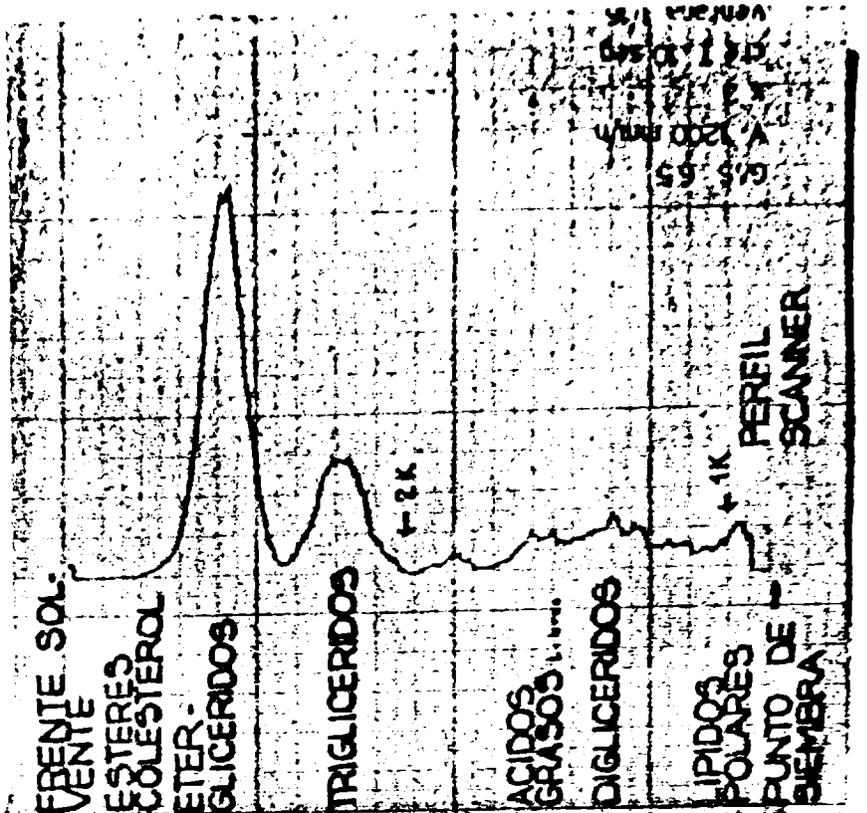
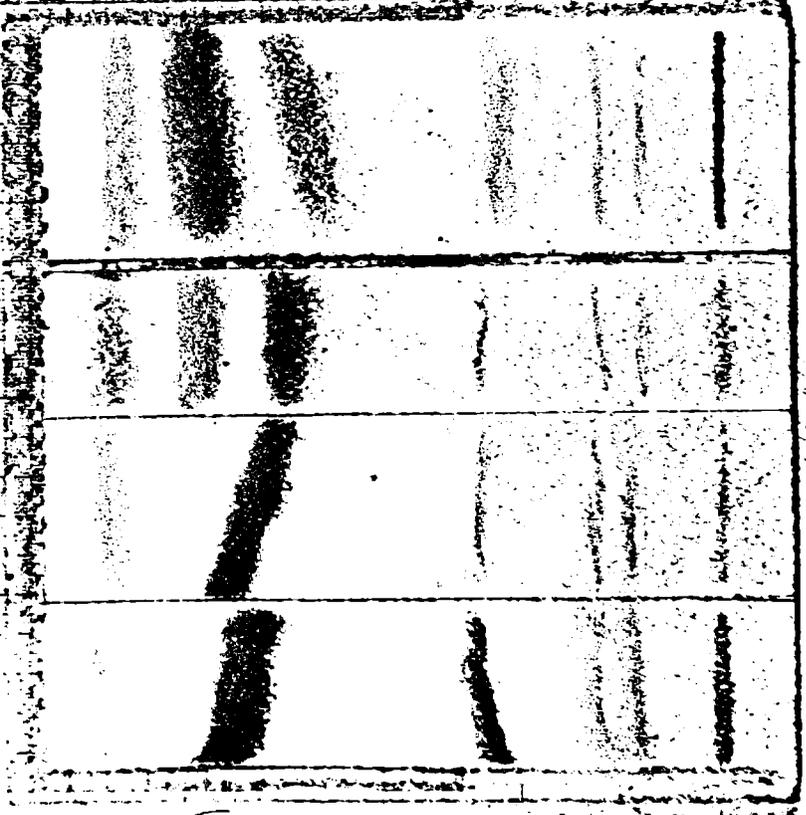


Figura 15:

- cromatograma tipo en capa delgada de Lípidos Neutros de células de Sarcoma-180 testigos y deficientes en A.G.E., y de hígados huéspedes.
- perfil de distribución de la radiactividad en lípidos neutros de células de Sarcoma-180 incubadas 10 minutos con C14 linoléico

G) Incorporación del ácido linoléico C^{14} en triglicéridos y eter-lípidos

Los lípidos neutros que incorporaron más de un 90% de la radiactividad cuando se incubaron las células de Sarcoma-180 con radiolinoleico, se analizaron por cromatografía en capa delgada de sílica gel G, detectándose la radioactividad por Scanner con contador proporcional 2π . La figura 15 muestra una cromatoplaaca tipo en la que se han sembrado lípidos neutros de hígados de ratones huéspedes mantenidos con dieta normal y deficientes en A.G.E., y también los correspondientes a células de Sarcoma-180 deficientes en A.G.E. y controles. Paralelamente se presenta un perfil de la radioactividad con una sensibilidad de 1 y 2 K. Se puede apreciar que los lípidos neutros de los dos hígados huéspedes no presentan una banda entre las correspondientes a esteres de colesterol y triglicéridos, mientras que en las células ascíticas aparece bien marcada una fracción que correspondería a los eter-lípidos: alquil diglicéridos y plasmalógenos neutros. La diferente intensidad de esta banda en los dos tipos de muestras celulares se debe a la distinta cantidad sembrada en la cromatoplaaca, por lo que no debe tomarse para una comparación cuantitativa.

Al estudiar la distribución de la radioactividad se observa que el radiolinoleico se encuentra en valores de un 70% en la banda de eter-lípidos en tanto que el 30% restante se detecta en la zona correspondiente a triglicéridos. Ante este tipo de cromatograma y perfil de radioactividad se procuró analizar la fracción que se suponía se trataba de eter-lípidos. Para ello se hicieron las siguientes determinaciones con sus correspondientes resultados:

1) análisis de colesterol: Se extrajeron de la sílica las zonas coincidentes con el frente del solvente y la siguiente inferior, con mezcla del Cl_3CH /Metanol 2:1 (V/V) a 40°C de acuerdo a lo expuesto en materiales y métodos. Una vez eluída las muestras se saponificaron con KOH alcohólico al 4% a 80°C 45 minutos. Del medio alcalino se extrajo el colesterol con eter de petróleo para analizarlo por el método de Zlatkis con $FeCl_3-H_2SO_4$ (187).

Por esta técnica se pudo determinar la cantidad de 330 n moles de colesterol en la mancha localizada junto al frente del solvente, es decir la que correspondería a ester de colesterol, mientras que en la zona siguiente (eter-lípidos) se detectaron sólo 60 n moles de la misma sustancia.

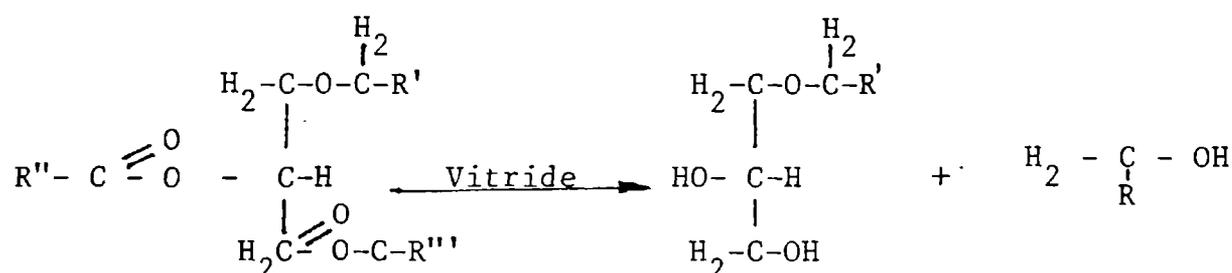
2) análisis por el reactivo dinitrofenil hidrazina, específico para plasmalógenos neutros (glicerilvinil éteres). Las bandas de eter-lípidos se rociaron con 2-4 dinitrofenil hidrazina 0.4% en HCl 2N. Con este reactivo se detecta la presencia de la unión vinil eter por liberación de aldehídos que dan una mancha amarillo-anaranjado cuando las placas son calentadas levemente (137).

Los resultados con las muestras en estudios se pueden considerar negativos.

3) análisis por espectroscopía de infrarrojo.

Con los supuestos eter-lípidos en estudio, se procedió de acuerdo a lo expuestos en materiales y métodos para su purificación en cromatografía. Acción del $\text{Na Al H}_2 (\text{OCH}_2 \text{CH}_2 \text{OCH}_3)_2$, Vitride:

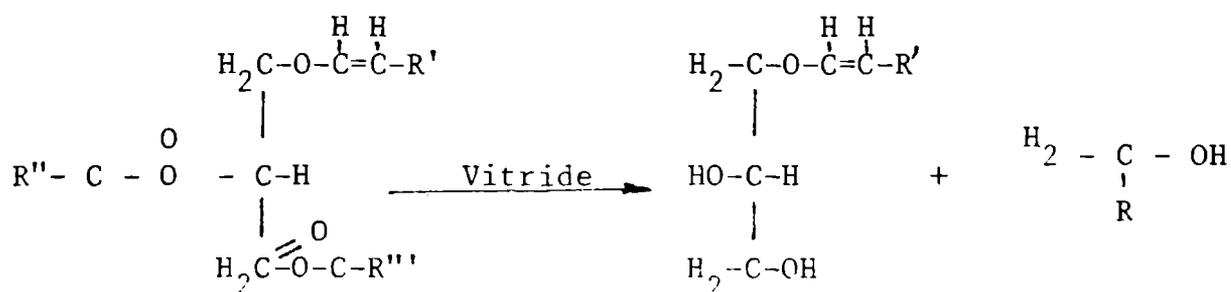
Este agente reductor produce la hidrogenólisis de las funciones esteres quedando la función eter según lo muestra el siguiente esquema (141-142):



Alquil diglicerido

1-alquil-sn-glicerol

Alcoholes grasos



plasmalógeno neutro

alq-1'-enil-1 glicerol

Alcoholes grasos

A los productos de la hidrogenólisis se los separó de acuerdo a lo explicado en materiales y métodos para realizar un estudio por espectroscopía de Infrarrojo. El espectro obtenido se muestra en la figura (16).

