

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

**Vitamina B12 y folatos en animales portadores de tumores
experimentales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Emilia Jerez Méndez

Madrid, 2015

TP
1983

231

Emilia Jerez Méndez



X-53-011950-0

VITAMINA B₁₂ Y FOLATOS EN ANIMALES PORTADORES DE TUMORES EXPERIMENTALES

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1983



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

231/83

© Emilia Jerez Méndez
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1983
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-34876-1983

EMILIA JEREZ MENDEZ



VITAMINA B₁₂ Y FOLATOS EN ANIMALES PORTADORES
DE TUMORES EXPERIMENTALES.

Director: Dr. D. Humberto José Castro Mendoza
Jefe Consultor del Departamento de
Bioquímica.
Instituto de Investigaciones Médicas.
Fundación Jimenez Díaz.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas.

Año 1982



VITAMINA B₁₂ Y FOLATOS EN ANIMALES PORTADORES
DE TUMORES EXPERIMENTALES.

Este trabajo ha sido realizado en
el Departamento de Bioquímica de
la Fundación Jimenez Díaz (Clíni-
ca de N^a Señora de la Concepción)
de Madrid.

Director del trabajo:

Dr.D. H.J.Castro Mendoza
Jefe Consultor del Departamento
de Bioquímica.

V^oB^o

Humberto J. Castro Mendoza



Ponente del trabajo:

Prof.Dr.D. A.Martín Municio
Catedrático de Bioquímica
Universidad Complutense
Madrid.

DEDICATORIA:

A mis padres, a mi marido y a mi hijo,
que en el transcurso de este trabajo
me han ayudado, prestándome todo su
apoyo y cariño.

AGRADECIMIENTOS:

Deseo testimoniar mi agradecimiento al Dr.D. H.J. Castro Mendoza, director de este trabajo, por la formación y ayuda que de él he recibido, y expresarle mi admiración por su labor científica de tantos años, y que en la actualidad sigue desarrollando.

Agradezco también al Dr.D. A.Martín Municio, catedrático de Bioquímica de la Universidad Complutense de Madrid, ponente de esta Tesis Doctoral, su interés y su colaboración en el enjuiciamiento de los resultados obtenidos.

A la Dra. Concepción de la Piedra Gordo, con la que he realizado este trabajo, le debo mi más sincero agradecimiento, no sólo por los conocimientos científicos que me ha transmitido, sino por la ayuda personal prestada en todos los momentos difíciles por los que atravesó la realización de esta Tesis.

Quiero así mismo testimoniar mi agradecimiento a mis compañeros de laboratorio Cesar Gómez, Inmaculada Montañés y Gador Enriquez por toda su ayuda y colaboración en el trabajo, y a los doctores F.Soriano García y H. Oliva Aldamiz, Jefes de los Departamentos de Microbiología y de Anatomía Patológica de la Fundación Jimenez Díaz, por la colaboración prestada por estos departamentos.

I N D I C E

	Pág.
<u>I. INTRODUCCION.</u>	
I.1. ACCION DE LOS TUMORES SOBRE EL METABOLISMO GENERAL DEL HUESPED	1
I.1.1. El estado de caquexia es un síntoma general en los sujetos portadores de neoplasia	1
I.1.2. En el huesped portador de tumor se produce una pérdida de control sobre la utilización del combustible metabólico	2
I.1.3. El tumor cubre sus necesidades energéticas a expensas de metabolitos del huesped	3
I.2. IMPLICACIONES DE LA VITAMINA B ₁₂ Y DE LOS FOLATOS EN LA BIOSINTESIS DE TIMIDILATO	6
I.2.1. Vitamina B ₁₂ . Antecedentes históricos y metabolismo general	7
I.2.2. Folatos. Antecedentes históricos y metabolismo general	15
I.2.3. Timidilato sintetasa (E.C.2.1.1.45). Reacción que cataliza e importancia celular	21
I.2.4. El tumor necesita timidilato para la división celular	23
I.2.5. El timidilato se sintetiza a través de dos rutas metabólicas diferentes mediadas por dos enzimas cuyas actividades están incrementadas en aquellos estados caracterizados por un aumento de la	

	Pág.
tasa de proliferación celular	25
I.2.6. Tanto los folatos como la vitamina B ₁₂ son necesarios para el desarrollo normal de la actividad de la timidilato sintetasa	26
I.2.7. La hipótesis del "atrapamiento del metil-folato" explica la regulación que la enzima N ⁵ -metil-THF: H-CYS-metil transferasa ejerce sobre los niveles de folato metabólicamente activos	28
I.2.8. Validez actual de la hipótesis del "atrapamiento del metil-folato"	29
I.3. VITAMINA B ₁₂ Y PROCESO TUMORAL	32
I.3.1. El contenido en vitamina B ₁₂ de la dieta favorece el desarrollo de los tumores experimentales	32
I.3.2. Algunos enfermos de cancer presentan niveles altos de vitamina B ₁₂ en el suero	33
I.3.3. Los tumores experimentales contienen cantidades apreciables de vitamina B ₁₂	34
I.3.4. Importancia de la metil-cobalamina en el desarrollo de las neoplasias	35
I.4. FOLATOS Y PROCESO TUMORAL	38
I.4.1. Los tumores necesitan folato para su crecimiento	38
I.4.2. Folatos en sujetos portadores de tumor	40

II. OBJETIVOS	44
III. MATERIALES Y METODOS	46
III.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION. IMPLANTACION DE LOS TUMORES YOSHIDA Y WALKER-256	46
III.2. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE VITAMINA B ₁₂ MEDIANTE UNA TECNICA DE RADIOANALISIS	47
III.2.1. Reactivos	47
III.2.2. Método experimental	51
III.2.2.1. Muerte de los animales de experimentación	51
III.2.2.2. Preparación de las muestras de suero, hígado y tumor ...	51
III.2.2.3. Radioanálisis de vitamina B ₁₂	52
III.2.3. Discusión del método	52
III.2.4. Control del método	59
III.2.4.1. Reproducibilidad de la curva estandar	59
III.2.4.2. Curvas de dilución de suero y tejidos	61
III.2.4.3. Ligamiento inespecífico	64
III.2.4.4. Recuperación del método	64
III.2.4.5. Reproducibilidad inter- análisis e intra-análisis ..	66
III.3. DETERMINACION DE LAS DIFERENTES FRACCIONES DE COBALAMINA EN SUERO, HIGADO Y TUMOR DE	

RATAS PORTADORAS DEL SARCOMA SOLIDO DE YOSHIDA	67
III.3.1. Reactivos	68
III.3.2. Método experimental	70
III.3.2.1. Preparación de los extrac <u>o</u> tos de las muestras para cromatografía	70
III.3.2.2. Cromatografía en capa fina	73
III.3.2.3. Revelado bioautográfico de las placas de cromatografía con el mutante NCIB 9270 de E. coli ...	74
III.4. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE FOLATO MEDIANTE UNA TECNICA DE RADIOANALISIS	76
III.4.1. Reactivos	76
III.4.2. Método experimental	82
III.4.2.1. Muerte de los animales de experimentación	82
III.4.2.2. Preparación de las mues <u>tr</u> as de suero	82
III.4.2.3. Preparación de las mues <u>tr</u> as de hígado y de tumor. 83	83
III.4.2.4. Radioanálisis de folato .	84
III.4.3. Discusión del método	88
III.4.4. Control del método	94
III.4.4.1. Titulación de la proteína ligante	96

III.4.4.2. Reproducibilidad de la curva estandar	96
III.4.4.3. Curvas de dilución de suero y tejidos	99
III.4.4.4. Ligamiento inespecífico..	102
III.4.4.5. Recuperación del método..	102
III.4.4.6. Reproducibilidad inter-análisis e intra-análisis	104

III.5. DETERMINACION CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA TIMIDILATO SINTETASA (E.C.2.1.1.45)	107
III.5.1. Reactivos	107
III.5.2. Método experimental	109
III.5.2.1. Muerte de los animales de experimentación	109
III.5.2.2. Preparación de las muestras de hígado y de tumor	109
III.5.2.3. Desarrollo del método	110
III.5.3. Discusión del método	111
III.5.4. Control del método	113

IV. RESULTADOS

IV. 1. Datos generales de los animales de experimentación	118
IV.2. Niveles totales de vitamina B ₁₂ en suero, hígado y tumor de ratas portadoras del sarcoma sólido de Yoshida	122

IV.3. Distribución de las diferentes fracciones de cobalamina en suero, hígado y tumor, de ratas portadoras del sarcoma sólido de Yoshida. Comparación con los valores encontrados en animales normales	125
IV.4. Niveles de folato en suero, hígado y tumor de ratas portadoras del sarcoma sólido de Yoshida y del carcinosarcoma WALKER-256. Comparación con los niveles de folato en animales normales	130
IV.5. Actividad de la enzima timidilato sintetasa (E.C.2.1.1.45) en hígado y tumor de ratas portadoras del sarcoma sólido de Yoshida. Comparación con la actividad enzimática presentada por el grupo de animales control	138
V. <u>DISCUSION</u>	142
V.1. Los animales portadores de tumor manifiestan un marcado descenso en el nivel de hemoglobina en sangre y de proteínas séricas	142
V.2. El hígado del huesped portador de una neoplasia aumenta significativamente de tamaño, en comparación con el hígado de un animal normal .	143
V.3. Los niveles de vitamina B ₁₂ son normales en el suero de los animales portadores de tumor ..	144
V.4. No hemos detectado la presencia de las fracciones Ado-Cbl y Me-Cbl en suero de rata	144
V.5. El hígado del huesped portador de la neoplasia presenta niveles de vitamina B ₁₂ superiores a los de los animales controles	146

V.6. En el sarcoma sólido de Yoshida está presente la vitamina B ₁₂ , pudiéndose detectar en dicho tejido las 4 fracciones de cobalamina	147
V.7. Posible interpretación de los elevados niveles de CN-Cbl medidos en todos los tejidos estudiados	150
V.8. El contenido total de folato en suero e hígado de las ratas portadoras de tumor no manifiesta ninguna variación respecto a los valores normales	151
V.9. El tumor satisface su demanda de folato activo con un nivel relativamente bajo de este metabolito	151
V.10. El contenido celular de los cofactores individuales de folato puede diferir de unos tejidos a otros	153
VI. <u>CONCLUSIONES</u>	157
VII. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	162

ABREVIATURAS:

dUMP= desoxiuridina monofosfato.

dTMP= desoxitimidina monofosfato.

dATP= desoxiadenosina trifosfato.

dGTP= desoxiguanosina trifosfato.

dCTP= desoxicitosina trifosfato.

dTTP= desoxitimidina trifosfato.

DHF= dihidrofolato.

THF= tetrahidrofolato.

Me-Cbl= metil-cobalamina.

Ado-Cbl= adenosil-cobalamina.

OH-Cbl= hidroxil-cobalamina.

CN-Cbl= ciano-cobalamina.

H-CYS= homocisteina.

MET= metionina.

FIGLU= ácido formimino glutámico

TC= Transcobalamina.

F.I.= Factor Intrínseco.

cpm= cuentas por minuto.

dpm= desintegraciones por minuto.

I. INTRODUCCION

I. 1 ACCION DE LOS TUMORES SOBRE EL METABOLISMO GENERAL DEL HUESPED.

I. 1.1. El estado de caquexia es un síntoma general en los sujetos portadores de neoplasia.

El estado de caquexia es un síntoma general que se manifiesta en todo organismo portador de un tumor, y que va haciéndose cada vez más acusado a medida que avanza el proceso maligno.

Los síntomas visibles de esta caquexia asociada al cancer son entre otros un rápido descenso del peso corporal, hipoglucemia, agotamiento de los depósitos de glucógeno hepático, disminución de la masa muscular con pérdida de proteínas, consumo de los lípidos del tejido adiposo, balance de nitrógeno negativo y disfunciones en procesos fisiológicos esenciales para el organismo (1).

Los animales portadores de tumores experimentales constituyen un modelo adecuado para el estudio del cancer, debido a que en ellos aparecen los mismos síntomas y alteraciones metabólicas que se han detectado en humanos. (15). Así por ejemplo, en el caso de las ratas portadoras del sarcoma sólido de Yoshida, a los 6 o 7 días de la implantación del tumor, el animal comienza a perder peso, manifiesta una acusada hipoglucemia y empieza a detectarse una hiperlipemia en plasma, que parece ser consecuencia de la utilización de los depósitos grasos del huesped con

fines energéticos. Sobre el noveno o décimo día de la implantación del tumor, se nota un aumento considerable del peso del hígado y bazo, disminución del tejido muscular esquelético, aumento del peso de las suprarrenales y desaparición completa de los lípidos de los depósitos grasos. Todo ello refleja la desintegración general del huésped (2).

I. 1.2. En el huésped portador de tumor se produce una pérdida de control sobre la utilización del combustible metabólico.

En 1972 Weinhouse (3), en un trabajo sobre el metabolismo de los animales portadores de tumor, concluye que el cancer como trastorno está caracterizado por la pérdida de control del huésped sobre la proliferación celular del tumor. El autor (210) señala que entre las alteraciones moleculares producidas por las neoplasias, hay una pérdida de enzimas que están bajo la regulación del huésped y que van asociadas a la función hepática (glucoquinasa, aldolasa B y piruvato quinasa tipo II), y su reemplazamiento por enzimas con estructuras moleculares alteradas, que no están bajo la regulación del huésped en cuanto que su control es independiente de las hormonas y de la dieta (hexoquinasa, aldolasa A y piruvato quinasa tipo I), pero que sin embargo tienen un papel muy importante en la utilización del combustible metabólico.

En 1974 Waterhouse (4), señala que en los pacientes que poseen un cancer que crece incontroladamente no se ponen en mar

cha los mecanismos de adaptación metabólica para reducir el consumo energético, que se manifiestan por ejemplo, en los casos de inanición. El fallo en reducir el gasto de calorías y la continua utilización de aminoácidos para la gluconeogénesis, implica la pérdida de una adaptación enzimática orgánica para una mejor conservación energética. Todo parece indicar que en el animal portador de tumor no se ponen en marcha los recursos metabólicos normales para reducir al mínimo el gasto energético, y esto va produciendo un agotamiento cada vez mayor de los metabolitos indispensables del huésped.

Se ha demostrado que el aporte de oxígeno al tejido canceroso es menor que el que recibe un tejido normal (1). Esto se debe a las anomalías vasculares de dicho tejido, que traen como consecuencia un flujo sanguíneo varias veces menor que el de los tejidos homólogos normales. Según esto, parece ser que la respiración de los tumores es deficiente a causa de la hipoxia local. Por lo tanto, la glicolisis anaerobia es la principal fuente de energía de la célula cancerosa "in vivo". Este tipo de glicolisis tiene un rendimiento energético muy bajo (2 moléculas de ATP por molécula de glucosa) en comparación con la respiración oxidativa vía ciclo de Krebs (30 moléculas de ATP por molécula de glucosa). Debido a ello, el consumo de moléculas de glucosa por parte del tumor es enorme (5,6).