Baumann y col. (146) dan el valor de 1120 cm^{-1} para la banda de absorción en el espectro correspondiente a la función eter (C-O) en los 1-alquil-sn-glicerol. Esta banda puede observarse en el

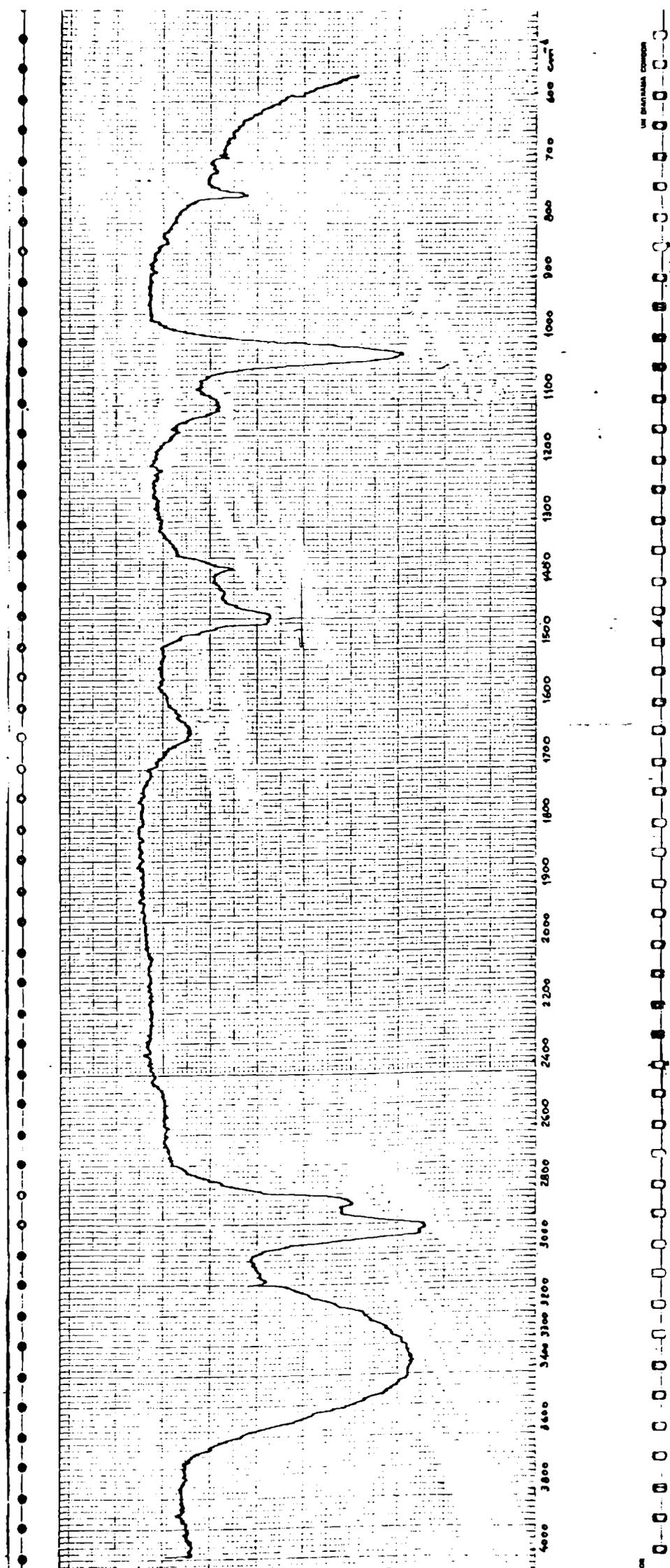


Figura 16: Espectro de Infrarrojo del producto de la hidrogenólisis de la sustancia correspondiente a la zona de éter-glicéridos en la cromatoplaca de Lípidos neutros de células de Sarcoma-180

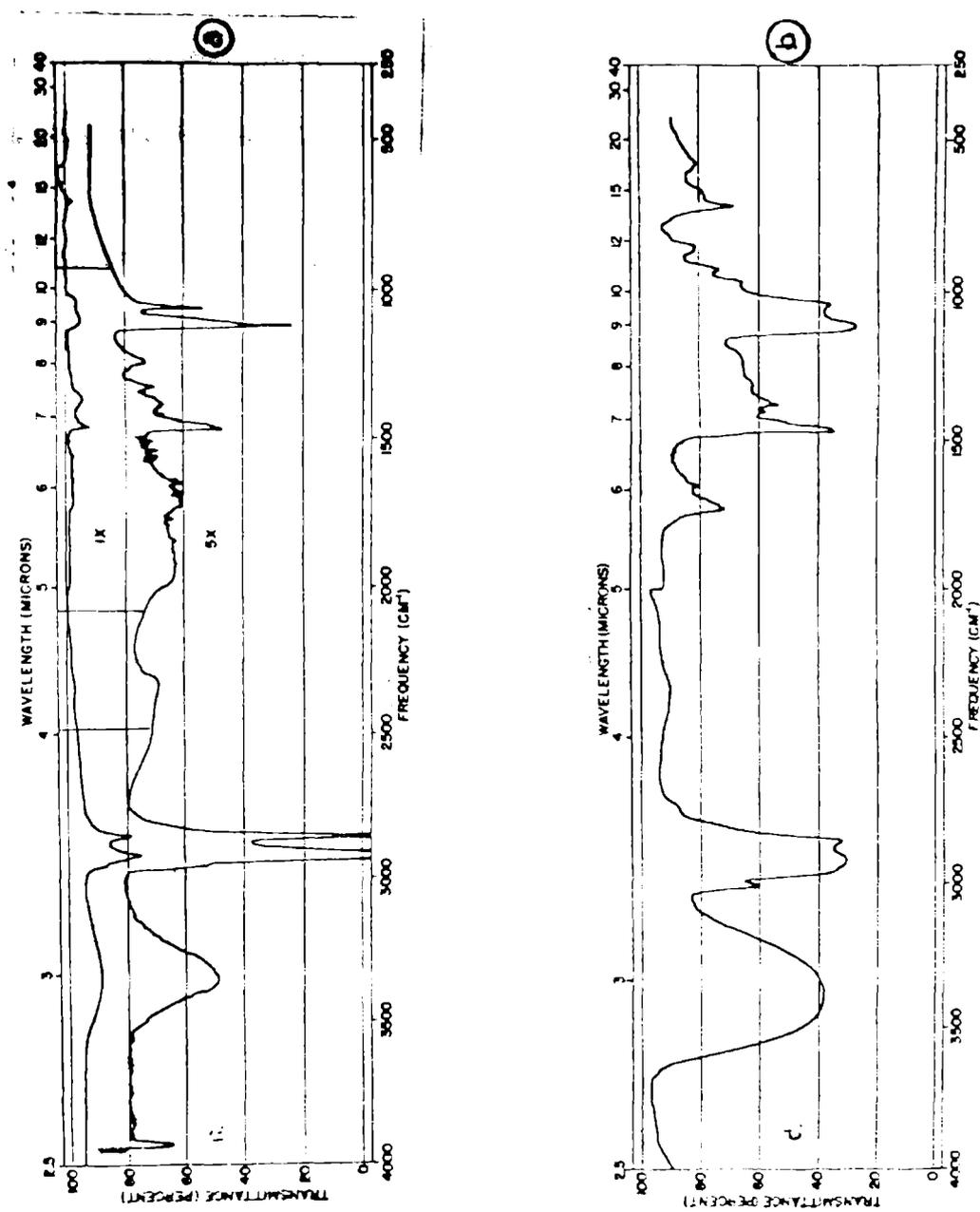


Figura 17: Espectro de Infrarrojo obtenido por Bollinger (188) de un alquil-diácil-glicérido, extraído de los lípidos neutros del carcinoma Walker 256 (a) y de un linfosarcoma humano (b).

espectro aquí presentado. Si se comparan los espectros de infrarrojo obtenidos por Bollinger (188) en carcinoma Walker 256 de rata y en un linfosarcoma humano, figura . 17, se puede ver la gran similitud que existe entre ellos y el de las células de Sarcoma-180 de la figura . 16 . Este autor identificó a la sustancia que produce el citado espectro de infrarrojo como un alquil-diacilglicérido.

Todos estos resultados conducen a suponer a la zona comprendida entre los triglicéridos y esteres de colesterol de las células de Sarcoma-180 como correspondiente a los alquil-diacil-glicéridos. - Esto se ve corroborado por el valor de RF (distancia recorrida por una sustancia respecto al frente del solvente en cromatografía en capa delgada) - obtenido en estos experimentos y los dados por distintos autores que analizan lípidos neutros de células neoplásicas en las mismas condiciones de -- trabajo. (162,189-190)

Por otra parte este tipo de lípido no polar ha sido hallado por distintos laboratorios en células tumorales desde que Bollinger observó su presencia en el carcinoma de Walker 256, en el Sarcoma de Fisher R 3259/96 A y carcinoma ascítico de Ehrlich (191).

Posteriormente Wood y Halow (192) demuestran la -- presencia de gliceril-eter-diésteres en 10 tumores de ratas y ratones. Más recientemente, Albert y col. (193) estudiando una cantidad importante de - tumores de cerebro humano encuentran hasta un 4.8% de alquil-diacil-glicéridos en el total de glicerolípidos. Fallani y col. (194) con sus trabajos en neoplasias contribuyen a confirmar los cambios característicos de los - lípidos hallados en tumores como son la baja cantidad de fosfolípidos, el - apreciable contenido de eter-lípidos y el incremento de ácidos monoenoicos.

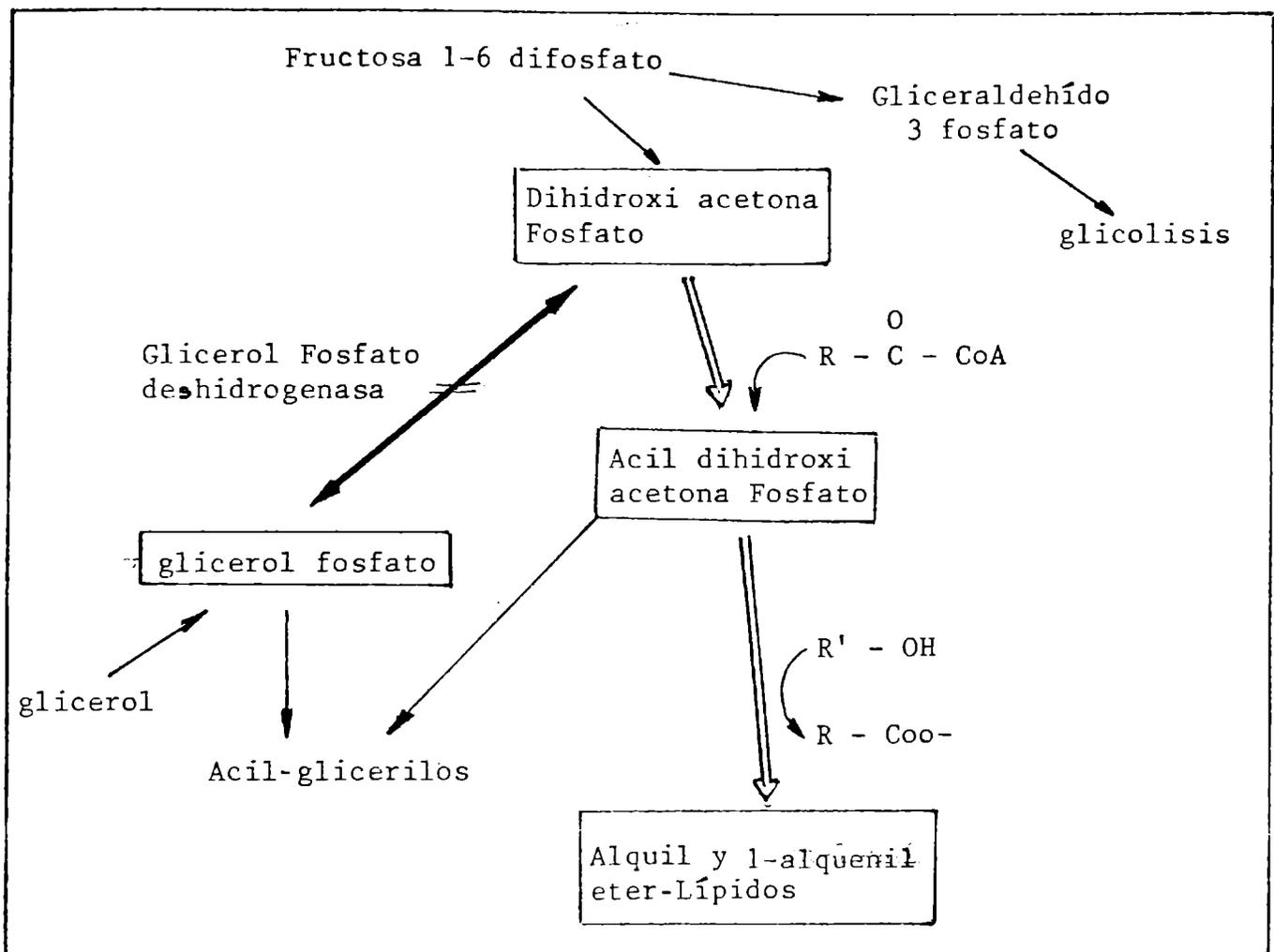
Snyder y col. (145) estudiando 13 tumores transplantables de ratón entre los que se encuentran el Sarcoma-180 y el carcinoma ascítico de Ehrlich demuestran que el porcentaje de gliceril eteres hallados en la fracción de lípidos neutros de los tejidos de rata normal(plasma, músculo, médula, hígado, bazo, corazón, riñón, cerebro y grasa perirrenal) (142), es muy bajo (0.2-0.5%) comparados con el de tumores de rata y - ratón (0.5-2.9%).

Los gliceril eter diesteres no son lípidos privados de las neoplasias ya que han sido aislados de aceites de pescado (195), tejido graso humano (196) y hasta en estómago de aves (197) pero parecería que en los tumores tendrían una importancia significativa.

Snyder (190) determinó que las estructuras hidrocarbonadas implicadas en la unión "O-alquil" consisten fundamentalmente en

16:0, 18:0 y 18:1, tanto en las células neoplásicas como en las normales. En la 2da posición del glicerol se ubican los ácidos poliinsaturados, -- mientras que en la 3era hay una disminución de la cantidad de ácidos poliinsaturados pero con una proporción algo mayor de ácido esteárico que en la segunda posición.

Se ha propuesto un esquema metabólico de posibles vías de entrada de los ácidos grasos para estructurar los eter-lípidos. - Howard y col. (198) son los autores de dicho esquema que se muestra a continuación:



Con este esquema metabólico "in mente" los autores mencionados estudiaron una serie de neoplasias de crecimiento rápido lo que les permitió detectar una relación inversa con los contenidos de glicerol fosfato deshidrogenasa y el incremento de eter-lípidos, asociado con una menor diferenciación celular y mayor crecimiento tumoral.

H) Incorporación de linoleico C^{14} en etergliceridos de células de Sarcoma-180 empleando distintos tiempos de incubación.

Como se explicara en el párrafo "G" los lípidos

neutros radioactivos de las células de Sarcoma-180 mantenidas en animales deficientes en A.G.E. y en controles, se analizan por cromatografía en ca pa delgada y lectura de radioactividad por Scanner. La figura 18 muestra los perfiles de distribución de la radioactividad tipo, a los 3,5 y 10 minutos de incubación del ácido linoléico C^{14} con células de Sarcoma-180 testigos. Los resultados demuestran que con solo 3 minutos de incubación se detecta una incorporación casi exclusiva en eter-gliceridos. A medida que transcurre el tiempo, la radioactividad se distribuye tanto en eter-gliceridos como en trigliceridos, pero siempre con mayor porcentaje en los primeros.

En la figura (19) se presentan los resultados hallados en las células de Sarcoma-180 mantenidas en animales deficientes en A.G.E. Los perfiles de distribución de radioactividad a través de los distintos tiempos de incubación son muy similares a los de las células - controles.

En las figuras (20) y (21) se observan más detalladamente los valores promedios y desviación standard de la radioactividad hallados en eter-gliceridos, trigliceridos y digliceridos de células de Sarcoma-180 controles y los correspondientes al 1er, 2do y 3er repique en animales deficientes en A.G.E. En todos los casos aquí presentados se reconoce una incorporación del ácido linoléico C^{14} en la fracción de eter-gliceridos en los tiempos de incubación cortos, mientras que en los trigliceridos prácticamente empieza a detectarse la radioactividad a partir de los 5 minutos incrementándose a los 10 minutos pero no con la velocidad -- que lo hacen los eter-gliceridos. Los digliceridos en general mantienen constante su radioactividad incorporada con una tendencia a aumentarla en tiempos mayores.

Existen diferencias en las velocidades de incorporación del radiolinoleico en eter-gliceridos entre las células ascíticas controles y las deficientes de 1ero y 2do repique. En el gráfico D de la figura (21) correspondiente a las células de Sarcoma-180 del tercer repique muestra curvas cuyas pendientes son similares a las obtenidas con las células ascíticas testigo. Parecería, como si las células que han sido mantenidas por varios repiques en animales deficientes se comportaran como células desarrolladas en ratones normales después de un período de adaptación a esta nueva condición.

Un estudio con mayor número de repiques en animales deficientes en A.G.E. permitiría determinar si esta adecuación al medio se mantiene en períodos mayores de deficiencia y si en esas circunstan

Figura 18: Perfil de radiactividad detectada en placa de cromatografía en capa delgada de Silica gel-G de Lípidos Neutros de célula de Sarcoma-180 controles incubadas 3, 5 y 10 minutos con ácido linoléico C^{14} .
Detección con Scanner Berthold II