I. 1.3. El tumor cubre sus necesidades energéticas a expensas de metabolitos del huésped.

Gold (7) explica el mecanismo termodinámico que conduce

a la caquexia asociada al cancer: "Diversas experiencias prueban que en los pacientes con cancer tiene lugar una pérdida importante y progresiva de energía a expensas de los tejidos no cancerosos, en virtud del establecimiento de un sistema cíclico de pérdida energética, dependiente de un acoplamiento entre glicolisis en el tejido tumoral y gluconeogénesis en los tejidos del huesped. De esta manera el tumor cubriría sus necesidades energéticas a expensas de los metabolitos del huesped, provocando en éste un déficit de los mismos, y quizá fundamentalmente de glucosa, que constituiría vía glicolisis su principal combustible respiratorio".

La glucosa es un metabolito fundamental para las células neoplásicas, las cuales la utilizan para cubrir sus necesidades energéticas, y para la síntesis de ribosa, vía ciclo de las pentosas. Se ha demostrado (1) que las células cancerosas son capaces de transformar en gran extensión el esqueleto hidrocarbonado de la glucosa en las pentosas de los ácidos nucleicos.

Diversos autores (8-10) han encontrado un bajo contenido en glucógeno en el hígado de ratas portadoras de una neoplasia. Dichos autores lo atribuyen a un aumento en el consumo de glucosa por el tumor, a una alteración en su síntesis, o a una hipermovilización por tóxicos elaborados por el tumor. Sin embargo, estímulos con adrenalina y glucagón en animales con tumores Yoshida y Walker-256, confirman la idea de que la síntesis y degradación del glucógeno es semejante en animales normales y portadores de tumor (11). Los tumores no ejercen aparen

temente ninguna alteración sobre el metabolismo del glucógeno. Esto conduce a la conclusión de que el déficit de glucógeno hepático en los animales portadores de tumor es debido a la elevada utilización de la glucosa por parte de las células neoplásicas.

En estudios realizados por De la Piedra y Castro Mendoza (12) se llega a la conclusión de que la anemia que padecen los sujetos con cancer puede ser debida principalmente a una carencia de precursores metabólicos necesarios para la producción del núcleo tetrapirrólico del Hemo.

Una vez que el tumor ha agotado las reservas del glucógeno hepático del huesped, utiliza las proteínas tisulares y las grasas contenidas en el tejido adiposo para la obtención de glucosa y energía.

Se han descrito (13) alteraciones en el metabolismo de los lípidos inducidas por el crecimiento del tejido neoplásico, en animales portadores de tumor. En los tejidos tumorales se ha encontrado un intenso catabolismo de los ácidos grasos hacia la formación de acetyl-acetato (14). También se han descrito (13) niveles elevados de alanina en la sangre de pacientes con cancer. La incorporación de alanina a la sangre es un índice directo del catabolismo de las proteínas musculares, el cual puede ser la causa del alto nivel de debilidad y de caque

xia que alcanza el paciente en estadios avanzados del desarrollo del tumor. Por otra parte, la alanina parece ser el aminoácido más utilizado como sustrato gluconeogénico durante estos días de ayuno e inanición (16,17).

Existen también estudios que muestran un acelerado catabolismo de la albúmina en animales portadores de tumor (18, 19), e incluso la captación de la proteína completa por el tejido tumoral (20,21).

En una excelente revisión sobre los aspectos bioquímicos de las relaciones metabólicas tumor-huesped, Shapot (1) concluye de la siguiente manera: "Es posible que el rápido consumo por parte del tumor de metabolitos esenciales proporcionados por el huesped, sea muy diverso y no se reduzca simplemente a la utilización de glucosa y compuestos nitrogenados. No debe sorprendernos si en el futuro se demuestra que el tumor actúa también como "trampa de vitaminas", privando a los sistemas enzimáticos de los órganos vitales del huesped, de cofactores y grupos prostéticos esenciales. Si esto fuera cierto, y el tumor estuviera también dotado de la capacidad de captar las vitaminas del huesped, se esclarecería el motivo de la distrofia que presentan los órganos internos del huesped, causada por el desarrollo del tumor".

I. 2. IMPLICACIONES DE LA VITAMINA B₁₂ Y DE LOS FOLATOS EN LA BIOSINTESIS DEL TIMIDILATO

En este apartado vamos a intentar establecer claramente la relación entre los procesos metabólicos implicados en la división celular, y la disponibilidad de vitamina B₁₂ y folatos metabólica

mente activos. Con esta relación queremos recalcar la importancia que pueden tener estas vitaminas en el desarrollo del proceso tumoral.

I. 2.1 Vitamina B₁₂. Antecedentes históricos y metabolismo general.

El descubrimiento de la vitamina B₁₂ va unido a la historia de la anemia perniciosa. El primer paso a destacar en la serie de sucesos que condujeron a la caracterización de la vitamina B₁₂, es el trabajo de Minot y Murphy en 1926 (22), en el que estos autores demostraron que la administración oral de extractos crudos de hígado era efectiva en el tratamiento de la anemia perniciosa.

A partir de aquel momento se empezó a investigar sobre la identidad del principio activo contenido en el hígado, capaz de curar dicha enfermedad.

En el año 1936 (23), en Noruega, se consiguió el aislamiento de una preparación semicristalina de color amarillo anaranjado, que exhibía una elevada actividad anti-anemia perniciosa cuando era inyectada a pacientes con esta enfermedad. El estallido de la Segunda Guerra Mundial interrumpió estos estudios, pero 19 años más tarde, cuando dichas preparaciones ya casi olvidadas fueron examinadas de nuevo por otros investigadores, aquellos cristales resultaron ser vitamina B₁₂, ya por entonces caracterizada.

En 1948, Smith (24) y el grupo de Rickes (25), trabajando

por separado, consiguieron aislar en forma cristalina el factor anti-anemia perniciosa a partir de extractos de hígado y riñón. A dicho factor le dieron la denominación de vitamina B₁₂. En aquel mismo año se comenzó a dar aplicación clínica a esta vitamina, inyectándosela a pacientes con anemia perniciosa (26).

Aparte de los estudios realizados sobre el principio activo que curaba la anemia perniciosa, otras investigaciones que contribuyeron enormemente al conocimiento de las propiedades de la vitamina B₁₂, fueron las realizadas con microorganismos. En 1947 Shorb (27), llevando a cabo unos estudios sobre los factores de crecimiento del *Lactobacillus lactis*, descubrió que extractos de hígado ligeramente purificados contenían un factor de crecimiento esencial para ese microorganismo. El descubrimiento de éste y de otros microorganismos (*Lactobacillus leichmanii*, *Euglena gracilis*), que necesitan vitamina B₁₂ para su crecimiento, ha proporcionado buenos métodos de medida de niveles de vitamina B₁₂ en muestras biológicas, que únicamente en los últimos años han sido reemplazados por los métodos de dilución isotópica.

El descubrimiento de que la vitamina B₁₂ no era un único compuesto, sino que se presentaba en formas diferentes, no tuvo lugar hasta 1958, fecha en la que Barker y col (28) encontraron una forma de la vitamina sensible a la luz. Dicho descubrimiento tuvo lugar como resultado de unos estudios sobre una ruta metabólica especial del glutamato en *Clostridium tetanomorphum*. Esto condujo poco después al descubrimiento de la Ado-Cbl.

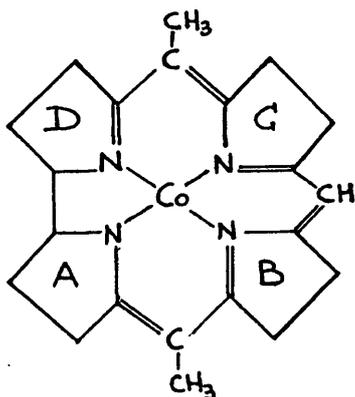
La configuración espacial de la CN-Cbl se conoció en 1956 (29), mediante la aplicación de técnicas de difracción de rayos X, y en 1961 (30) se describió la estructura de la Ado-Cbl, solamente 3 años después de su aislamiento.

Sobre los años 60 se descubrió que la transferencia del grupo metilo del N⁵-metil-THF, requería otra forma de vitamina B₁₂ distinta de la Ado-Cbl. Esta nueva forma resultó ser la Me-Cbl, y se demostró que dicha coenzima de la vitamina B₁₂ intervenía en la conversión de la H-CYS a MET, en un sistema de reacción complejo propuesto por Foster y col. en 1964 (31).

Finalmente, en 1961 (32) se puso en evidencia que la Ado-Cbl era imprescindible para la isomerización de la metil-malonil-CoA a succinil-CoA, quedando así definitivamente establecida la funcionalidad bioquímica de las dos coenzimas de la vitamina B₁₂.

El núcleo de cobalamina es un anillo de corrina con un átomo de cobalto en el centro.

El anillo de corrina contiene 4 unidades pirrólicas. Dos de ellas, los anillos A y D están ligadas por puentes metínicos. Los sustituyentes de los anillos pirrólicos son los grupos metilo (-CH₃), propionamida (-CH₂-CH₂-CO-NH₂) y acetamida (-CH₂-CO-NH₂).



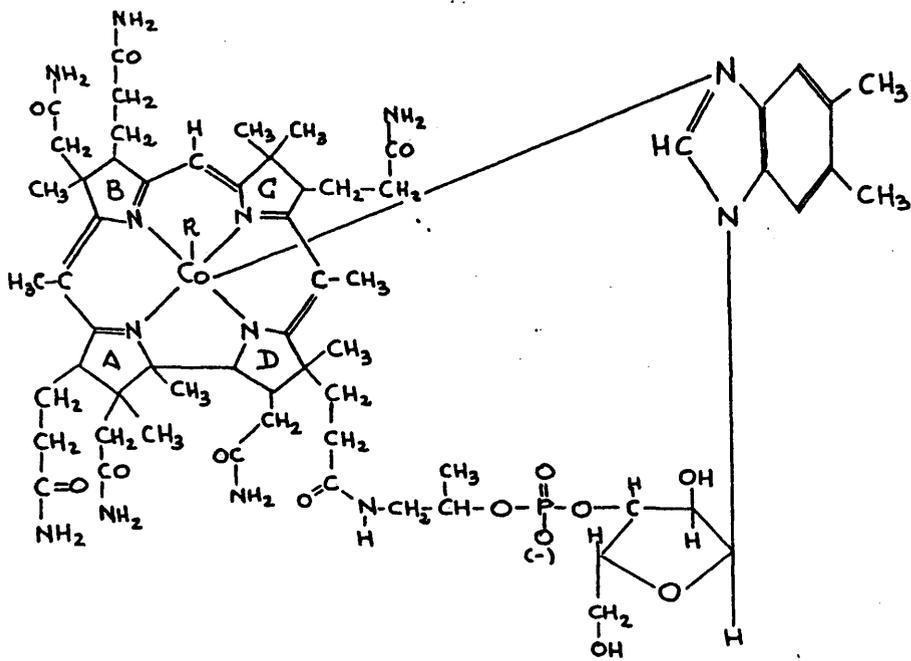
El átomo de cobalto queda unido a los 4 nitrógenos del anillo central. El quinto sustituyente del cobalto es un derivado del 5,6--dimetil-benzimidazol, que contiene ribosa-3-fosfato y aminoisopropanol. El grupo amino de este último compuesto, se encuentra unido a una cadena lateral del anillo D mediante una unión amida. El sexto sustituyente del átomo de cobalto puede corresponder a 4 radicales diferentes (cianuro, hidroxilo, metilo y adenosilo), dando lugar a las 4 formas de cobalamina que se encuentran en tejidos de mamíferos.

En la Figura 1 está representada la estructura de la vitamina B₁₂.

El núcleo de cobalamina es sintetizado exclusivamente por microorganismos. Los animales y las plantas son incapaces de sintetizarlo. Debido a ello, los mamíferos deben suplir en la dieta sus necesidades fisiológicas de vitamina B₁₂. En el lumen intestinal existen bacterias anaerobias capaces de sintetizarla en pequeña proporción.

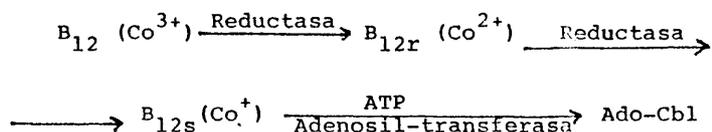
Las células de mamíferos tienen capacidad de sintetizar las 2 formas coenzimáticas activas de la vitamina B₁₂. El átomo de cobalto de la cobalamina puede encontrarse en un estado de oxidación +1, +2 ó +3. El estado de oxidación +3 corresponde a la OH-Cbl, y se suele representar como forma B_{12a}(Co³⁺). Dicha forma es reducida a un estado divalente B_{12r}(Co²⁺), y a un estado monovalente

FIGURA 1: ESTRUCTURA QUIMICA DE LA VITAMINA B₁₂.



<u>R</u>	<u>Tipo de cobalamina</u>
-OH	hidroxicobalamina
-CN	cianocobalamina
5'-desoxiadenosilo	adenosilcobalamina
-CH ₃	metilcobalamina

$B_{12s}(Co^+)$, mediante la acción de un sistema de reductasas acopladas al NADH. La forma $B_{12s}(Co^+)$ es el sustrato para la reacción enzimática final que originará la coenzima activa. El grupo 5' -desoxiadenosilo es transferido desde el ATP a la vitamina $B_{12s}(Co^+)$, para dar lugar a la Ado-Cbl. La secuencia de reacciones que acabamos de exponer es la siguiente:



Todo este sistema opera en el interior de la mitocondria.

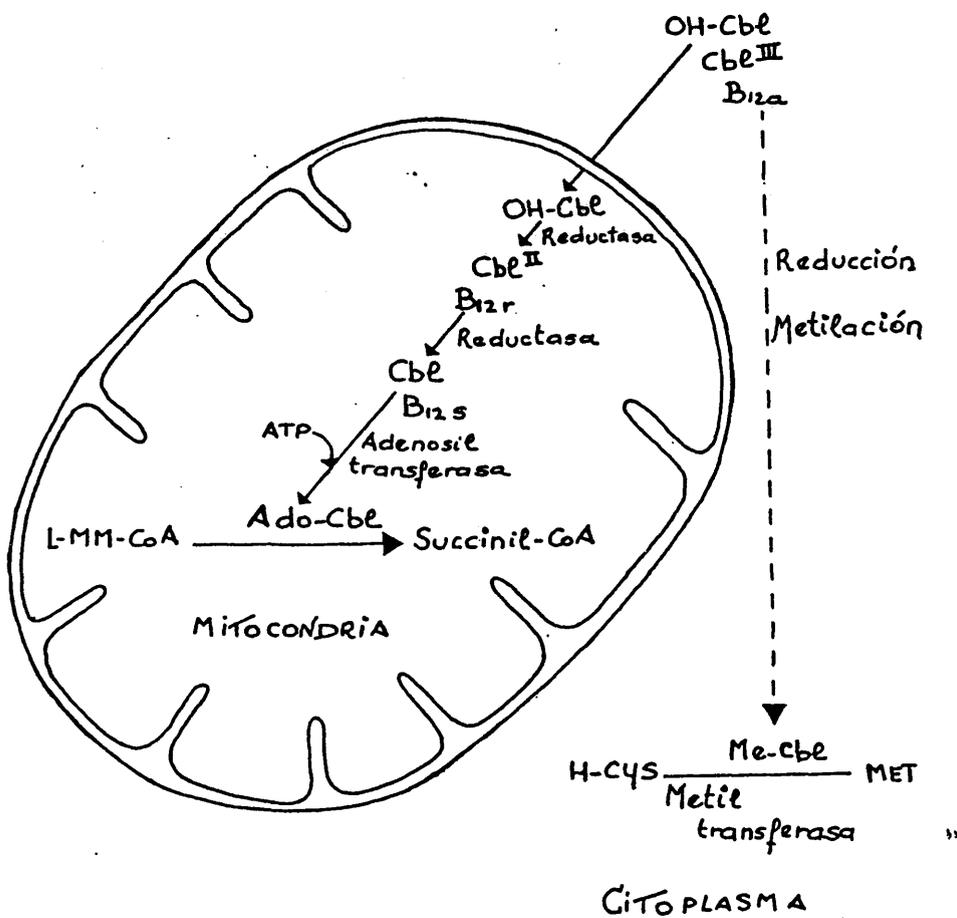
Los pasos biosintéticos que conducen a la formación de la Me-Cbl no están esclarecidos por completo. Parece probable que la síntesis de Me-Cbl tenga lugar en el citoplasma e implique una secuencia de reacciones de reducción-metilación, (33,34).