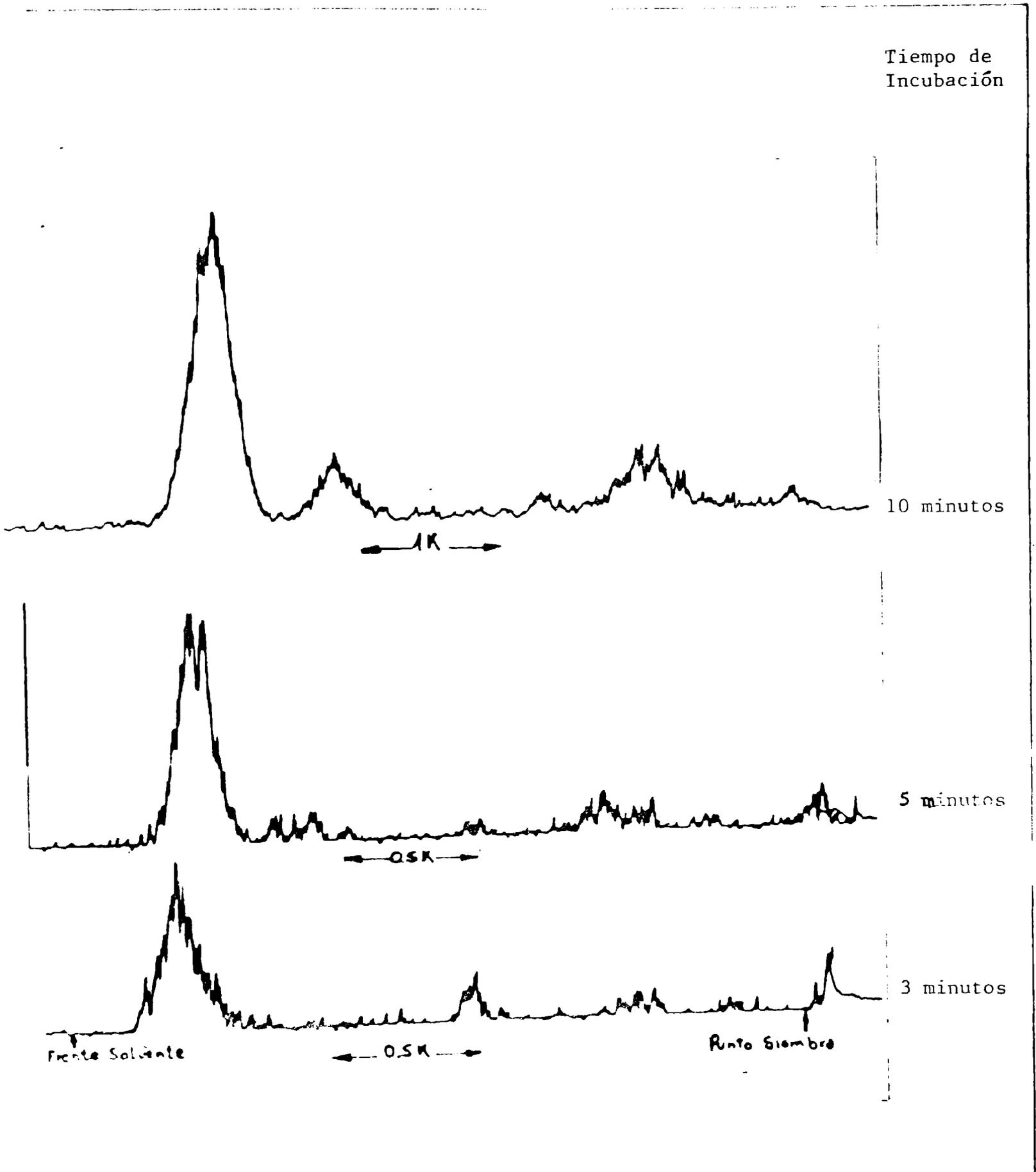
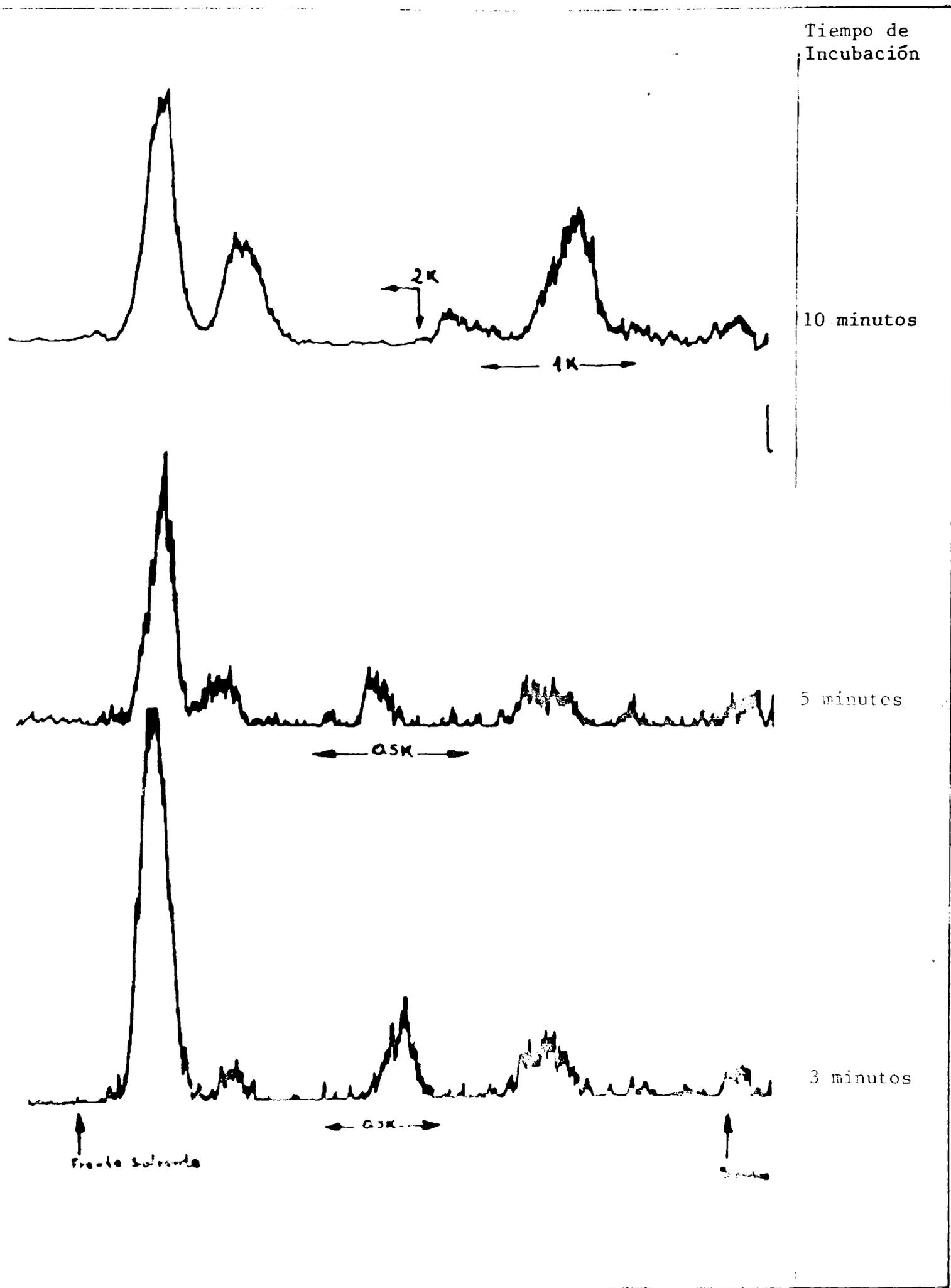


Figura 19: Perfil de radiactividad detectada en placa de cromatografía en capa delgada de sílica gel-G de lípidos Neutros de células de Sarcoma-180 deficientes en A.G.E., incubadas 3, 5 y 10 minutos con ácido linoléico C^{14} .
Detección con Scanner Berthold II



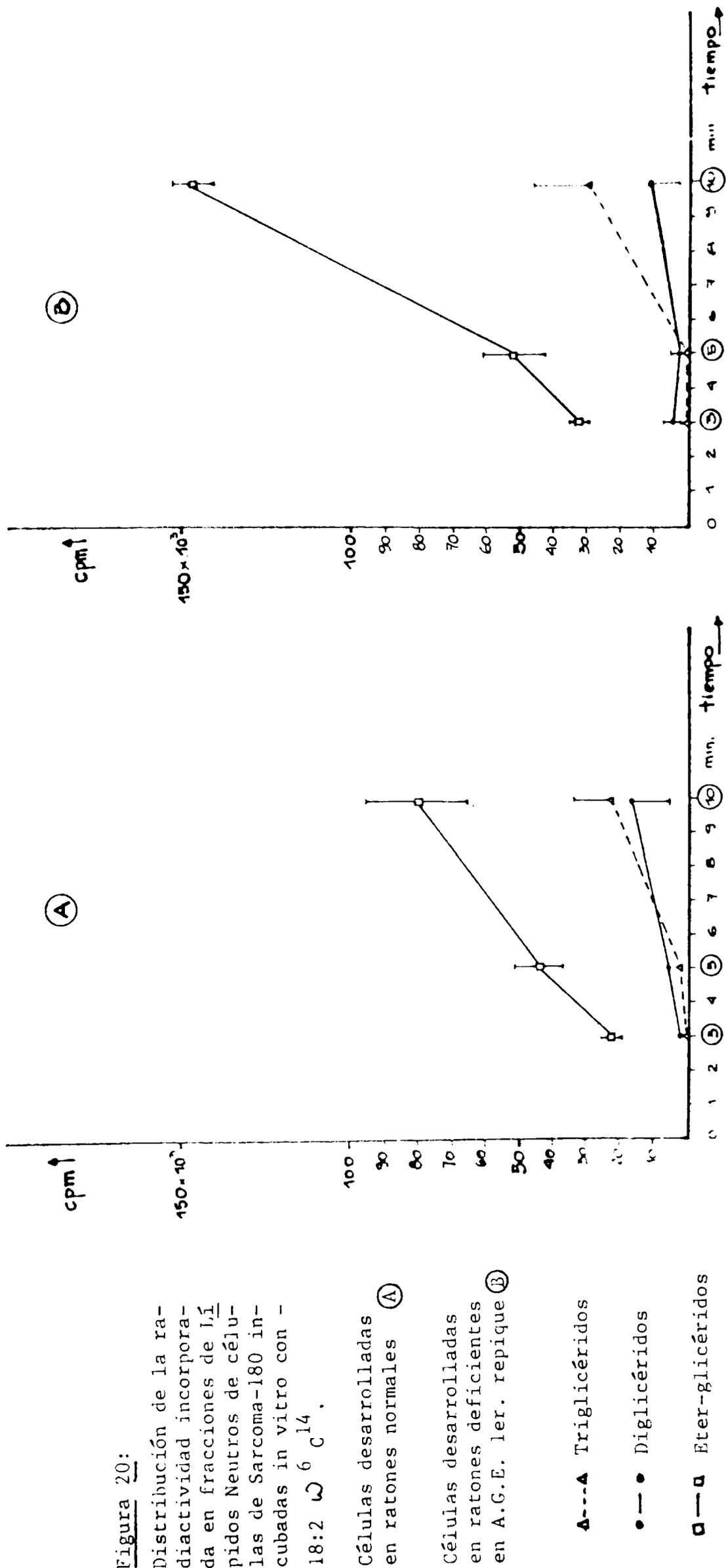


Figura 20:

Distribución de la radioactividad incorporada en fracciones de lípidos Neutros de células de Sarcoma-180 incubadas in vitro con ^{14}C 18:2 ω 6.

A Células desarrolladas en ratones normales

B Células desarrolladas en ratones deficientes en A.G.E. 1er. repique

▲---▲ Triglicéridos

●---● Diglicéridos

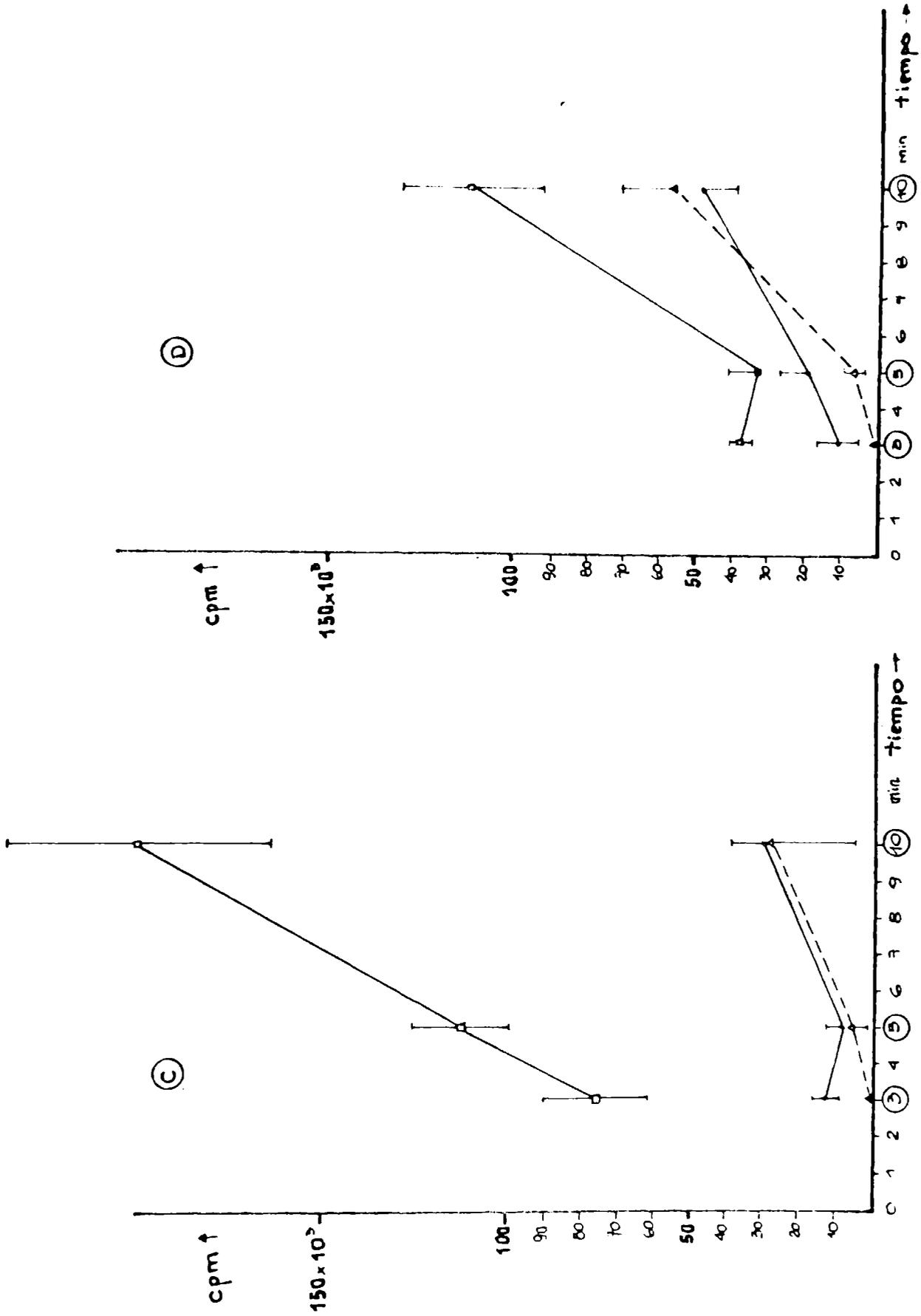
□---□ Eter-glicéridos

Figura 21:

Distribución de la radiac-
tividad incorporada en frac-
ciones de Lípidos Neutros -
de células de Sarcoma-180
ascítico incubadas in vitro
con $18:2 \omega^6 C^{14}$

Células desarrolladas en ra-
tones deficientes en A.G.E.
2do repique . (C)
3er repique . (D)

- ▲---▲ Triglicéridos
- Diglicéridos
- Eterglicéridos



cias adquiere las características metabólicas de las células controles pero con composición lipídica distinta.

Diversos autores han dado sus opiniones sobre la función de estos eter-gliceridos en las células tumorales basándose en los datos hasta ahora publicados. Se ha sugerido que el elevado contenido de eteres-glicéridos hallados en células malignas está fundamentada en el incremento de precursores cuya presencia indica la falla de otro sistema, antes que el de cumplir con un propósito específico (162), también se ha postulado que los altos valores de diacil-gliceril-eter detectados en neoplasias sería un reflejo del "estado de reducción" de las células tumorales ya que los alcoholes grasos, encontrados en tumores (199) y los eteres glicéridos requieren para su síntesis de la transferencia de hidrógeno -- vía NADPH. Según Snyder (190) todo esto conduciría a considerar a los altos niveles de alquil glicerolípidos como "marcadores" de los tumores malignos. Por su parte Howard y col. (198) proponen que estos eter-lípidos tendrían relación con la diferenciación y la adaptación, asociada con un incremento de la capacidad del tumor para crecer.

Por lo expuesto se deduce la necesidad de nuevas investigaciones para determinar la real función de los eter-lípidos.

Aparentemente deben cumplir algún rol de importancia en las células tumorales puesto que han incorporado selectivamente un ácido graso esencial frente a las otras fracciones lipídicas que lo han hecho más lentamente.

I) Determinación del tiempo de duplicación celular en células ascíticas de Sarcoma-180 mantenidas en ratones deficientes en A.G.E.

La figura 22 demuestra que el tiempo de duplicación celular de las células ascíticas del Sarcoma-180 mantenidas en ratones deficientes en A.G.E. no presentan diferencias significativas respecto al valor de 36.4 ± 2.1 horas correspondiente a las células tumorales mantenidas en ratones normales.

Es de destacar que prácticamente, se han cumplido más de 15 generaciones celulares si se consideran las 650 horas transcurridas desde el primer repique en animales deficientes, sin que ello haya alterado significativamente la velocidad de multiplicación celular. Sin embargo se aprecia una tendencia a incrementar el tiempo de duplicación recién en el tercer repique.

Tiempo de Duplicación Celular de Sarcoma 180 desarrollado en huéspedes alimentados con dietas deficientes en ácidos grasos esenciales y dieta normal.

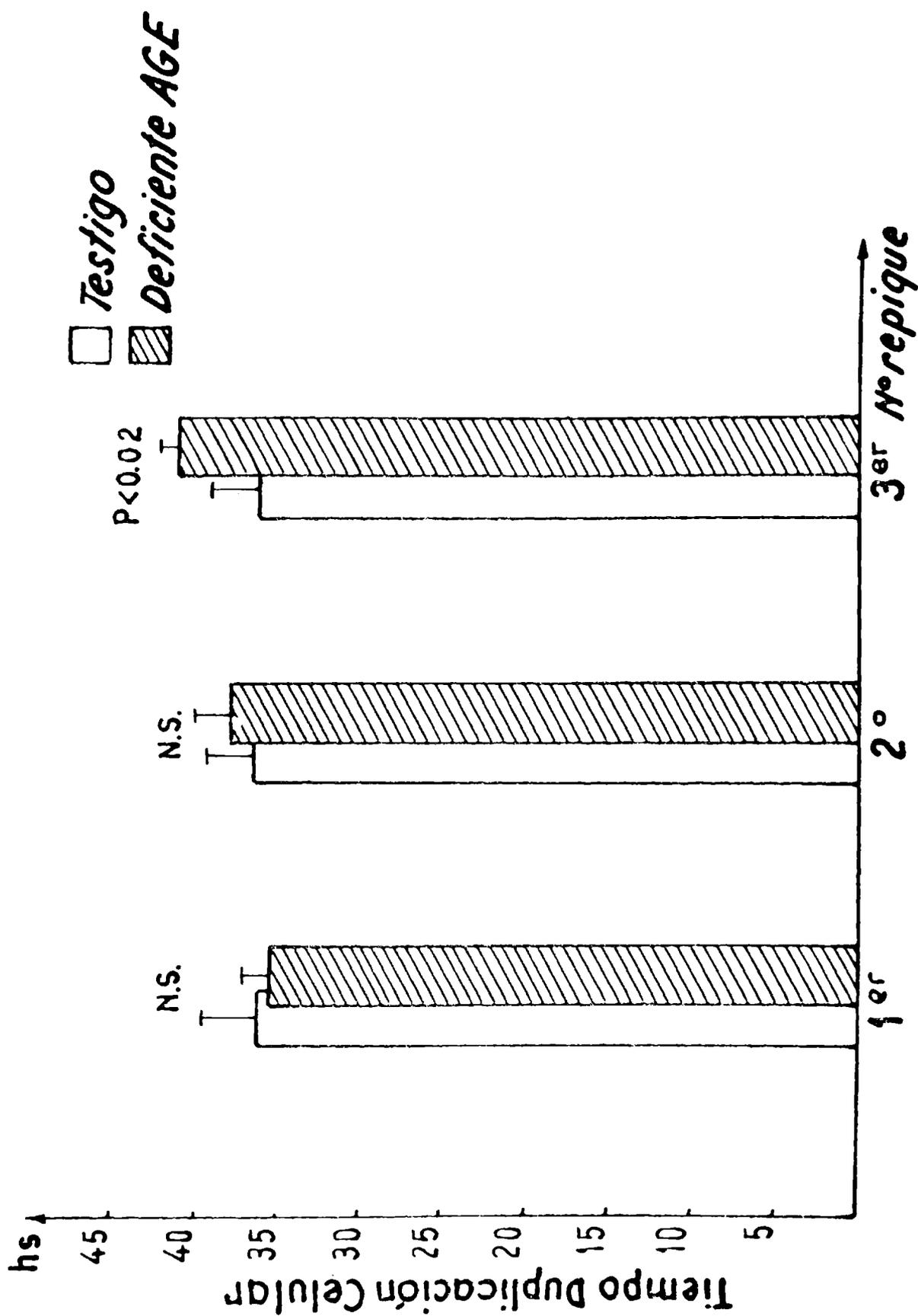


Figura 22

Para asegurar que existe una marcada influencia de la dieta deficiente en A.G.E. sobre la duplicación celular sería necesario aumentar el número de repiques en animales en estado deficiente.

A los resultados aquí presentados se le podrían sumar los de Bailey y col. (116) que trabajando con carcinoma de Ehrlich y Sarcoma-180 ascítico reconocen un ligero aumento en la fase "lag" cuando inyectan estas células ascíticas en ratones deficientes en A.G.E. Al reinyectar las células deficientes en otros animales también deficientes encuentran que la fase lag es igual a la de las células controles. Estos autores consideran la existencia de una adaptación no específica en los -- primeros momentos del desarrollo celular después del trasplante en un -- huésped deficiente, pero luego al retomar la velocidad de crecimiento -- normal sugieren que ese medio deficiente en A.G.E. no representa un gran stress metabólico para las células en estudios.

Todos estos resultados indicarían la falta de requerimientos de A.G.E. que tienen las células del carcinoma de Ehrlich y del Sarcoma-180, pero estas conclusiones no son extrapolables a todos los tumores, ya que Kidwell y col. (200) han demostrado en un tumor mamario de rata que el crecimiento y la supervivencia del mismo depende fundamentalmente de la presencia del ácido linoléico en el medio donde se desarrolla. Un comportamiento similar halló Gerschenson y col. en células HeLa S₃ (115). Por su parte Corwin y col. (201) demostraron que las células del Sarcoma Kirsten de ratón (FK 3T3) incrementan su crecimiento -- cuando se desarrollan en animales huéspedes alimentados con dietas ricas en A.G.E., mientras que el tumor AK 3T3 que deriva del primero, sufre una disminución del crecimiento cuando se lo inyecta en los mencionados -- animales.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos al estudiar los parámetros biológicos y bioquímicos propuestos para determinar la dependencia de las células de Sarcoma-180 ascítico por los ácidos grasos esenciales, han permitido arribar a las conclusiones que se presentan a continuación. Las mismas se consideran de acuerdo a cada uno de los parámetros señalados.