El modelo químico de la síntesis de Ado-Cbl fue estudiado inicialmente en bacterias (35,36), pero existen evidencias (37) que parecen indicar que el metabolismo de la cobalamina en las células de mamíferos puede tener lugar por una serie de reacciones similares.

En la Figura 2 está representado el modelo propuesto para la síntesis de las coenzimas de cobalamina.

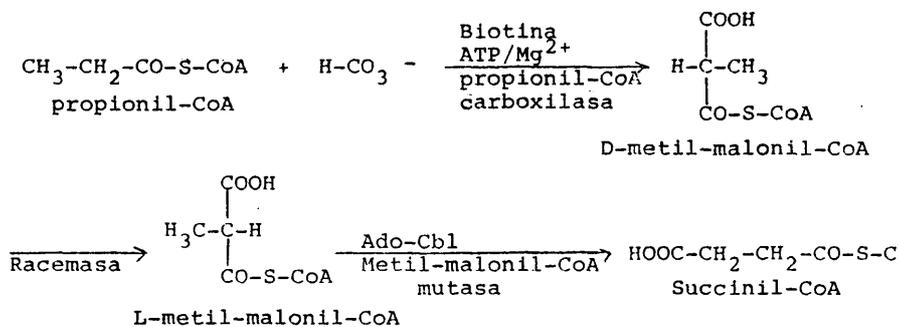
La función metabólica de la vitamina B_{12} en mamíferos es la de actuar como coenzima en 2 importantes reacciones enzimáticas.

FIGURA 2: MODELO DE FORMACION ENZIMATICA Y COMPARTIMENTALIZACION DE LAS COENZIMAS COBALAMINICAS EN CELULAS DE MAMIFEROS.



cas del organismo: la isomerización del metil-malonato a succinato, y la metilación de la H-CYS a MET.

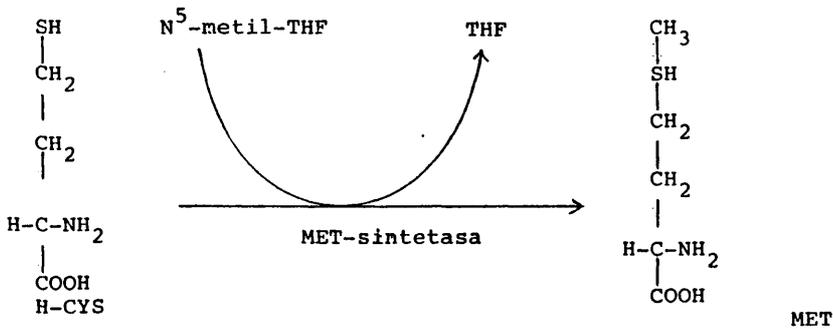
Isomerización metil-malonato → succinato: En el hombre y en la mayoría de mamíferos, la vía principal de metabolismo de la propionil -CoA se realiza a través de la conversión de la L-metil-malonil-CoA a succinil-CoA, mediante un cambio intramolecu lar catalizado por la enzima metil-malonil-CoA mutasa (E.C.5. 4.99.2), que requiere Ado-Cbl como cofactor.



La succinil-CoA entra en el ciclo del ácido cítrico y, o bien es completamente metabolizada a CO₂, o bien proporciona una vía para la gluconeogénesis mediante la conversión del oxalacetato a fosfoenolpiruvato. Por lo tanto, esta vía metabólica dependiente de vitamina B₁₂ constituye un puente de unión entre el metabolismo de los lípidos y de los carbohidratos.

Metilación H-CYS → MET: Esta reacción está catalizada por la enzima N⁵-metil-THF:H-CYS-metil-transferasa ó MET-sintetasa (E.C. 2.1.1.13), que requiere Me-Cbl como cofactor. El mecanismo exacto de la reacción no se conoce, pero parece probable que el grupo metilo del N⁵-metil-THF sea transferido en pri

mer lugar a la vitamina B₁₂, y pase finalmente a la H-CYS.



Ya que la MET es un aminoácido que se encuentra en la dita, la importancia metabólica de esta reacción no reside en sintetizar MET, sino que constituye un medio de regeneración del THF a partir del N⁵ -metil-THF. Esta conversión será analizada con detalle más adelante, en el apartado I.2.7.

I. 2.2. Folatos. Antecedentes históricos y metabolismo general.

Las primeras investigaciones que condujeron al descubrimiento del ácido fólico (ácido pteroilglutámico) datan de los años 1930-1938, en los que la Dra. Wills (38,39) publicó una serie de trabajos sobre la presencia de anemia macrocítica en la población de mujeres hindúes, sobre todo durante la gestación. Se observó que la administración de preparados de levadura y de extractos crudos de hígado proporcionaba una mejoría en el grado de la anemia. Por el contrario, la administración de extractos purificados no producía ningún efecto.

El estado patológico descrito por Wills, hoy día es cono-

cido como "anemia megaloblástica nutricional", la cual se acentúa durante el embarazo. En la actualidad no existe duda alguna de que el factor anti-anemia presente en los preparados de levadura era ácido fólico.

El estudio de los factores nutricionales requeridos para el crecimiento bacteriano, ha ayudado mucho en el descubrimiento de este factor anti-anemia. En 1940 Snell y Peterson (40) encontraron que el Lactobacillus casei requería para su crecimiento una sustancia que se encontraba presente en hígado y en la levadura. Se observó que dicha sustancia tenía la propiedad de ser absorbida por carbón activo, por lo que en un principio se le dió el nombre de "Factor eluido del Norit". La complejidad del problema se incrementó cuando se observó que diferentes cepas del mismo microorganismo, difierían enormemente en su requerimiento por estos factores. Años más tarde se comprobó que en la promoción del crecimiento bacteriano, estos factores podían ser reemplazados por el ácido pteroilglutámico, o por sustancias con él relacionadas.

El término "ácido fólico" fue introducido por Mitchell y col. en 1941 (41), para designar el material que aislaron de las espinacas y de otras plantas verdes, y que era factor de crecimiento para el Streptococcus faecalis R. Aunque este término se utiliza a menudo en sentido amplio para abarcar los diferentes tipos de folatos, debe ser utilizado solamente para el ácido pteroilglutámico, mientras que el resto de compuestos con él relacionados debe denominarse simplemente folatos.

La síntesis química del ácido pteroilglutámico se consiguió en 1946 (42) y su interés principal radicó en que dicho com

puesto producía efectos positivos en el tratamiento de la anemia megaloblástica.

Los folatos constituyen un numeroso grupo de compuestos todos ellos derivados del ácido pteroilglutámico. Los estudios realizados para establecer las estructuras de esta familia de compuestos se han visto dificultados por la baja concentración en que se encuentran en materiales biológicos, por su variable inestabilidad al ser expuestos al oxígeno y a la luz, y por su rápida degradación o interconversión por la acción de enzimas asociadas con ellos en las muestras biológicas. A pesar de estos inconvenientes, las estructuras de los principales derivados del ácido fólico han podido ser establecidas.

El ácido fólico como tal no existe en los tejidos de mamíferos, sino en forma de derivados reducidos.

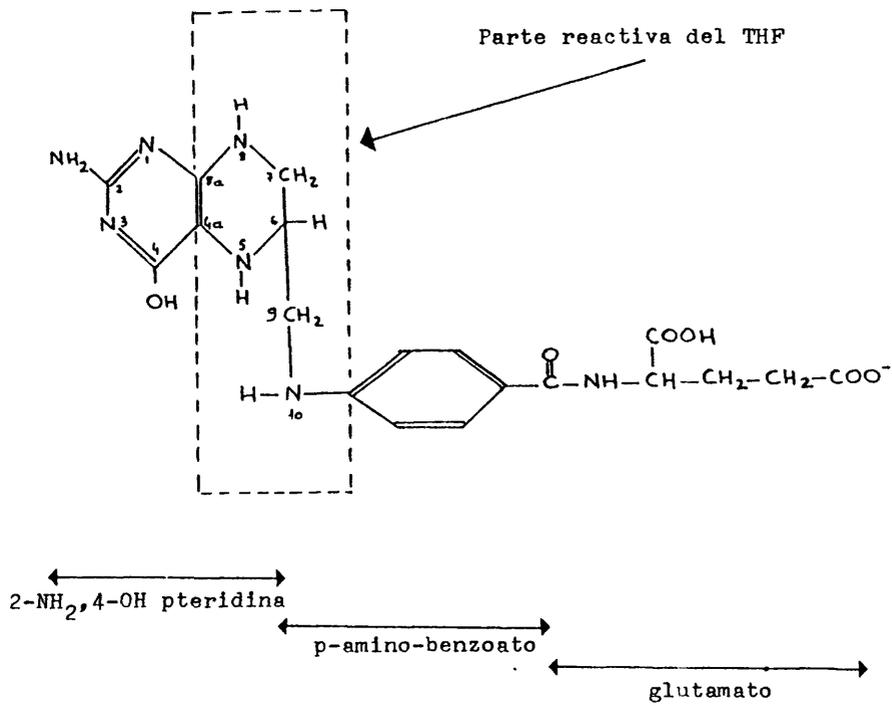
El tetrahidrofolato (THF), llamado también tetrahidropteroilglutamato, es un compuesto portador de unidades activas de un átomo de carbono. Consta de 3 grupos: un anillo de pteridina, un grupo p-amino-benzoato y un resto de glutamato.

El grupo de carbono transportado por el THF está ligado a su átomo de nitrógeno N⁵ ó N¹⁰ ó a ambos. Esta unidad puede existir en diferentes estados de oxidación, dando lugar a una serie de derivados con actividad biológica.

En la Figura 3 está representado el esquema de la estructura química del THF y sus derivados.

Dependiendo del número de residuos de glutamato unidos al

FIGURA 3: ESTRUCTURA QUIMICA DEL THF Y DE SUS DERIVADOS.



Grupo transportado

- CH₃
- CH₂-
- CH=
- CH=NH
- CHO
- CHO

Nombre del derivado

- N⁵-metil-THF
- N⁵, N¹⁰-metilón-THF
- N⁵, N¹⁰-metenil-THF
- N⁵-formimino-THF
- N⁵-formil-THF
- N¹⁰-formil-THF

grupo carboxilo del ácido glutámico mediante uniones γ -glutamil, estos compuestos se encuentran en las muestras biológicas en forma de derivados monoglutamato o poliglutamato (n = 1-6).

Los derivados de folato que actúan como coenzima en los sistemas biológicos, están sujetos a una serie de interconversiones a través de rutas metabólicas que tienen lugar en el citosol celular.

En animales superiores, las reacciones principales en las que intervienen los derivados de folato, las podemos resumir de la siguiente manera:

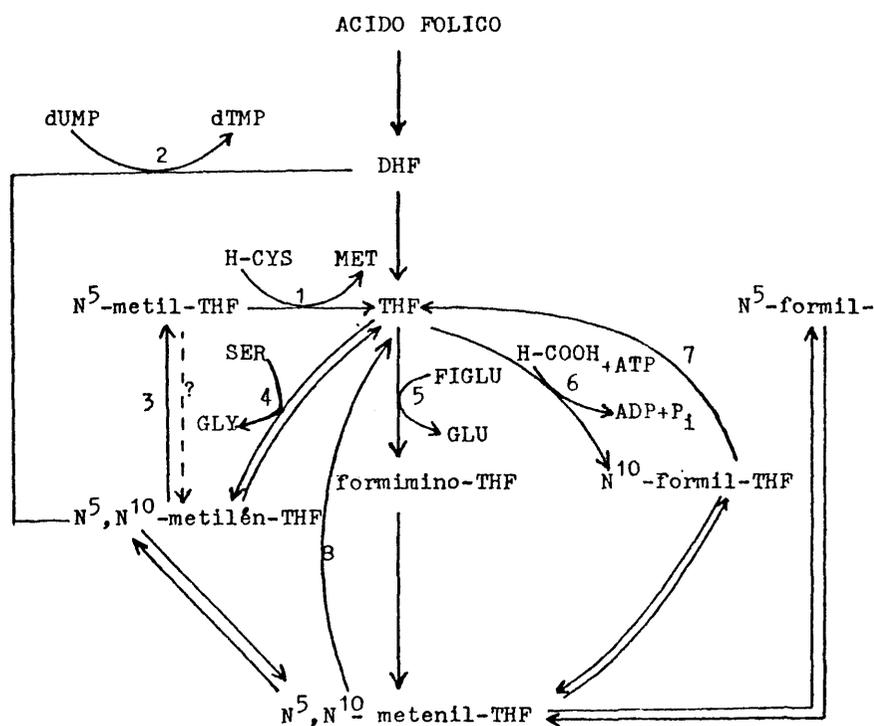
a) El ácido fólico es reducido en primer lugar a DHF, y posteriormente a THF, mediante un sistema de reductasas acopladas a NADPH.

b) El THF es el centro de las conversiones de los derivados de folato metabólicamente activos (N^5, N^{10} -metilen-THF, N^5, N^{10} -metenil-THF, N^{10} -formil-THF, formimino-THF), de manera que su ausencia origina un defecto en la síntesis de estos derivados.

c) Los folatos activos, una vez que han actuado como cofactores en las reacciones biológicas correspondientes, son reciclados de nuevo a THF, manteniéndose un equilibrio dentro del conjunto de folatos intracelulares.

En la Figura 4 están representadas las rutas metabólicas

FIGURA 4: RUTAS METABOLICAS PRINCIPALES DE LA INTERCONVERSION DE FOLATOS EN MAMIFEROS.



1. N^5 -metil-THF:H-CYS metil transferasa, dependiente de Me-Cbl.
2. timidilato sintetasa
3. N^5, N^{10} -metilén-THF reductasa.
4. serina transhidroximetilasa, dependiente de fosfato de pirodoxal (vitamina B_6).
5. formimino transferasa.
6. Via de utilización y regeneración del formiato.
7. Incorporación del carbono C_2 al anillo de purina.
8. Incorporación del carbono C_8 al anillo de purina.

principales de la interconversión de folatos en mamíferos.