1) Modificaciones de la composición de ácidos grasos de lípidos totales en estados de deficiencia de ácidos grasos esenciales.

a) La dieta deficiente en A.G.E. produjo modificaciones en la composición de ácidos grasos de lípidos hepáticos de ratones albino Swiss, cuando los mismos se alimentaron por un período de 50 días con dicha dieta.

b) Los parámetros de evaluación del estado de deficiencia en A.G.E. demostraron que los ratones alimentados con la dieta deficiente se "encontraban en un estado de deficiencia de ácidos grasos esenciales.

c) Las células ascíticas del Sarcoma-180 mostraron un contenido elevado de ácidos octadecenoicos cuando se desarrollaron en animales con dieta testigo. Se determinó que esta fracción de ácidos monoetilénicos está constituida por 11.2% de ácido vaccénico ($18:1 \Delta^{11}$) y 88.7% de ácido oléico ($18:1 \Delta^9$).

d) Las células ascíticas del Sarcoma-180 mantenidas en animales deficientes en A.G.E., acusaron modificaciones en la composición de ácidos grasos de los lípidos totales. Incrementaron notablemente los ácidos octadecenoicos ($18:1$) y eicosatrienoico ($20:3 \omega^9$) y disminuyeron fundamentalmente los ácidos linoléico ($18:2 \omega^6$) y araquidónico ($20:4 \omega^6$).

Los parámetros de evaluación del estado de deficiencia indicaron que las modificaciones apuntadas anteriormente fueron aproximadamente del mismo orden que las producidas en los hígados de los animales huéspedes. No se detectaron diferencias significativas entre los parámetros correspondientes a las células tumorales de los distintos repiques en animales deficientes. Se considera que después de un período de adaptación las células del Sarcoma-180 adquieren un nuevo patrón de composición de ácidos grasos en lípidos totales y no lo alteran al menos por 15 generaciones celulares.

e) Las células ascíticas del Sarcoma-180 mantenidas en animales deficientes al ser inyectadas en animales normales demostraron tener la capacidad de restaurar la composición primitiva en ácidos grasos. Se comprobó así, el poder de adaptación de las células del Sarcoma-180 a los cambios de composición en ácidos grasos producidos por distintas dietas en los animales huéspedes.

f) A pesar de las conclusiones expuestas, este parámetro que considera las modificaciones en la composición de ácidos grasos, como respuesta a la deficiencia en A.G.E., no permite deducir si las modificaciones detectadas en las células ascíticas del Sarcoma-180 han sido propias de las células como reacción a este estado de deficiencia, o secundaria a los cambios en la composición en ácidos grasos sufrido por el huésped en estas circunstancias.

2) Capacidad de síntesis de ácidos grasos no saturados en células de Sarcoma-180.

a) No se detectó capacidad de desaturación del ácido linoléico C^{14} por la Δ^6 desaturasa en células ascíticas de Sarcoma-180 desarrolladas en animales controles. Tampoco se pudo apreciar actividad de éste sistema enzimático en las células ascíticas obtenidas de los tres repiques en animales deficientes en A.G.E.

b) Se pudo apreciar la capacidad de desaturar y elongar los ácidos palmítico y esteárico de las células del Sarcoma-180 desarrolladas tanto en animales deficientes como en normales.

No se detectaron diferencias significativas en la desaturación del ácido palmítico (16:0) a palmitoléico (16:1 ω^7) en las células deficientes respecto a las controles, mientras que la desaturación del ácido esteárico (18:0) a ácido oléico (18:1 ω^9) manifiesta un aumento de los valores medios por efecto del estado de deficiencia.

El análisis de éste parámetro propuesto para estudiar el comportamiento de la Δ^9 desaturasa en los estados de deficiencia en las células de Sarcoma-180, muestra la respuesta singular que tienen estas células tumorales al incrementar la desaturación del ácido esteárico sin aumentar la desaturación del ácido palmítico, es decir una alternativa metabólica no observada en hepatocitos en condiciones similares. Se presume que con éste comportamiento la célula en deficiencia tiende a aumentar el contenido de ácidos monoetilénicos de la serie ω^9 para hacer frente a la disminución de ácidos polietilénicos de la familia ω^6 ,

a pesar de ello los bajos porcentajes de saturación de los ácidos saturados no alcanzarían a cubrir las necesidades metabólicas de las células ascíticas por lo que deberían tomar parte de los ácidos grasos monoetílicos, preformados del huésped.

3) Incorporación del ácido linoléico C¹⁴ en las distintas fracciones lipídicas:

a) Se demostró que las células ascíticas del Sarcoma-180 incorporan al ácido linoléico C¹⁴ fundamentalmente en la fracción de lípidos neutros, cuando se incuban durante 3,5 y 10 minutos con este ácido. Estudios realizados "in vivo" presentaron el mismo esquema de incorporación.

b) La radioactividad incorporada en lípidos neutros es creciente con el tiempo de incubación.

c) No existiría una mayor incorporación del radiolinoléico en lípidos neutros de células deficientes respecto de los testigos.

d) No se detectó una mayor incorporación de linoléico C¹⁴ en fosfolípidos de células deficientes en ninguno de los tres repiques estudiados.

e) Las células del Sarcoma-180 presentan un comportamiento particular al incorporar el ácido linoléico en lípidos neutros, distinto al de otro tumor de crecimiento rápido como es: el carcinoma ascítico de Ehrlich.

f) El radiolinoléico se incorporó fundamentalmente en la fracción que correspondería a alquil-diacil-glicéridos tanto en células controles como deficientes en A.G.E.

A cortos tiempos de incubación, la radioactividad se distribuyó principalmente en los eter-glicéridos; luego al aumentar el período de incubación se pudo detectar también en triglicéridos pero siempre con un mayor porcentaje en los primeros.

g) Al cabo de un aparente período de adaptación al estado de deficiencia de A.G.E. las células ascíticas adquieren una velocidad de incorporación del ácido linoléico en las fracciones mencionadas en "f", similar a las células controles.

h) Se considera necesario realizar un mayor número de estudios y experimentos que permitan aclarar el rol que cumplen los eter-glicéridos en las células tumorales como así también explicar la capacidad que tienen las células ascíticas del Sarcoma-180 de incorporar

selectivamente el ácido 18:2 ω^6 en los mencionados eterglicéridos.

El análisis global de este parámetro que estudia la incorporación del ácido linoléico en las fracciones lipídicas de las células del Sarcoma-180 ascítico en estado de deficiencia de ácidos grasos esenciales pone en evidencia un comportamiento contrario al observado en hepatocitos en condiciones similares.

4) Tiempo de duplicación celular

a) El tiempo de duplicación de la células ascíticas de Sarcoma-180 desarrolladas en ratones Albino Swiss mantenidos con dieta normal fue de $36.4 \pm 2:1$ horas.

b) No se detectaron diferencias significativas entre el tiempo de duplicación celular de las células controles y las desarrolladas en animales deficientes del 1ro y 2do repique.

c) Se considera necesario aumentar el número de repiques en animales deficientes en A.G.E. para poder asegurar que no existe una verdadera influencia de la dieta deficiente en A.G.E. sobre la duplicación celular en Sarcoma-180 ascítico.

Por lo expuesto en 1, 2, 3 y 4 se sugiere que las células del Sarcoma-180 ascítico (número modal de cromosomas 74) son capaces de adaptarse y desarrollarse, al menos durante 3 repiques (650 horas), en animales en estado de deficiencia de ácidos grasos esenciales, merced a las modificaciones y características particulares observadas en ellas.



BIBLIOGRAFIA

- 1.- Brenner, R., Drug Metabolism. Reviews. 6 (2), 155, (1977).
- 2.- Moreno, A.R. y Schvartzman, B.. Principios de Biología Celular (Ateneo ed.) Bs.As. pág. 50 (1976).
- 3.- Dallner, G., Method in Enzymology. 31, 191, (1974).
- 4.- Dallner, G., and Ernester, L., J. Histochem. Cytochem. 16, 611, (1968).
- 5.- Jamieson, J.D., and Palade, G.E., J. Cell. Biol. 34, 597, (1967).
- 6.- Rostgaard, J. and Møller, O.J. Exp. Cell. Res. 68, 356 , (1971).
- 7.- Wallach, D.F.H., and Kamat, V.B., Method in Enzymology. 8, 164, (1966).
- 8.- Wakil, S.J., J. Am. Oil. Chem. Soc. 80, 6465, (1958).
- 9.- Hsu, R.J., Wasson, G. and Porter, J.W., J. Biol. Chem. 240, 3736, (1965).
- 10.- Goldman, P., Alberts, A.W. and Vagelos, P.R. J. Biol. Chem. 238, 1255, (1963).
- 11.- Lynen, F., Federation Proc. 20, 941, (1961).
- 12.- Vagelos, P.R., Majerus, P.W., Albert, A.W., Larrabee, A.R. and Aihaud, G.P., Federation. Proc. 25, 1485, (1966).
- 13.- Harlan, W.R., and Wakil, S.J.; J. Biol. Chem. 238, 3216, (1963).
- 14.- Holloway, P.W. and Wakil, S.J.; J. Chem. 239, 2489, (1964).

- 15.- Nugteren, D.H., Biochem. Biophys. Acta. 106, 280, (1965).
- 16.- Stoffel, W. and Hoppe, S.; Physiol. Chem. 333, 71, (1963).
- 17.- Brenner, R.R. Acta Physiol. Lat. Am. Vol. 16 (2), 66, (1966).
- 18.- Green, D.E. en Progress in the Chemistry of Fats and other lipíds, Holman, R.T., Lundberg, W.O. y Malkin, T. (dirs). The Macmillan Co, N.Y. vol. 6, cap. 3, (1963).
- 19.- Schoenheimer, R. and Rittenberg, D. J. Biol. Chem. 120, 155, (1937).
- 20.- Stelten, D.W. and Schoenheimer, R. J. Biol. Chem. 133, 329, (1940).
- 21.- Bernhard, K., von Bulow-Koster, J. and Wagner, H. Helv. 42, 152 (1959).
- 22.- Stoffel, W. Biochem. Biophys. Res. Commun. 6, 270, (1961).
- 23.- Nugteren, D.H. Biochim. Biophys. Acta. 60, 656, (1962).
- 24.- Holloway, P.W., Peluffo, O., Wakil, S.J. Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 300, (1963).
- 25.- Brenner, R.; Mercuri, O.; De Tomás, M.E. J. Nutrition. 77, 203, (1962).
- 26.- Scheuerbvanndt, G.; Golfine, M., Baronovsky, P.E., Bloch, K. J. Biol. Chem. 236, Pc 70, (1961).
- 27.- Bloomfield, D.K. and Bloch, K. Jour. Biol. Chem. 235, 337, (1960).
- 28.- Elovson, J. Biochem. Biophys. Acta. 106, 291, (1965).

- 29.- Wang, M.C. y Meny, H.C. *Lipids*. 9, 63, (1974).
- 30.- Oshino, N.; Imai, Y. and Sato, R. *Biochim. Biophys. Acta* 128, 13, (1966).
- 31.- Holloway, P.W., Katz, J.T. *Biochemistry*. 11, 3689, (1972).
- 32.- Montgomery, M.R. and Holtzman, J.L. *Biochem. Pharmacol.* 24, 1343, (1975).
- 33.- de Gómez Dumm I.N.T., Brenner, R.R. *Lipids*. 10, 315, (1975).
- 34.- Montgomery, M.R. *Jour. Lip. Res. Vol.* 17, N°1, 12, (1976).
- 35.- Oshino, N., Sato, R. *Biochemistry*. 69, 169, (1971).
- 36.- Gellhorn, A., Benjamin, W. *Biochim. Biophys. Acta* 84, 167, (1964).
- 37.- Mc Donald, T.M. y Kinsella, J.E. *Arch. Biochem. Biophys.* 156, 223, (1973).
- 38.- Rao, G.A., Abraham, S. *Lipids*. 9, 269, (1974).
- 39.- Chiappe, L., Mercuri, O., De Tomás, M.E. *Lipids*. vol. 9, 360, (1974).
- 40.- Chiappe, L.E., De Tomás, M.E., Mercuri, O. *Lipids*. Vol. 9, 489, (1974).
- 41.- Mercuri, O., De Tomás, M.E. *Lipids*. vol. 13 (4), 289, (1978).
- 42.- Morton, R.E., Hartz, J.W., Reitz, R.C., Waite, B.M., Morris, H.P. *Biochim. Biophys. Acta* 573, 321, (1979).
- 43.- Holloway, P.W. *Biochemistry*. 10, 1556, (1971).

- 44.- Shimakata,T., Mihara,K. y Sato,R. J. Biochem.(tokyo).
72, 1163, (1972).
- 45.- Strittmatter,P., Spatz,L., Corcoran,D., Roger,M.J.,
Setlow,B. and Redline,R. Proc. Natl. Acad. Sci. 71,
4565, (1974).
- 46.- Catalá,A., Nervi,A.M. and Brenner, R.R. J. Biol. Chem.
250, 7481, (1975).
- 47.- Jeffcoat,R., Brawn,P.R., Jams,A.T. Biochem. Biophys.
Acta 431, 33, (1976).
- 48.- Leikin,A.I. Tesis doctoral. Fac. Cs. Exacta Univ. Nac.
de La Plata. (1978).
- 49.- Jeffcoat,R., Brawn,P.R., Safford,R., Jams,A.T. Biochem.
Jour. 161, 431, (1977).
- 50.- Spatz,L. y Strittmatter,P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.
68, 1042, (1971).
- 51.- Brett,D., Howling,D., Morris,L.J., Jams,A.T. Arch.
Biochem. Biophys. 143, 535, (1971).
- 52.- Enoch,H., Catalá,A., Strittmatter, P. Jour. Biol.
Chemist. 251, N°16, 5095, (1976).
- 53.- Lee,T.C. y Snyder,F. Biochem. Biophys. Acta 291, 71,
(1973).
- 54.- Brenner,R.R., Peluffo,R.O., Mercuri,O., Restelli,M.A.
Am. J. Physiol. 215, 63, (1968).
- 55.- De Tomás,M.E., Peluffo,R.O., Mercuri,O. Biochim. Biophys.
Acta 306, 149, (1973).
- 56.- De Tomás.M.E., Mercuri,O. Peluffo,R.O. Lipids. 10, 360,
(1975).

- 57.- Inkpen,C.A., Harris,R.A., Quackenbush,F.W. J. Lipid. Research. 10, 277, (1967).
- 58.- Gellhorn,A. y Benjamin,W. Biochim. Biophys. Acta 84, 167, (1964).
- 59.- Mercuri,O., Peluffo,R.O., De Tomás,M.E. Biochim.Biophys. Acta 369, 264, (1974).
- 60.- Brenner,R.R., Peluffo,R.O. Biochim. Biop. Acta 176, 471, (1969).
- 61.- Brenner,R.R. Lipids. 6, 567, (1971).
- 62.- Torrenco,M.T. and Brenner,R.R. Biochim. Biop. Acta 424, 36, (1976).
- 63.- Brenner,R.R. Mol. Cell. Biochem. 3, 41, (1974).
- 64.- Brenner,R.R. and Peluffo,R.O. J. Biol. Chem. 241, 5213, (1966).
- 65.- Peluffo,R.O., Nervi,A.M., Brenner,R.R. Biochim. Biop. Acta 441, 25, (1976).
- 66.- Mercuri,O., De Tomás, M.E. and Itarte,H. Lipids. 14, 822, (1979).
- 67.- De Tomás,M.E., Mercuri,O. and Rodrigo,A. J. Nutrition. 110, 595, (1980).
- 68.- Holman,R., Jhonson,S., Mercuri,O., Itarte,H., Rodrigo,A. and De Tomás,M.E. Am. J. Nutrition. En prensa.
- 69.- Gómez Dumm,I.N.T. de, Alaniz M.J.T. de and Brenner,R.R. J. Lipid. Res. 17, 616, (1976).
- 70.- Gómez Dumm,I.N.T. de, Alaniz,M.J.T. de, and Brenner,R.R. J. Lipid. Res. 16, 264, (1975).

- 71.- Mercuri,O., Peluffo,R.O. and Brenner,R.R. Biochim. Biop. Acta 116, 409, (1966).
- 72.- Peluffo,R.O., Gómez Dumm I.N.T. de, Alaniz M.J.T. de and Brenner,R.O. J. Nutr. 101, 1075, (1971).
- 73.- Peluffo,R.O., Mercuri,O., Brenner,R.R., Gómez Dumm I.N.T. and De Tomás M.E. Rev. Soc. Arg. Biol. 47, 122,(1971).
- 74.- Mercuri,O., Peluffo,R.O. and Brenner,R.R. Lipids. 2, 284, (1967).
- 75.- Peluffo,R.O. and Brenner,R.R. J. Nutrit. 104, 894,(1974).
- 76.- Ninno,R.E., de Torrenço,M.P., Castuma,J.C. and Brenner, R.R. Biochim. Biop. Acta 360, 124, (1974).
- 77.- Castuma,J.C., Catalá,A. and Brenner,R.R. J. Lipid. Res. 13, 783, (1972).
- 78.- Ullman,D. and Sprecher,H. Biochim. Biop. Acta 248, 61, (1971).
- 79.- Oshino,N., Omura,T. Arch. Biochem. Biop. 157, 395,(1973).
- 80.- Holloway,P.W. and Katz,J.T. Biochemistry. 11, 3689, (1972).
- 81.- Okayash,P. Ono,T., Shinojima,K. and Imai,Y. Lipids. 12, 267, (1977).
- 82.- Stoffel,W. Z. Physiol. Chem. 333, 71, (1963).
- 83.- Naragawa,M., Kawashima,K., Uchiyama,M. Lipids. 11, 241, (1976).
- 84.- Mohrhaver,H., Christiansen,K., Gan, M.V., Denbarg,M. and Holman,R.T. J. Biol. Chem. 242, 4507, (1967).

- 85.- Mead, J.F. Progr. Chem. Fats. Lipids. 9 parte 2, 161, (1968).
- 86.- Sprecher, H.W. Federation. Proc. 31, 1451, (1972).
- 87.- Burr, G.O. and Burr, M.M. J. Biol. Chem. 82, 345, (1929).
- 88.- Burr, G.O. and Burr, M.M. J. Biol. Chem. 86, 587, (1930).
- 89.- Thomasson, H.J. Intern. Z. Vitamin Forsch. 25, 62, (1953).
- 90.- Dorp, D.A. van, Beerthuis, R.K., Nugteren, D.H. and Vonkeman. Biochim. Biop. Acta 90, 204, (1964).
- 91.- Srivastava, K., Danish Med. Bull. 25, 130, (1978).
- 92.- Marcel, Y.L., Christiansen, K. and Holman, R.T. Biochim. Biop. Acta 164, 25, (1968).
- 93.- Collins, F.D. Biochem. Biop. Res. Comm. 9, 289, (1962).
- 94.- Ahlu Walia, B., Pincus, G. and Holman, R.T. J. Nutr. 92, 205, (1967).
- 95.- Smith, J.A., De Luca, H.F. J. Cell. Biol. 21, 15 (1964).
- 96.- Holman, R.T. (Ed). Polyunsaturated Acids. (Parte 4)
En: Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids
(Vol. 9) New York, Pergamon Press. Inc. pág.279, (1970).
- 97.- Menton, D.N. Am. J. Anat. 122, 337, (1968).
- 98.- Snipes, R.L. Anat. Rec, 159, 421, (1967).
- 99.- Snipes, R.L. Lab. Invest. 18, 179, (1968).
- 100.- Holman, R.T., Caster, W.O. and Wiese, H.F. Am J. Chim. Nutr. 14, 70, (1964).

- 101.- Holman,R.T. Arch. Latin. Nutr. 29, 11 (1979).
- 102.- Smith,J. and De Luca,H.F. J. Nutr. 79, 416, (1963).
- 103.- Hayashida,T. and Portman,O.W. J. Nutr. 81, 103, (1963).
- 104.- Glass,D.B., Frey,W., Carr,D.W., Goldberg,N.D. J. Biol. Chem. 252, 1279, (1977).
- 105.- Orly,J., Schramm,M. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 72, 3433, (1975).
- 106.- Caduce,T.L., Award,A.B., Fontenelle, L.J., Spector,A.J. J. Biol. Chem. 252, 6624, (1977).
- 107.- Mohrhauer,H. and Holman,R.T. J. Lipid. Res. 4, 151, (1963).
- 108.- Weber,G. and Lea,M.A. Advances un Enzyme Regulation. Vol. 4. Edited by G. Weber. Pergamon Press. 1965. pág. 115.
- 109.- Spector,A.A., Brenneman,D.E. en Tumor Lipids Biochemistry and Metabolism. 1973.(Randall Wood Ed.) American Oil. Chemist's Soc. Press. Illinois. pág. 1.
- 110.- Snyder,F. and Snyder,C. Prog. Biochem. Pharmacol. 10, 1, (1975).
- 111.- Van Hoeven,R.P. and Emmelot,P. (1973)
En: Tumor Lipids. Biochemistry and Metabolism (R. Wood. editor) pp 126. American Oil Chemist's Society Press.. Champaign.
- 112.- Sabine,J.R. Prog. Biochem Pharmacol. 10, 269, (1975).
- 113.- Waite,M., Parce,B., Morton,R., Cunningham,C. and Morris,H.P. Cancer Res. 37, 2092, (1977).