La tasa de intercambio de las coenzimas de folato es muy elevada, siendo el N^5 -metil-THF el único derivado que se almacena y constituye la fuente de folatos en reserva. Este continuo intercambio depende de las actividades de las enzimas implicadas en las interconversiones, que a su vez están sujetas a la regulación por otros metabolitos, y por la relación de niveles de derivados monoglutamato/poliglutamato en la célula.

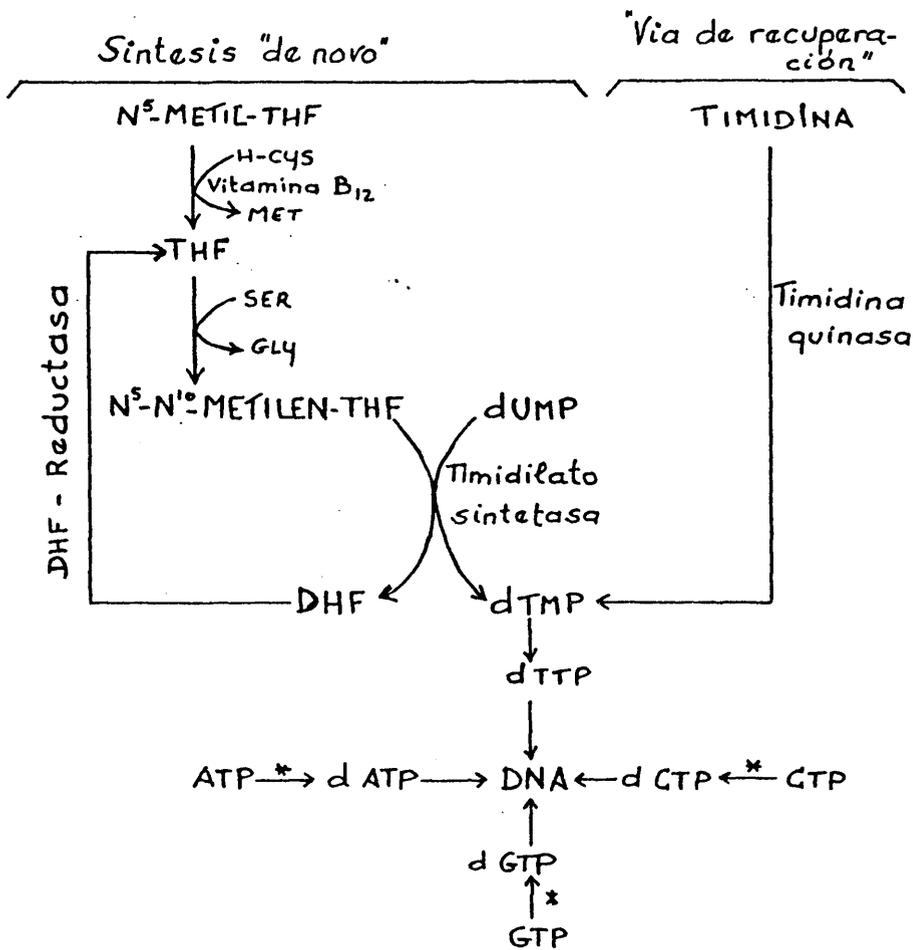
El folato en sangre circulante y en los líquidos intersticiales está en forma de monoglutamato, generalmente N^5 -metil-THF (52). El hígado es el órgano que actúa como reservorio corporal de folatos, y en él el metabolismo de los folatos es muy activo, siendo predominante el derivado N^5 -metil-THF poliglutamato (192).

I. 2.3. Timidilato sintetasa (E.C.2.1.1.45). Reacción que cataliza e importancia celular.

El timidilato (dTMP) y su trifosfato (dTTP) son nucleotidos con una importancia especial en la síntesis del DNA. Tres de los nucleotidos que actúan como sustrato de la DNA-polimerasa (dATP, dGTP y dCTP) se obtienen por reducción directa de sus correspondientes ribonucleotidos. Sin embargo, el cuarto nucleotido, el dTTP, es sintetizado por una ruta metabólica más compleja, que se encuentra representada en la Figura 5. ”

La enzima responsable de la conversión del dUMP en dTMP es la timidilato sintetasa (N^5, N^{10} -metilén-THF:dUMP C-metil-trans

FIGURA 5: REACCIONES METABOLICAS IMPLICADAS EN LA BIOSINTESIS DEL DNA.



(*) Ribonucleotido reductasa

ferasa) (E.C.2.1.1.45.).

En la Figura 6 está representado el esquema de la secuencia y el mecanismo hasta hoy día aceptado de la reacción catali-zada por la timidilato sintetasa (43). El isómero activo que actúa como sustrato es el (+) L-N⁵, N¹⁰-metilén-THF, que interviene como donador del grupo metilo, sufriendo una reducción duran-te su transferencia al C₅ del dUMP. Esta reducción se realiza mediante la liberación de un átomo de hidrógeno desde el C₆ del anillo de pteridina. El átomo de hidrógeno del C₅ del anillo de pirimidina se libera al medio. Durante la reacción el THF se oxi-da a nivel de DHF.

Estudios espectrofotométricos realizados para esclarecer la estequiometría de la reacción, han revelado que por cada mol de timidilato formado, se forma también un mol de DHF (44).

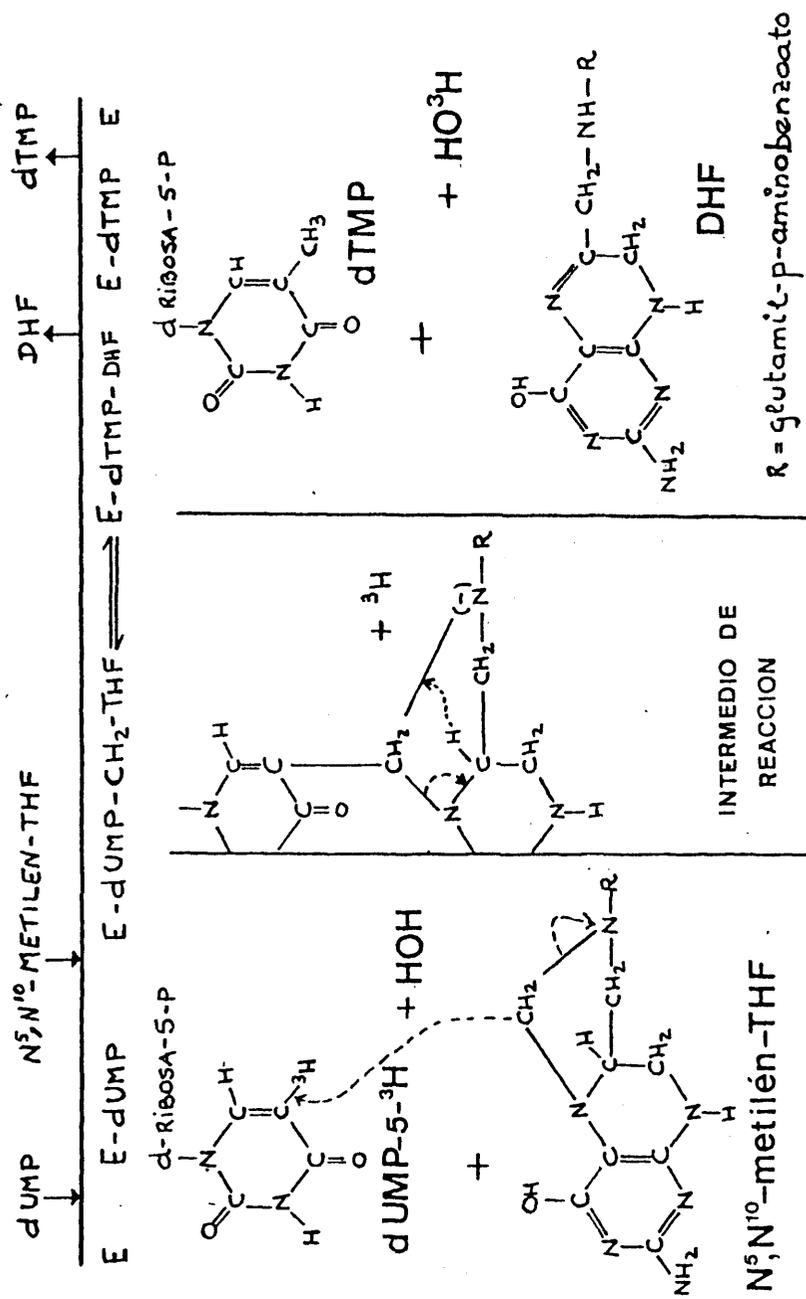
Tanto las células procarióticas como eucarióticas presen-tan muy bajos niveles de actividad de la timidilato sintetasa, excepto en aquellos estadios caracterizados por un aumento en la tasa de proliferación celular. En animales superiores, los tejidos normales que presentan mayores niveles de actividad son el timo de animales jóvenes y los tejidos embrionarios.

La importancia de la actividad de la timidilato sintetasa en el desarrollo de tejidos neoplásicos será estudiada a con-tinuación.

I. 2.4. El tumor necesita timidilato para la división celular.

El tumor es un tejido en crecimiento constante. Esto quie-re decir que en él la síntesis de DNA tiene lugar a una tasa ele-

FIGURA 6: SECUENCIA Y POSIBLE MECANISMO DE LA REACCION CATALIZADA POR LA TIMIDILATO SINTETASA



vada en comparación con la de cualquier tejido normal.

La síntesis de timidilato (dTMP) catalizada por la enzima timidilato sintetasa, es uno de los pasos limitantes en la biosíntesis del DNA, y de ahí le viene su importancia en el proceso del desarrollo del tumor.

1.2.5. El timidilato se sintetiza a través de 2 rutas metabólicas diferentes, mediadas por 2 enzimas cuyas actividades están incrementadas en aquellos estados caracterizados por un aumento de la tasa de proliferación celular.

La síntesis de dTMP tiene una importancia fundamental en la regulación de la síntesis del DNA, debido a ser un nucleotido específico del mismo, que no se encuentra en el RNA.

Como ya hemos dicho anteriormente, tres de los desoxirribonucleotidos que actúan como sustrato de la DNA-polimerasa (dATP, dGTP y dCTP) derivan de la reducción enzimática directa de sus correspondientes ribonucleotidos (Figura 5). Sin embargo, la síntesis de dTMP es más compleja. En casi todas las células de mamíferos existen 2 vías que conducen a la síntesis de dTMP:

a) La síntesis "de novo": consiste en la incorporación de un grupo metilo donado por el N^5, N^{10} -metilén-THF al dUMP. La enzima responsable de esta conversión es la timidilato sintetasa.

b) La "vía de recuperación": es la vía de fosforilación directa de la timidina, mediada por la enzima timidina quinasa (E.C.2.7.1.75).

En células de mamíferos, la ruta mayoritaria de síntesis de dTMP es la síntesis "de novo". Sin embargo, casi todas las células presentan actividad de timidina quinasa como ruta alternativa.

Durante los años 60, dos grupos de investigadores (45, 106) trabajando independientemente, observaron que la incorporación de timidina-³H al DNA por la "vía de recuperación", se inhibía cuando se añadía dUMP a cultivos de células normales en división. Dicha incorporación también se inhibía en presencia de dTTP. Estos resultados parecen indicar que tanto el dUMP como el dTTP desempeñan un papel regulador inhibiendo la actividad de la timidina quinasa.

En aquellos estados caracterizados por un aumento de la proliferación celular (tejidos fetales, hígado en regeneración, cultivos de células de médula ósea, cultivos de linfocitos estimulados con fitohemaglutinina y tejidos neoplásicos), se han encontrado niveles elevados de estas dos actividades enzimáticas a las que nos hemos referido (46-49).

I. 2.6 Tanto los folatos como la vitamina B₁₂ son necesarios para el desarrollo normal de la actividad de la timi-
dilato sintetasa.

Como ya hemos dicho en los apartados anteriores, el co-factor de la timidilato sintetasa es el N⁵, N¹⁰ -metilén-THF. Es un hecho demostrado (50) que la actividad de la timidilato sintetasa no se manifiesta en ausencia de N⁵, N¹⁰ -metilén-THF.

El THF, fuente de los derivados de folato metabólicamente activos, es el producto de una reacción enzimática dependiente de vitamina B₁₂. La reacción de desmetilación del N⁵-metil-THF y de sus correspondientes derivados poliglutamato, es el único mecanismo conocido capaz de suministrar THF para la formación del resto de derivados reducidos (51,52). En particular, los niveles de N⁵, N¹⁰-metilén-THF hepáticos dependen casi exclusivamente de dicha reacción, ya que la reacción catalizada por la N⁵, N¹⁰-metilén-THF reductasa (E.C.1.1.1.68) que convierte en el hígado el N⁵, N¹⁰-metilén-THF en N⁵-metil-THF, es prácticamente irreversible (53,54). Hace unos años surgieron dudas de la irreversibilidad de esta reacción, basadas en unos trabajos (55,56) sobre la metilación de aminas biógenas, en ausencia de MET-sintetasa dependiente de vitamina B₁₂. Estos trabajos parecían indicar que "in vivo" la reacción catalizada por la N⁵, N¹⁰-metilén-THF reductasa tenía lugar en ambas direcciones. Si esto fuera cierto, dicha reacción podría representar una ruta de escape al "atrapamiento de metil-folato" en los casos de deficiencia en vitamina B₁₂, y explicaría la ausencia de megaloblastosis descrita en algunos pacientes con aciduria metil-malónica y homocisteinuria, en los que el metabolismo del folato no parece estar alterado y no se detectan cambios megaloblásticos (58-60).

Sin embargo, en trabajos publicados en este último año (194,195) se considera que la actividad de la N⁵, N¹⁰-metilén-THF reductasa es irreversible.

Como ya hemos dicho anteriormente, la conversión del N⁵-metil-THF en THF está catalizada por la N⁵-metil-THF:H-CYS metil transferasa dependiente de Me-Cbl. Cualquier bloqueo en la actividad de esta enzima, ya sea en su componente proteico o en su cofactor (Me-Cbl), conduce a un descenso de niveles de THF metabólicamente activo, y en consecuencia la síntesis de bases púricas y de timidilato se ven afectadas.

I. 2.7 La hipótesis del "atrapamiento del Metil Folato" explica la regulación que la MET-sintetasa ejerce sobre los niveles de folato metabólicamente activos.

Una prueba de que la reacción catalizada por la MET-sintetasa es la reguladora de los niveles de derivados de THF transportadores de fragmentos de un carbono, la tenemos en la megaloblastosis originada en la anemia, perniciosa, consecuencia de un déficit de los niveles de vitamina B₁₂. La megaloblastosis producida por esta enfermedad, puede ser explicada mediante la hipótesis del "atrapamiento del metil Folato", propuesta por Herbert y Zalusky en 1962 (52), que se basa en la serie de reacciones que acabamos de explicar, y que podríamos resumir de la siguiente manera:

Debido a la carencia de Me-Cbl, la actividad de la metil transferasa queda bloqueada y se produce una acumulación de N⁵-metil-THF en el suero y en los tejidos (57). El "pool" de folatos reducidos queda por lo tanto "atrapado" a nivel del N⁵-metil-THF. Se considera que la megaloblastosis es el resultado de

una ausencia de actividad de la timidilato sintetasa, que da lugar a una inhibición en la síntesis del DNA, originando células de gran tamaño cuyo núcleo no puede dividirse.

Cualquiera que sea el mecanismo que conduce a la megaloblastosis, el defecto en la actividad de la timidilato sintetasa se manifiesta tanto en los casos debidos a una deficiencia en vitamina B₁₂, como en aquellos debidos a una carencia de folatos (51).

Aparte de los casos aportados por la anemia perniciosa, son numerosas las referencias encontradas en la literatura científica que muestran que la síntesis del DNA no tiene lugar en ausencia de vitamina B₁₂ y de folato (61-63,208).

I. 2.8. Validez actual de la hipótesis del "atrapamiento del metil-folato".

El no existir un modelo animal que permita el estudio experimental de la deficiencia en vitamina B₁₂, ha hecho que la hipótesis del "atrapamiento del metil-folato" (52) esté apoyada en resultados obtenidos en suero y orina de pacientes con anemia perniciosa.

El descubrimiento de que el gas anestésico NO₂ oxida la cobalamina convirtiéndola en una forma metabólicamente inactiva (196), ha permitido inducir un estado de deficiencia en vitamina B₁₂ en animales de experimentación, mediante la administración de este gas.

En los 2 últimos años se han realizado diversos estudios

(197-202) en hígado de ratas sometidas a una atmósfera de NO_2 que han mostrado que el NO_2 inactiva a la MET-sintetasa de células hepáticas, produciéndose una acumulación transitoria de N^5 -metil-THF poliglutamato, que se normaliza poco a poco, no detectándose un atrapamiento del metil-folato. Sin embargo, en dichos animales se detectan otros síntomas similares a los producidos por la anemia perniciosa, como son la disminución en la síntesis de poliglutamatos (203), elevación en el nivel de folato sérico (165) y una respuesta anormal en la prueba de incorporación de timidina- ^3H al DNA, posterior a la administración de d-Uridina- ^3H (204).

El hecho de que no se produzca un atrapamiento del metil-folato hepático, ha sido explicado por McGing y Scott (205) los cuales afirman que en los casos de deficiencia en vitamina B_{12} inducida experimentalmente por NO_2 , tiene lugar una reducción del folato total debida a una pérdida gradual del folato celular y no a un descenso en su captación, ya que al no tener lugar la síntesis de poliglutamatos (formas de almacenamiento del folato hepático), la célula no retiene los monoglutamatos, produciéndose una disminución en los niveles totales de folato.

En los últimos trabajos publicados (206-207) sobre la hipótesis del "atrapamiento del metil-folato", se confirma la validez de esta teoría. Incluso se ha sugerido que la reacción catalizada por la MET-sintetasa, en el hombre representa una defensa fisiológica normal ante un nivel deficitario de MET en la dieta. La deficiencia en MET produciría el descenso celular de

S-adenosil-MET y la alteración de las reacciones de metilación del organismo, lo cual en el caso de las metilaciones de la mie lina de las fibras nerviosas, podría originar un grave trastor no. En estas condiciones, los cofactores de folato celulares se invertirían preferentemente en la síntesis de MET a través de la MET-sintetasa, en detrimento del resto de las reacciones en las que intervienen los folatos.

Hasta aquí hemos establecido 3 condiciones metabólicas imprescindibles para que tenga lugar la síntesis de DNA, y por lo tanto la división celular:

- a) Disponibilidad de dTMP, condición dependiente de la actividad de la timidilato sintetasa.
- b) Disponibilidad de N^5, N^{10} -metilen-THF, imprescindible para el funcionamiento de dicha enzima.
- c) Disponibilidad de Me-Cbl, necesaria para que tenga lu gar la síntesis de MET, y proporcionar niveles adecuados de THF.

Este razonamiento nos ha conducido a interrogarnos sobre el desarrollo de este esquema metabólico en un tumor en creci- miento, y qué repercusión pudiera ejercer en el metabolismo ge- neral del huesped portador del tumor.

A continuación vamos a examinar qué estudios se han rea lizado hasta ahora sobre la influencia de la vitamina B_{12} y de

los folatos en el desarrollo del proceso tumoral.

I.3. VITAMINA B₁₂ Y PROCESO TUMORAL.

I.3.1. El contenido en vitamina B₁₂ de la dieta favorece el desarrollo de los tumores experimentales.

Ya en 1949 Oleson y Little (64) señalaron la gran influencia que tenía el contenido de la dieta en vitamina B₁₂ y folatos, sobre el desarrollo del sarcoma de Rous implantado en pollos. Dichos autores observaron que el tejido tumoral se desarrollaba más rápidamente en aquellos animales que recibían un suplemento de cualquiera de estas dos vitaminas en su dieta, en comparación con los animales sometidos a una alimentación estandar.

Desde entonces hasta la actualidad son numerosos los trabajos en los que se muestra que la actividad carcinogénica de varias sustancias químicas, está aumentada en animales de experimentación, en cuya dieta hay niveles altos de vitamina B₁₂ (65-67).

Sin embargo, revisando la literatura científica, hemos encontrado pocos casos (68,75-78) en los que se estudien los niveles de cobalamina en pacientes con cancer o en animales portadores de tumor. Hay que exceptuar todos aquellos estudios realizados en pacientes con leucemia, los cuales no hemos tomado en consideración, ya que en los casos de leucemia la alteración

hematopoyética puede originar irregularidades en los niveles de cobalaminas, que no son debidas exclusivamente a la proliferación celular.

I.3.2. Algunos enfermos de cancer presentan niveles altos de vitamina B₁₂ en suero.

En 1957 se describió que en pacientes aquejados con hepatoma los niveles séricos de vitamina B₁₂ se encontraban aumentados (68). Este hecho ha sido posteriormente confirmado (69), y se ha explicado como debido a la existencia de una "proteína ligadora de vitamina B₁₂" en el suero de pacientes con afecciones hepáticas malignas (70).

En 1975 Burger y col. (71) consiguieron aislar dicha proteína del plasma de 3 pacientes que padecían un carcinoma hepatocelular, e hicieron un análisis de las propiedades de la misma, llegando a la conclusión de que dicha proteína ligadora de vitamina B₁₂ pertenece al grupo de las "proteínas-R" (*), similares a las encontradas en la leche y en la saliva humana (72).

Dos grupos distintos de investigadores (71,73), traba-

(*) "Proteínas-R": término que se aplica a un determinado tipo de proteínas ligadoras de cobalamina, encontrado en varias secreciones fisiológicas de humanos y mamíferos (saliva, jugo gástrico, bilis, leche materna), caracterizadas por ser inmunológicamente idénticas y presentar una elevada movilidad electroforética, aunque pueden diferir en su peso molecular. Las "proteínas-R" se han demostrado funcional e inmunológicamente distintas de la transcobalamina II y del Factor Intrínseco (129).

jando independientemente, han encontrado que los hepatomas contienen cantidades muy elevadas de dicha proteína, e incluso se ha especulado con la posibilidad de que sea el propio tumor el que la sintetice, y posteriormente sea liberada a la sangre.

El aumento de vitamina B₁₂ en el suero de pacientes con hepatoma no tiene por que extrañar en principio, pues es conocido que muchos pacientes con enfermedades hepáticas de origen no maligno, presentan niveles elevados de vitamina B₁₂ en el suero (74).

Sin embargo, en 1977 Carmel y Eisenberg (75) encontraron niveles elevados de vitamina B₁₂ en el suero del 50% de los pacientes estudiados, portadores de distintos tipos de tumores no hematológicos, y algunos de ellos diferentes al hepatoma. Estos autores encontraron incluso una relación entre la elevación de la vitamina B₁₂ en el suero y la presencia de metástasis en diferentes órganos.

I.3.3 Los tumores experimentales contienen cantidades apreciables de vitamina B₁₂.

Estudios realizados en tumores experimentales han revelado la presencia en ellos de vitamina B₁₂.

En 1975 Pierce y col. (76) estudiaron la incorporación de cianocobalamina-⁵⁷Co a células del carcinoma ascítico de Ehrlich, y su conversión metabólica en otras formas de vitamina B₁₂.

Los autores encontraron que la radioactividad se incorporaba a las células tumorales y detectaron la existencia de cobalaminas metabólicamente activas (Ado-Cbl y Me-Cbl), que interpretaron como cobalaminas endógenas presentes en las células tumorales.

El grupo de Linnell, especializado en el estudio de las fracciones cobalamínicas en distintos tipos de enfermedades, ha realizado un excelente trabajo sobre la distribución de los cofactores de cobalamina en hígado y tumor de ratas portadoras de los hepatomas Morris 7777 y 7800 (77). Los autores detectaron la existencia de vitamina B₁₂ en estos dos tipos de hepatomas, a unos niveles más bajos que los correspondientes al hígado, y la presencia de una proporción apreciable de Me-Cbl en el mismo tejido tumoral.

Ya con anterioridad, en 1958 (78) y en 1962 (79) se había medido el contenido en vitamina B₁₂ en dos tipos de hepatoma de rata, resultando ser bajo.

I.3.4. Importancia de la Me-Cbl en el desarrollo de las neoplasias.

Linnell apunta ya la posibilidad de que la Me-Cbl sea la fracción de cobalamina que desempeñe un papel importante en el proceso neoplásico (77).

Posteriormente se ha observado que en ratones portadores

del adenocarcinoma Ca 755, la administración oral del complejo Me-Cbl: tricloruro de paladio (Me-Cbl:Pd) reduce la tasa de crecimiento del tumor, e interfiere con la captación de CN-Cbl por el tumor y con la síntesis intracelular de Me-Cbl y Ado-Cbl (80).

El hecho de que un análogo de Me-Cbl interfiera en el crecimiento tumoral es indicativo de la importancia de esta cobalamina en el desarrollo neoplásico.

Sin embargo, un dato que parece ser contradictorio con el nivel elevado de Me-Cbl en el tumor, es el aportado por varios trabajos que parecen indicar que la actividad de la enzima N⁵-metil-THF:H-CYS-metil-transferasa dependiente de Me-Cbl, es deficiente en células tumorales en cultivo.

En 1974 Halpern y col. (81) estudiando cultivos de diferentes tipos de células neoplásicas (Walker-256, células de leucemia linfática aguda de ratón L 1210, y células de leucemia monocítica humana J. 111), llegan a la conclusión de que las células malignas en cultivo se distinguen de las células normales adultas por su incapacidad para crecer cuando la H-CYS sustituye a la MET en medios que contienen tanto vitamina B₁₂ como ácido fólico. Comprobaron que dichas células malignas presentan escasa actividad de la enzima N⁵-metil-THF:H-CYS-metil-transferasa (82).

Los mismos autores (83) observaron que si se hace un cul

tivo con mezcla de células del carcinosarcoma Walker-256 y de células normales en presencia de MET y de un exceso de vitamina B₁₂ y de folato, las células neoplásicas sobrepasan en su crecimiento a las normales, y al cabo de dos semanas sólo hay células tumorales en el medio de cultivo. Pero si en estas condiciones se sustituye la MET por la H-CYS, las células tumorales mueren y sólo las células normales permanecen en cultivo.

La deficiente actividad de la MET-sintetasa junto con la necesidad de MET para la proliferación de las células neoplásicas (84), podría indicar que dichas células se valen de la MET, quizá a través de su conversión en S-adenosil-metionina, la cual es inhibidor alostérico de la N⁵, N¹⁰-metilén-THF-reductasa (E. C.1.1.1.68) de hígado de rata, haciendo así que disminuya el nivel de N⁵-metil-THF atrapado.

Aunque el papel de la Me-Cbl en la regulación del crecimiento celular no está bien establecido, son varias las evidencias que apoyan la existencia de esta relación. Se sabe que en el plasma humano fetal existen niveles elevados de Me-Cbl (85), lo mismo que en tejidos fetales (86). Por otra parte, se ha reportado que la Me-Cbl es el cofactor cobalamínico más efectivo en la restauración de la síntesis de timidilato en la médula ósea megaloblástica humana (87).

I. 4. FOLATOS Y PROCESO TUMORAL

Vamos a revisar a continuación los estudios realizados sobre el metabolismo de los folatos en relación con el crecimiento tumoral.

I.4.1. Los tumores necesitan folato para su crecimiento.

Al igual que sucedía con la vitamina B₁₂, los tumores experimentales crecen mejor cuando la dieta del huésped es rica en folato (64,68).

Por otra parte, el metabolismo de los folatos tiene una gran importancia en los tejidos en crecimiento rápido, ya que éstos requieren una alta disponibilidad de coenzimas de folato, imprescindibles para la donación de fragmentos de un carbono. Aparte de su función en la síntesis de timidilato, el N¹⁰-formil-THF y el N⁵, N¹⁰-metenil-THF intervienen respectivamente en la adición de los carbonos C₂ y C₈ del anillo de purina.

Se ha comprobado que durante el desarrollo de embriones de pollo, hay un aumento constante de las coenzimas de folato, particularmente en el día 12, cuando los procesos biosintéticos son más activos (89). El aumento simultáneo de las actividades enzimáticas implicadas en su biosíntesis, lleva a suponer que la gran demanda de folatos podría inducir a estas enzimas, para que sintetizaran las formas coenzimáticas pertinentes.

Experiencias realizadas en hígados en regeneración en

ratas (90), muestran que durante las primeras fases después de una hepatectomía parcial, el metabolismo del folato está modificado en comparación con el de las ratas normales. El contenido en N⁵-metil-THF desciende drásticamente inmediatamente después de la extirpación del tejido, lo cual puede ser debido al gran requerimiento de folatos activos.

El N⁵-metil-THF puede ser considerado como una forma de reserva de folato, a partir de la cual se obtienen las formas activas. La recuperación a concentraciones normales de las coenzimas de folato, que acontece pasadas las primeras horas después de la hepatectomía, indica una síntesis directa de las formas activas mediada por las enzimas específicas inducidas durante el proceso de regeneración, y el posterior aumento de su actividad se corresponde con la normalización del nivel de N⁵-metil-THF (90).

Un dato que apoya la necesidad de los cofactores de folato para el crecimiento de una neoplasia, es la relación existente entre la inhibición del crecimiento tumoral y el tratamiento con drogas antagonistas de folato.

La ametopterina, conocida también como metotrexato, es una droga con estructura análoga a la del ácido fólico, que actúa como inhibidor de la enzima DHF-reductasa (91,92). El tratamiento con ametopterina o drogas análogas detiene el desarrollo del tumor mediante una reducción de los niveles de THF metabólicamente activos, lo cual impide que tenga lugar la síntesis de timidilato.

I.4.2. Folatos en sujetos portadores de tumor.

Respecto al metabolismo de los folatos en animales portadores de tumores experimentales, se ha reportado la existencia de una deficiencia en folatos, manifestada por un aumento en la excreción urinaria de ácido formiminoglutámico (FIGLU), después de la administración de una dosis de histidina (93).