- 114.- Wood,R. Lipids. 11, 578, (1976).
- 115.- Gerschenson,L.E., Mead,J.G., Harary,I. and Haggerty,
D.F. Biochim Biop. Acta 131, 42, (1967).
- 116.- Bailey,M.J. and Dunbar,L.M. Cancer Res. 31, 91,(1971).
- 117.- Mercuri,O. and De Tomás,M.E. Lipids 6, 858,(1971).
- 118.- Uchiyama,M., Nakagawa,M. and Okui,S. J. Biochem. 62,
1, (1967).
- 119.- Farris,E.J. and Griffith,J.Q. 1949 the Rat in Laborator
ry Investigation J.B. Lippincot. Philadelphia.
- 120.- Peluffo,R.O., Brenner,R.R. y Mercuri,O. J. Nutrition.
81, 110, (1963).
- 121.- Zuckerberg,C. Cancer Res. 33, 2278, (1973).
- 122.- Stewart,H.L., Snell,K.C., Dunham,L.S. and Schlyen,S.M.
1959. Atlas of tumor. Pathology Sec. 12 Fascículo 40.
Washington. D.C.
- 123.- Friend,C. J. Exp. Med. 105, 307, (1957).
- 124.- Bianchi,M., Larramendy,M., Merani,S., Bianchi,N. y
Zabala,J. Mendeliana 2, 25, (1977).
- 125.- Peterson.W.D. and Stulberg.C.S. Cryobiology. Vol. I,
N°1, (1964).
- 126.- Haldar,D., Wai,N. and Pullman, M.E. J. Biol. Chem.
254, 4502, (1979).
- 127.- Folch,J., Lees,M. and Sloans,G.H. J. Biol. Chem.
226, 497, (1957).

- 128.- Hanaham, D.J., Dittmer, J.C. and Warashima, E. J. Biol. Chem. 228, 685, (1957).
- 129.- Malins, D.C. and Mangold, H.K. J. Am. Oil Chem. Soc., 37, 576, (1960).
- 130.- Roberti, R., Binaglia, L., Francescangeli, E. and Goracci, G., Porcellatti, G. Lipids 10, (1975).
- 131.- De Tomás, M.E. y Brenner, R.R. Anales Asoc. Quim. Arg. 52, 253, (1964).
- 132.- Pugh, E. and Kates, M. Jour. Biol. Chem. 252, 68, (1977).
- 133.- Stoffel, W., Chu, F. and Ahrens, E.H. Anal. Chem. 31, 307, (1959).
- 134.- Ackman, R.G., en Methods in Enzimology, 14, 329, (1969).
- 135.- Ackman, R.G., Nature, 194, 970, (1962).
- 136.- Ackman, R.G., J. Am. Oil Chemist's. Soc., 40, 558, (1963).
- 137.- Christie, W.W., 1973. Lipid Analysis. Pergamon Press. pág. 103.
- 138.- James, A.T. and Piper, E.A., J. Chromatog. 5, 265, (1961).
- 139.- Blank, M.L., Lee, T.Ch., Piantadosi, C., Ishaq, K., Snyder, F. Arch. Biochem. Biophys. 177, 317, (1976).
- 140.- Bray, G.A., Anal. Biochem. 1. 279, (1960).
- 141.- Thompson, W. and Lee, P. Biochim. Biophys. Acta 98, 151, (1965).
- 142.- Wood, R. and Snyder, F. Lipids 3, 129, (1968).

- 143.- Vit, J., Casensky, B. and Machacek, J. French Patent. 1, 515, (1968).
- 144.- Snyder, F., Blank, M.L., Wykle, R.L. J. Biol. Chem. 11, 3639, (1971).
- 145.- Snyder, F., Wood, R. Cancer Res. 28, 972, (1968).
- 146.- Baumann, W.J. and Ulshofer, H.K. Chem. Phys. Lipis. 2, 114, (1968).
- 147.- Schmid, H.H.O., Baumann, W.J. and Mangold, H.K. J. Chem. Soc. 89, 4797, (1967).
- 148.- Wood, R. and Snyder, F. Lipids. 2, 161, (1967).
- 149.- Privett, O.S., Nickell, C. J. Amer. Oil Chemi. Soc. 39, 414, (1962).
- 150.- Beroza, M. and Bierl, B. Mikrochim. Acta 4, (1969).
- 151.- Hanks, J., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 196, (1949).
- 152.- Homcy, J. and Margolis, S. J. Lip. Res. 14, 678, (1973).
- 153.- Spector, A. and Steinberg, D. J. Lipid Res. 7, 649, (1966).
- 154.- Elovson, J. Biochim. Biophys. Acta 84, 275, (1964).
- 155.- Liepkalns, V.A., Spector, A.A. Bioch. Biophys. Res. Comm. 63, 1043, (1975).
- 156.- De Vecchi, A.V.R., (1974) Animales de Laboratorio. Facultad de Veterinaria. Univ. Nac. de La Plata.
- 157.- Simmon, M.L., and Brick, J.O. (1970) The Laboratory mouse. (Alexander. Hollander Ed.) Englewood Cliffs. N.J.

- 158.- Greenberg,S.M., Calbert,C.E., Savage, E.E. and Devel,
H.J., J. Nutr. 41, 473, (1950).
- 159.- Pu del Kiewicz,C., Seufert,J. and Holman,R.T., J. Nutr.
95, 138, (1968).
- 160.- Slater,A.R.B. and Aftergood,L., Prog. Biochem. Pharmacol.
6, 214, (1971).
- 161.- Rahm,J.J. and Holman, R.T. J. Lipid. Res. 5, 169, (1964)
- 162.- Wood,R. en Tumor Lipids Biochemistry and Metabolism
(1973). (R. Wood Ed.) American Oil Chemists' Soc. Press.
Illinois. pág. 139.
- 163.- Ruggieri, S., and Fallani,A. Ibid pág. 89.
- 164.- Bergelson,L.D. and Dyatlovitskaya,E.K., Ibid. pág. 111.
- 165.- Wood,R. and Falch,J. Lipids 8, 702, (1973).
- 166.- Araki,E., Phillips,F. and Privett,O.S., Lipids 9, 707,
(1974).
- 167.- Wennerstrom,D.E., Jenkin,H.M., Biochim. Biophys. Acta.
431, 469, (1976).
- 168.- Awad, A.B., Spector, A.A., Biochim. Biophys. Acta.
426, 723, (1976).
- 169.- Spector,A., Cancer. Res. 27, 1580, (1967).
- 170.- Baker,N., Sandborg,C., Morris,D. and Dokhtens,N. Cancer
Res. 37, 2218, (1977).
- 171.- Medes,R., Thomas,A.J. and Weinhouse,S. Cancer. Res.
13, 27, (1963).
- 172.- Elwood,J.C. and Morris,H.P., J. Lip. Res. 9,337, (1968).

- 173.- Watson, J.A., *Lipids*. 7, 146, (1972).
- 174.- Wood, R., Falch, J. and Wiegand, R.D., *Lipids*. 9, 987, (1974).
- 175.- Wiegand, R.D. and Wood, R. *Lipids*. 10, 194, (1975).
- 176.- Wood, R. and Wiegand, R.D. *Lipids*. 10, 746, (1975).
- 177.- Spence, M.W. *Lipids*. 6, 831, (1971).
- 178.- Ramachandran, P., Venkata, R. and Cornwell, D. J. *Lip. Res.* 9, 137, (1968).
- 179.- Lambremont, E.N., ten-Ching Lee, Blank, M, Snyder, F. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 80, 813, (1978).
- 180.- Hofmann, K., Lucas, R.A. and Sax, S.M., *J. Biol. Chem.* 195, 473, (1952).
- 181.- Wood, R., Lee, T., *Jour. Amer. Oil. Chem. Soc.* 57, N°2, (1980).
- 182.- Jeffcoat, R., James, A.T., *FEBS. Letter.* 85, 114, (1978).
- 183.- Jeffcoat, R., James, A.T. *Lipids*. 12, 469, (1977).
- 184.- Ookhtens, M., Baker, N., *Cancer. Res.* 39, 973, (1979).
- 185.- Dumber, L.M. and Bailey, M.J., *J. Biol. Chem.* 250, 1152, (1975).
- 186.- De Tomás, M.E., Mercuri, O., *Lipids*. 8, 85, (1973).
- 187.- Zlatkis, R. J. *Lab. Clin. Med.* 41, 486, (1953).
- 188.- Bollinger, J.N. *Lipids*. 2, 143, (1967).
- 189.- Snyder, F., Cress, E.A., Stephens, N. *Lipids*. 1, 381, (1966).

- 190.- Snyder, F., en Method in Cancer Research. (1971), (H. Harris and T. Bush ed.) Academic. Press. New York. NY. Vol. 6 pág. 399.
- 191.- Bollinger, J.N. USAEC. Report. ORINS. 53, pag.21 (1965).
- 192.- Wood, R., and Harlow, R.D., Lipids. 5, 776, (1970).
- 193.- Albert, D.H., Anderson, C.E. Lipids. 12, 188, (1977).
- 194.- Fallani, A. and Ruggieri, S. Lipids. 14, 323, (1979).
- 195.- Malins, D.C., Wekell, J.C., Houle, C.R. J. Lip. Res. 6, 100, (1965).
- 196.- Schmid, H.H.O. and Mangold, H.K. Biochem. Z. 346, 13, (1966).
- 197.- Lewis, R.W. Comp. Biochem. Physiol. 19, 363, (1966).
- 198.- Howard, B.V., Morris, H.P. and Bailey, M.J., Cancer Res. 32, 1533, (1972).
- 199.- Blank, M. and Snyder, F. Lipids. 5, 337, (1970).
- 200.- Kinwell, W.R., Monaco, M.E., Wicho, M.S. and Smith, G.S., Cancer. Res. 38, 4091, (1978).
- 201.- Corwin, L.M., Varshavsky-Rose, F. and Broitman, S.A., Cancer. Res. 39, 4350, (1979).