Por otra parte, en 5 tipos diferentes de hepatoma y en el carcinosarcoma Walker-256 se ha observado un descenso general de todas las enzimas implicadas en las reacciones de transferencia de un átomo de carbono (histidasa, urocanasa, FIGLU-transferasa, DHF-reductasa, serina-hidroximetilasa, N^5, N^{10} -metilén-THF reductasa y formilasa), en comparación con las actividades que dichas enzimas presentan en el hígado no tumoral (94).

También se han encontrado niveles bajos de cofactores de folato en tumores sólidos transplantables en relación con los niveles hepáticos de esta vitamina (95,96).

Poirier (93) concluye que esta deficiencia en folato que se presenta en animales portadores de tumores experimentales, pudiera ser debida a un requerimiento excesivo del grupo metilo en el sistema tumor-huesped.

Los datos más concluyentes sobre el metabolismo de los folatos en animales portadores de tumor, han sido aportados por el grupo de Barford y Blair (97,103), que han realizado diversos trabajos en ratas portadoras de tumor Walker-256. Dichos trabajos han consistido en la administración a las ratas de dosis

orales e intraperitoneales de ácido pteroilglutámico marcado con ^3H y ^{14}C . Pasado el tiempo de incorporación, se identificaron los metabolitos de folato en orina, hígado y tumor.

Según los resultados obtenidos, los derivados de folato mayoritarios en la orina de 24 horas de ratas portadoras del Walker-256 son el N^{10} -formil-folato y el N^{10} -formil-THF, mientras que en la orina de las ratas normales predomina la forma N^5 -metil-THF (99,104). Tanto en los hígados de las ratas normales como en los de las ratas portadoras de tumor, los folatos están en forma de derivados poliglutamato, siendo el N^{10} -formil-folato la forma mayoritaria (97-100, 102, 103). Sin embargo, en el tumor, el derivado mayoritario de folato corresponde a la forma reducida N^{10} -formil-THF, y se encuentra también en forma de poliglutamato (99, 101). Los autores no han detectado N^5 -metil-THF en el hígado, ni en el tumor.

Este estudio indica claramente que el metabolismo de los folatos en las ratas portadoras del carcinosarcoma Walker-256 muestra diferencias importantes respecto al de las ratas normales.

Los niveles séricos de N^5 -metil-THF parece ser que representan el "pool" de folatos a disposición de los tejidos, y se ha observado que su concentración aumenta o disminuye con los cambios de las condiciones fisiológicas del organismo (105).

En condiciones normales, los niveles de N^{10} -formil-THF

en el organismo se mantienen constantes (105), pero se ha observado que en ciertas condiciones patológicas caracterizadas por un aumento en la tasa de proliferación celular, los niveles de N¹⁰-formil-THF, medidos por su excrección urinaria, aumentan considerablemente (90, 95, 107). En estas condiciones parece probable que se produzca un mayor requerimiento de N¹⁰-formil-THF para la síntesis de las bases púricas de los ácidos nucleicos

Estos estudios realizados en animales de experimentación coinciden en líneas generales con los llevados a cabo en humanos. Se ha observado un aumento en la excrección urinaria de FIGLU en pacientes con diferentes tipos de enfermedades neoplásicas (Hodgkin, linfoma melanoma, cancer de pulmón, ovario, mama y lengua), después de haber sido sometidos a la administración de una dosis elevada de histidina (108). Esta excrección incrementada de FIGLU es síntoma de una ausencia en THF, y sugiere una anormalidad en el metabolismo de los folatos en los pacientes con cancer. Una explicación a esta deficiencia en THF podría residir en una nutrición escasa de los pacientes o en un aumento en la utilización de folato por el tumor.

Niveles de folato séricos inferiores a los normales han sido medidos en pacientes con linfoma maligno (109) y carcinoma (109-111). Exámenes de la médula ósea de algunos de estos pacientes, ha revelado la existencia de una eritropoyesis megaloblástica (112).

También se han hecho estudios de aclaramiento plasmático

de ácido fólico en 25 pacientes con diferentes tipos de tumores malignos, encontrándose una velocidad de aclaramiento superior a la normal en 23 de estos pacientes (113).

Todos estos síntomas que se originan en pacientes portadores de tumor (disminución de los niveles séricos de folato, tasa acelerada de aclaramiento plasmático y aumento en la excreción urinaria de FIGLU), apuntan a la posibilidad de que en las enfermedades neoplásicas se produzca una deficiencia en folato y/o un aumento en las demandas de este metabolito.

En trabajos recientes sobre el metabolismo de los folatos en enfermos con cancer (114,115) se ha observado que un estado de malignidad origina un mayor requerimiento de folatos por parte del individuo. Esto se traduce por una menor eliminación de folato en la orina, al mismo tiempo que se produce un metabolismo más rápido del folato hacia formas reducidas.

II. OBJETIVOS

A lo largo de la Introducción de este trabajo hemos tratado de fundamentar la necesidad de la vitamina B₁₂ y de los folatos por parte de la masa tumoral para su rápido crecimiento.

Nos preguntamos con Shapot (1) si al déficit de metabolitos esenciales producido por la presencia de la neoplasia (glucosa, glucógeno, depósitos grasos, compuestos nitrogenados), no se añadirá una "trampa de vitaminas" que prive a los sistemas enzimáticos del huesped de cofactores y grupos prostéticos esenciales.

Partiendo de la base de la necesidad de la vitamina B₁₂ y de los folatos por parte de las células tumorales en orden al rápido crecimiento de la neoplasia, y con objeto de profundizar más en el estudio de las relaciones metabólicas tumor-huesped, los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1.- Estudiar si la utilización de vitamina B₁₂ por parte del tumor provoca en el huesped un descenso en los niveles de la misma, principalmente en el hígado, órgano que se sabe actúa como reservorio de esta vitamina. Para ello se han medido los niveles totales de vitamina B₁₂ en suero e hígado de ratas portadoras del sarcoma sólido de Yoshida, en comparación con un grupo de animales control, así como en el propio tejido tumoral. La técnica utilizada ha sido el radioanálisis.

2.- Determinar si alguna de las fracciones específicas de cobalamina tuviera una relevancia especial en el desarrollo

del proceso neoplásico. Con este fin se ha realizado la separación cromatográfica y la cuantificación de las distintas fracciones de vitamina B₁₂ (OH-Cbl, Ado-Cbl, CN-Cbl y Me-Cbl).

Debido a la pequeña cantidad de las fracciones de cobalamina presentes en los tejidos de rata, se ha aplicado una técnica cromatobioautográfica consistente en una cromatografía en capa fina, seguida de revelado con el mutante NCIB 9270 de *E. coli*, caracterizado por crecer exclusivamente en medios donde está presente la vitamina B₁₂.

3.- Medir los niveles totales de folato en suero, hígado y tumor de los animales en estudio, relacionándolos con los de vitamina B₁₂ y con la actividad de la enzima timidilato sintetasa.

En resumen, el objetivo principal de esta Tesis es el estudio de la relación metabólica vitamina B₁₂-folatos-timidilato sintetasa en el animal portador de un tumor experimental.

En la actualidad, los escasos trabajos que existen sobre el tema, se limitan a hacer estudios independientes de vitamina B₁₂ ó de folatos en las neoplasias, sin haberse buscado una posible relación entre ellas, ni haberles considerado dentro del metabolismo general del huesped.

III. MATERIAL Y METODOS

III. 1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION. IMPLANTACION DE LOS TUMORES YOSHIDA Y WALKER-256.

Para todas las experiencias realizadas en este trabajo, se han utilizado ratas albinas de la línea original Wistar. Esta línea de ratas presenta la cualidad de ser buena receptora del carcinosarcoma Walker-256 y del sarcoma sólido de Yoshida.

Se han utilizado ratas macho, de 2 a 3 meses de edad y de pesos comprendidos entre 200 y 250 g. Un grupo de estos animales ha sido usado como control, mientras que otro grupo de características similares ha sido utilizado para la implantación de los tumores experimentales.

Los trasplantes se han realizado por vía subcutánea en la axila derecha. El paso de la línea tumoral de unos animales a otros, se realiza cada 10 días. Las células neoplásicas se conservan a 0°C durante el breve tiempo transcurrido entre la extirpación del tumor y su implantación en un nuevo huesped. Para la realización del trasplante se seleccionaron porciones de tumor sin necrosis aparente. La supervivencia máxima media de los animales portadores del sarcoma sólido de Yoshida es de 12 días y la de los animales portadores del carcinosarcoma Walker-256 es de 15 días.

Estos animales recibieron una dieta estandar del tipo "Dieta Completa A.03" (Laboratorios Panlab, Barcelona). En la

Tabla I se encuentra recogida la composición de esta dieta. Tanto la comida como el agua fueron suministradas "ad libitum".

Salvo que si indique lo contrario, las determinaciones bioquímicas se han realizado en el noveno día después del trasplante del tumor Yoshida, y entre los días 12 y 13 después del trasplante del tumor Walker-256. Los animales fueron mantenidos en ayuno 16 horas antes de ser sacrificados, para evitar modificaciones en el nivel de vitaminas séricas, producidas por la dieta recién ingerida.

La hora de la muerte de los animales se fijó entre las 10 y las 11 de la mañana para todas las experiencias.

III. 2. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE VITAMINA B₁₂ MEDIANTE UNA TECNICA DE RADIOANALISIS.

Para la medida de los niveles totales de vitamina B₁₂ en el suero de las ratas, hemos utilizado el método de radioanálisis de Matthews y col. (116), adaptándolo a los tejidos para la obtención de las medidas en hígado y tumor.

III. 2.1. Reactivos.

Salvo que se indique lo contrario, todos los reactivos utilizados han sido productos para análisis de Merck.

- Tampón acetato-cianuro, pH 4.5, NaOH 0.3 M, KCN 0.6 mM.

La disolución se ajusta a pH 4.5 con ácido acético glacial.

- Disolución salina: se diluye un volumen de NaCl al 0.85%

TABLA I: COMPOSICION DE LA DIETA DE LAS RATAS

Dieta Completa A.03. Laboratorios Panlab, Barcelona.

FORMULA %

Cereales, azúcar, materias grasas	69
Proteínas vegetales (turtó, levadura)	11.5
Proteínas animales (pescado, leche)	15.5
Complemento vitamínico-mineral	4

ANALISIS MEDIO %

Valor calorífico (en calorías/kg)	3200
Humedad	12
Prótidos	23.5
Lípidos	5
Glúcidos (E.L.N.)	49.8
Celulosa (Weende)	4
Minerales	5.7

AMINOACIDOS (Calculados en mg/kg).

Arginina	14900
Cistina	3000
Lisina	14600
Metionina	4800
Triptófano	2600
Glicina	12700

TABLA I: COMPOSICION DE LA DIETA DE LAS RATAS (Continuación)

MINERALES (calculados en mg/Kg).

	<u>Origen natural (medio)</u>	<u>Complemento</u>	<u>Totales</u>
P	7800	0	7800
Ca	8400	0	8400
K	7500	0	7500
Na	1870	1500	3370
Mg	1590	130	1720
Mn	27	40	67
Fe	130	150	280
Cu	13.5	15	28.5
Zn	19	45	64
Co	0.06	1.5	1.56
I	aportado en forma asimilable por algas marinas		

VITAMINAS (Calculadas por Kg).

	<u>Origen natural (medio)</u>	<u>Complemento</u>	<u>Totales</u>
Vitamina A	1800 U.I.	15000 U.I.	16800 U.I.
Vitamina D ₃	34 "	4000 "	4034 "
Vitamina B ₁	6 mg	2 mg	8 mg
Vitamina B ₂	4 mg	9 mg	13 mg
Vitamina B ₃	14 mg	13 mg	27 mg
Vitamina B ₆	2 mg	1.5 mg	3.5 mg
Vitamina B ₁₂ (en forma de CN-Cbl)	0.021mg	0.02mg	0.041mg
Vitamina C	17mg	30 mg	47 mg
Vitamina K ₃	1.2mg	4.5mg	5.7mg
Vitamina PP	58 mg	30 mg	88 mg
Acido Fólico	0.9 mg	0	0.9mg "
Biotina	0.7 mg	0	0.07mg
Colina	1300 mg	800 mg	2100 mg

(p/v), con 6 volúmenes de tampón acetato-cianuro pH 4.5.

- Ciano-(⁵⁷Co)-cobalamina: actividad específica = 100-300 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. Solución acuosa que contiene 0.9% (p/v) de benzol; 10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$; 0.0454 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (Radiochemical Centre, Amersham).

- Disolución de ciano -(⁵⁷Co)-cobalamina, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en tampón acetato-cianuro, pH 4.5. Esta disolución, fraccionada en alícuotas de 1 ml, es estable un mes a -20°C .

- Disolución estandar concentrada de cianocobalamina, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en tampón acetato-cianuro, pH 4.5. Cianocobalamina (producto puro de referencia para cromatografía y espectroscopía, Laboratorios Glaxo. Greenford, Middlesex, Inglaterra). Almacenada a 4°C esta disolución es estable 8 semanas.

- Disolución estandar de cianocobalamina: se prepara una disolución de cianocobalamina de 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en agua destilada, y a partir de ella se preparan 6 disoluciones estandar cuyas concentraciones son las siguientes: 12.5, 25, 50, 100, 200 y 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Estas disoluciones deben ser preparadas en cada nuevo ensayo.

- Proteína ligante: se utiliza Factor Intrínseco (F.I.) contenido en suero de rata. Se separa el suero de unas 10 ratas normales, de características similares a las utilizadas en las experiencias. Se divide en alícuotas de 1 ml y se conserva congelado a -20°C . No deben ser utilizados sueros que lleven más de 3 meses almacenados. En el día del ensayo, se diluye un ml de suero con 0.3 ml de disolución de KCN 40 mg% (p/v) en agua

destilada.

- Suspensión de carbón activo: Contiene 5 g% (p/v) de carbón activo (lavado con ácido, Sigma) y 0.5 g% (p/v) de albúmina bovina (Sigma).

III.2.2. Método experimental

III.2.2.1. Muerte de los animales de experimentación

Se han utilizado ratas portadoras de sarcoma sólido de Yoshida, a los 9 días de haberles sido transplantado el tumor.

Las muestras de sangre fueron extraídas de la vena suprahepática, bajo anestesia etérea. Tanto la recolección de la sangre como la extirpación del hígado y del tumor, se llevaron a cabo en obscuridad, en presencia de luz roja, para prevenir la descomposición fotolítica de los cofactores de cobalamina. El suero y los tejidos fueron envueltos en papel de aluminio y conservados a -20°C hasta el momento de su utilización.

En todos los animales se realizó la determinación de hemoglobina total, por el método de la cianometahemoglobina (117), mediante la extracción de una pequeña muestra de sangre (20 µl) del rabo del animal.

III.2.2.2. Preparación de las muestras de suero, hígado y tumor »

Alícuotas de hígado (100-200 mg) y de tumor (400-500 mg) fueron homogeneizadas en agua destilada en un homogeneizador

Potter-Elvehjem en presencia de luz roja, según el método descrito por Quadros y col. (118). El volumen final se ajustó a 10 ml. Un ml de estos homogeneizados, así como 1 ml de cada una de las muestras de suero, fueron desproteinizados en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos, con 6 ml de tampón acetato-cianuro pH 4.5. De esta manera, todas las formas de cobalamina presentes en las muestras (Ado-Cbl, Me-Cbl, CN-Cbl y OH-Cbl) se transforman en la forma CN-Cbl.

Los sobrenadantes de los desproteinizados se utilizaron para la determinación cuantitativa del contenido total de vitamina B₁₂ en cada una de las muestras.

III.2.2.3. Radioanálisis de vitamina B₁₂

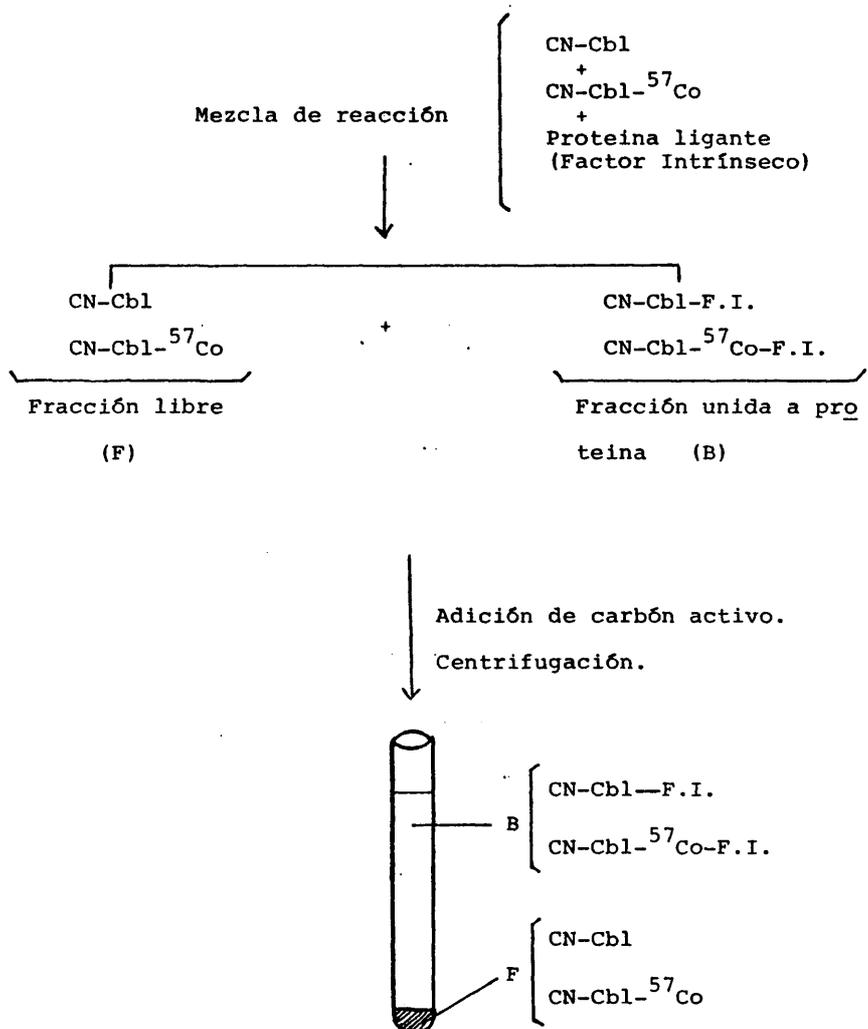
El Cuadro I representa un esquema del fundamento del método de radioanálisis de vitamina B₁₂.

El Cuadro II muestra los detalles de la técnica seguida para la determinación del contenido de vitamina B₁₂ en los desproteinizados procedentes de las muestras de suero, hígado y tumor.

III.2.3. Discusión del método

Las primeras técnicas utilizadas para la determinación de los niveles de vitamina B₁₂ en suero, datan de los años 50 y son técnicas microbiológicas basadas en la capacidad que presentan algunos microorganismos (*Lactobacillus leichmannii*, Eu-

CUADRO I: FUNDAMENTO DEL METODO DE RADIOANALISIS PARA LA DE-
TERMINACION DE VITAMINA B₁₂.



CUADRO II: DESARROLLO DEL PROCESO DE RADIOANALISIS PARA LA DE-
TERMINACION DE VITAMINA B₁₂.

<u>Tubos estandar</u>	<u>Tubos problema</u>
1 ml de disolución estandar	1 ml de extracto de suero ó de tejido.
20 µl de CN-Cbl- ⁵⁷ Co	20 µl de CN-Cbl- ⁵⁷ Co
25 µl de proteína ligante (F.I.)	25 µl de proteína ligante (F.I.)



Se agitan los tubos.
Reposo 1 hora a T ambiente.
Reposo 1 hora a 4º C.
Adición de 100 µl de suspensión de carbón
activo.
Mezcla por rotación, 30 minutos, 4º C.
Centrifugación 1500xg, 20 minutos, 4º C.
Separación de las fracciones libre (F)
y unida a proteína (B).
Lectura de la cpm de las fracciones
F y B en un contador de radiación γ
(Nuclear Chicago, Modelo 1185-6).

glena gracilis) para crecer en presencia de vitamina B₁₂. Estas técnicas tienen el inconveniente de tener una sensibilidad relativamente baja, que hace no sean apropiadas para la determinación de los niveles de vitamina B₁₂ en tejidos, en los cuales la cantidad de cobalamina presente es muy pequeña, del orden de pg.

En los últimos años se han descrito muchos métodos de radioanálisis para la determinación de la vitamina B₁₂ en suero. Algunos de estos métodos utilizan F.I. como proteína ligante (119-121), y otros utilizan suero (122-124). En principio, estos métodos presentan grandes ventajas sobre los ensayos microbiológicos, aunque algunos de ellos se han mostrado de ardua realización, con inconvenientes técnicos inesperados, y han proporcionado resultados inferiores a los reales (125).

Después de estudiar detenidamente todos estos métodos mencionados, hemos encontrado que el método de radioanálisis utilizado por Matthews y col. (116) es preciso y específico, de fácil desarrollo, y proporciona resultados muy similares a los obtenidos con los métodos microbiológicos.

La mayor ventaja que presenta este método respecto a otros anteriores, reside en el proceso de extracción al que se someten las muestras, calentándolas a 100°C con un tampón acetato-cianuro pH 4.5. La vitamina B₁₂ es resistente a esta temperatura elevada, y no sufre alteraciones durante el curso de la extracción. Durante este proceso, todas las formas de vitamina B₁₂ presentes en las muestras se convierten en la forma CN-Cbl, bajo la cual

son determinadas en el radioanálisis. En éste se utiliza como trazador CN-Cbl-⁵⁷Co y como estandar frío CN-Cbl, por lo que todas las formas de vitamina presentes en el tubo de radioanálisis para competir en su unión con la proteína ligante, son idénticas.

Se ha demostrado que cuando en el proceso de extracción de la vitamina B₁₂ del suero no está presente el ión cianuro, los porcentajes de recuperación de la vitamina son muy bajos, probablemente debido a la absorción de algunas de las formas de la vitamina B₁₂ en el precipitado de proteínas séricas (126).

Para nuestras experiencias hemos escogido este método de radioanálisis, por su gran especificidad para la vitamina B₁₂ y por su sencillez en comparación con los métodos microbiológicos. La correspondencia entre los resultados de muestras procesadas por esta técnica y por el método microbiológico del *Lactobacillus leichmannii* es muy grande (116), e incluso el rango de normalidad obtenido por el método de radioanálisis es ligeramente menos disperso que el obtenido por el ensayo microbiológico, lo cual pudiera ser reflejo de una disminución del error experimental.

Por otra parte, la utilización del radioanálisis de la vitamina B₁₂ en el diagnóstico clínico, elimina errores ocasionados por el tratamiento a los pacientes con antibióticos y otros fármacos que inhiben el crecimiento de los microorganismos en las muestras ensayadas.

Creemos interesante destacar 3 aspectos importantes para el desarrollo de cualquier técnica de radioanálisis para la de-

terminación de vitamina B₁₂:

a) Es conveniente utilizar suero en vez de plasma. Este último puede ser utilizado con la condición de que no contenga heparina. La heparina es resistente a la destrucción por el calor y al medio ácido, y se une a la vitamina B₁₂ sérica proporcionando una fuente de error que conduce a resultados inferiores a los verdaderos (121).

b) La separación de las fracciones libre (F) y unida a proteína (B) debe realizarse con una suspensión de carbón activo en la que es indispensable la presencia de albúmina u otras moléculas proteicas (hemoglobina). El carbón activo por sí sólo absorbe tanto la vitamina B₁₂ libre como la unida a proteína (121).

Al ensayar la concentración de albúmina óptima que debe ir presente en la suspensión de carbón activo, hemos encontrado que la utilizada por los autores del método (5 g%) es muy alta, proporcionando un grado de ligamiento inespecífico del 22.5%.

Hemos realizado la medida del ligamiento inespecífico para diversas concentraciones de albúmina en la suspensión precipitante, desde 0.4 a 5 g% y hemos obtenido valores óptimos cuando la concentración de albúmina está comprendida entre 0.4 y 0.6 g%. En estas condiciones el grado de ligamiento inespecífico es inferior al 0.75%.

c) Existe una controversia sobre la utilización de las

"proteínas R" (*) como proteína ligante de vitamina B₁₂. En el suero de mamíferos existen análogos de cobalamina diferentes de la vitamina B₁₂ (118,209), que pueden enmascarar la existencia de una deficiencia en esta vitamina cuando se utilizan proteínas ligantes de cobalamina que no son específicas para la auténtica vitamina (127). Las denominadas "proteínas R" se unen tanto a la vitamina B₁₂ como a los análogos de cobalamina (128), proporcionando en el radioanálisis resultados más elevados que los reales.

No hay evidencia cierta de que el suero humano contenga análogos de cobalamina (186,187), por lo que algunos autores de métodos de radioanálisis de vitamina B₁₂ (188,189) defienden que las "proteínas R", utilizadas como proteína ligante de vitamina B₁₂, son igual de válidas que el F.I., y achacan la diferencia de resultados a factores no identificados (189).

La utilización de F.I. como proteína ligante de vitamina B₁₂, tiene la gran ventaja de que el F.I. es altamente específico para la verdadera cobalamina (128), eliminando la posible interferencia de los análogos de cobalamina en los ensayos en los que se utiliza.

El origen de estos análogos de cobalamina presentes en el suero no se conoce. Pueden proceder de restos de componentes de la síntesis microbiana de vitamina B₁₂ que tiene lugar en el organismo, o bien pueden ser derivados químicos o enzimáticos de la verdadera cobalamina, antes o después de su absorción (128).

(*) Proteínas R: ver página 33 de la Introducción.

Es importante conocer la interferencia de las "proteínas R" en los métodos de radioanálisis de la vitamina B₁₂, debido a que muchos preparados comerciales para dicho radioanálisis, contienen de un 50 a un 80% de "proteínas R" como proteína ligante de vitamina B₁₂ (74).

En las últimas revisiones publicadas sobre los métodos de radioanálisis de vitamina B₁₂ (190,191), se aconseja que para aquellos análisis destinados al diagnóstico clínico, se utilice F.I. como proteína ligante de vitamina B₁₂, o bien "proteínas R" previamente bloqueadas con cónbinamidas.

III.2.4. Control del método.

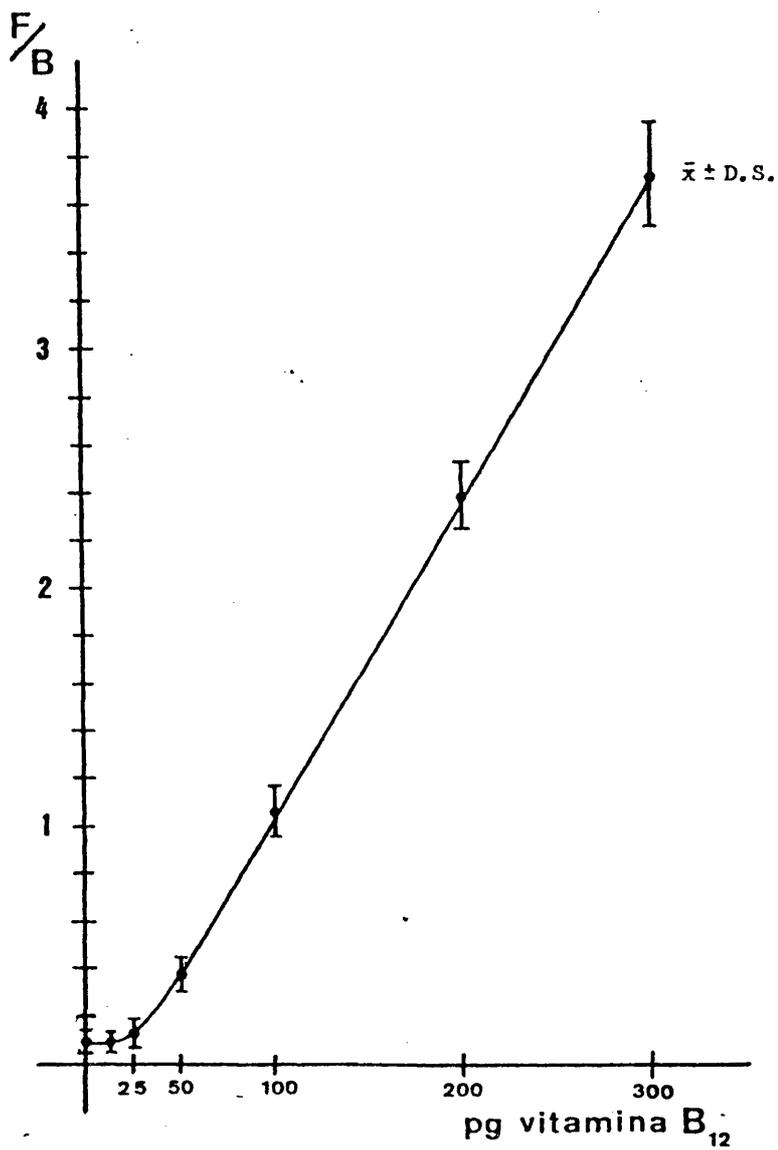
Durante la puesta a punto del radioanálisis para la determinación de los niveles totales de vitamina B₁₂ en suero, hígado y tumor, de ratas normales y portadoras de neoplasia, hemos realizado los siguientes controles:

III.2.4.1. Reproducibilidad de la curva estandar

En la Gráfica 1 se presenta las variaciones obtenidas en la curva estandar en 15 experiencias diferentes. Se ha representado el valor $\bar{x} \pm D.S.$ del cociente F/B correspondiente a cada concentración.

La precisión en cada punto de la curva estandar ha sido estudiada mediante el cálculo del coeficiente de variación

$(\frac{D.S.}{\bar{x}} \times 100)$. Los coeficientes de variación obtenidos son los siguientes:



GRAFICA 1: RADIOANALISIS DE VITAMINA B₁₂.
VARIACION DE LA CURVA ESTANDAR EN DIFERENTES EXPERIENCIAS.
(n=15)

	<u>Pg de vitamina B₁₂</u>	<u>Coef. de variación</u>
Estandar-0	0	20%
Estandar-1	12.5	20%
Estandar-2	25	15%
Estandar-3	50	18%
Estandar-4	100	10%
Estandar-5	200	5%
Estandar-6	300	5%

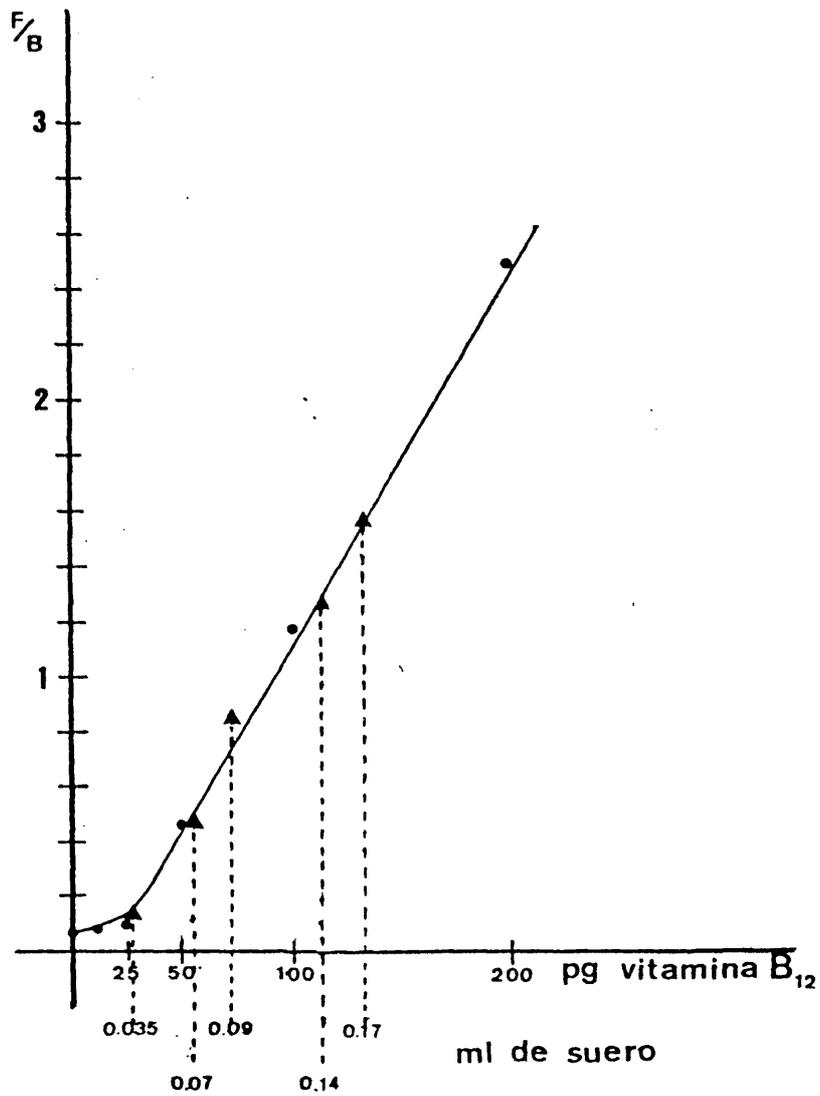
Hemos establecido como zona de trabajo la comprendida entre las concentraciones de 50-300 pg de vitamina B₁₂.

III.2.4.2. Curvas de dilución de suero y tejidos.

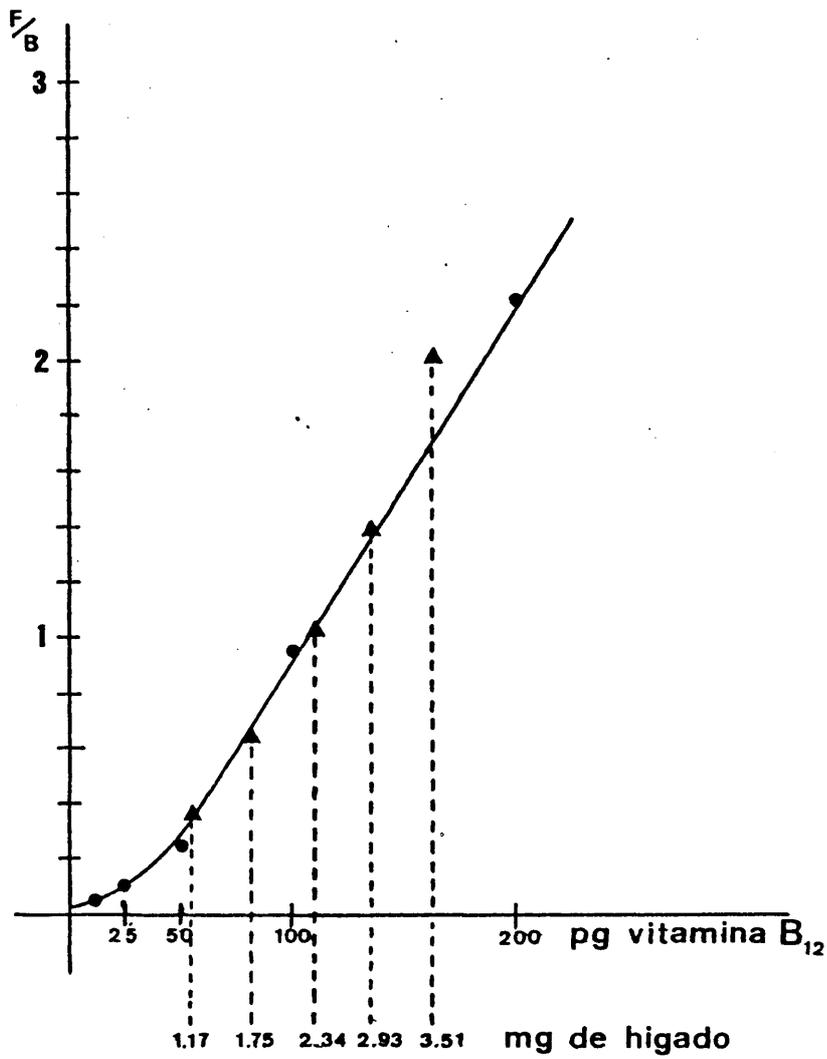
En la Gráfica 2 está representada la curva de dilución del suero. Se han ensayado 5 diluciones distintas, S₁, S₂, S₃, S₄ y S₅ que se corresponden con una cantidad de suero en el tubo de ensayo de 0.035 ml, 0.07 ml, 0.09 ml, 0.14 ml y 0.17 ml respectivamente. Hemos obtenido una buena correspondencia con la curva estandar en todas las diluciones ensayadas.

Para el análisis de las muestras hemos escogido la dilución correspondiente a 0.14 ml de suero en el tubo de radioanálisis.

En la Gráfica 3 está representada la curva de dilución de hígado. Hemos estudiado 5 diluciones del homogeneizado H₁, H₂, H₃, H₄ y H₅ que equivalen a 1.17 mg, 1.75 mg, 2.34 mg, 2.93 mg y 3.51mg³ de tejido hepático húmedo en el tubo problema. Excepto la dilución H₅, todas las demás diluciones se corresponden perfectamente con el



GRAFICA 2: RADIOANÁLISIS DE VITAMINA B_{12} . CURVA ESTANDAR (•)
Y CURVA DE DILUCION DE SUERO (▲).



GRAFICA 3: RADIOANALISIS DE VITAMINA B₁₂. CURVA ESTANDAR (●) Y CURVA DE DILUCION DE HIGADO (▲).

perfil de la curva estandar en el intervalo comprendido entre los 50 y 200 pg. de vitamina B₁₂. Hemos escogido la dilución H₃ (2.34 mg de tejido hepático húmedo/tubo) para el procesamiento de la muestra.

En la Gráfica 4 está representada la curva de dilución del tumor. Hemos analizado 4 diluciones, T₁, T₂, T₃ y T₄ del homogeneizado del tejido tumoral Yoshida, que equivalen respectivamente a la cantidad de 40 mg, 53.4 mg, 66.75 mg y 80.10 mg de tejido tumoral húmedo en el tubo de radioanálisis. Todos los puntos medidos se corresponden con la zona de proporcionalidad de la curva estandar. Para las experiencias hemos escogido la dilución T₂ (53.4 mg de tejido tumoral húmedo/tubo).

III.2.4.3. Ligamento inespecífico.

El valor medio que hemos obtenido del ligamento inespecífico, calculado como el porcentaje de cpm en el sobrenadante (fracción ligada a proteína) respecto al total de cpm, ha sido de 0.61 %.

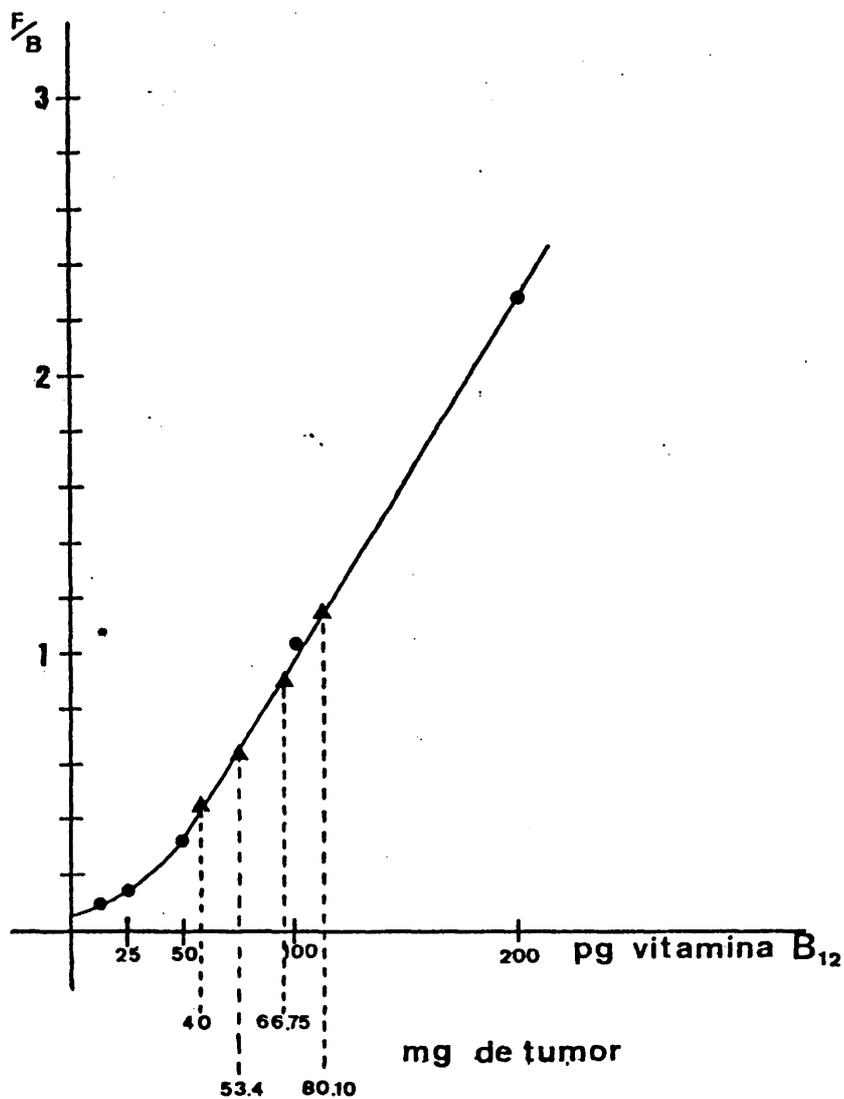
III.2.4.4. Recuperación del método.

Se ha medido el porcentaje de CN-Cbl recuperada, al añadir 50, 100 y 150 pg de CN-Cbl fría a muestras de suero e hígado.

La proporción de vitamina B₁₂ recuperada la hemos calculado mediante el cociente:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{vitamina B12 ensayada} \times 100}{\text{vitamina B12 endógena} + \text{vitamina B12 añadida}}$$

Las recuperaciones que hemos obtenido han sido las siguientes:



GRAFICA 4: RADIOANALISIS DE VITAMINA B₁₂. CURVA ESTANDAR (●) Y CURVA DE DILUCION DE TUMOR (▲).

<u>Suero:</u>	<u>pg de CN-Cbl añadidos</u>	<u>% de Recuperación</u>
	50	94%
	100	101%
	150	84%
<u>Hígado:</u>	50	105%
	100	97%
	150	98%

III.2.4.5 Reproducibilidad intra-análisis e inter-análisis.

Una misma muestra ha sido procesada 4 veces dentro del mismo ensayo, con el fin de obtener el valor de la reproducibilidad intra-análisis del método.

Los valores obtenidos en el tejido hepático son los siguientes:

- a) 75.76 pg vitamina B₁₂/mg tejido hepático húmedo.
- b) 74.11 " "
- c) 72.28 " "
- d) 79.61 " "

$$\bar{x} \pm \text{D.S.} = 75.44 \pm 3.12$$

$$\text{Coeficiente de variación} = 4.13\%$$

Los valores obtenidos en el tejido tumoral son los siguientes:

- a) 9.50 pg vitamina B₁₂/mg tejido tumoral húmedo.
- b) 9.70 " "
- c) 9.80 " "
- d) 10.48 " "

$$\bar{x} \pm \text{D.S.} = 9.87 \pm 0.42$$

$$\text{Coeficiente de variación} = 4.25\%$$

Se ha estudiado la dispersión de valores obtenida con el método, para la misma muestra medida en ensayos diferentes (Reproducibilidad inter-análisis).

Las variaciones en el valor de vitamina B₁₂ obtenidos en 2 ensayos diferentes son:

- Suero: a) 630 pg vitamina B₁₂/ml de suero.
b) 621 pg vitamina B₁₂/ml de suero.
Coeficiente de variación= 1.02%
- Hígado: a) 129 pg vitamina B₁₂/mg tejido hepático húmedo.
b) 149 " " "
Coeficiente de variación= 10.17%
- a) 79 pg vitamina B₁₂/mg tejido hepático húmedo.
b) 75 " " "
Coeficiente de variación= 3.67%
- Tumor: a) 8.87 pg vitamina B₁₂/mg tejido tumoral húmedo
b) 9,39 " " "
Coeficiente de variación= 4.03%
- a) 13.02 pg vitamina B₁₂/mg tejido tumoral húmedo
b) 13.75 " " "
Coeficiente de variación= 3.85%

Aunque estos porcentajes de variación son permitidos dentro de los ensayos de radioanálisis, para minimizar en lo posible estos errores, se han procesado siempre dentro del mismo ensayo, un grupo de muestras procedentes de ratas control junto con las muestras correspondientes de las ratas portadoras de tumor.

III.3. DETERMINACION DE LAS DIFERENTES FRACCIONES DE COBALAMINA EN SUERO, HIGADO Y TUMOR DE RATAS PORTADORAS DE SARCOMA SOLIDO DE YOSHIDA.

La determinación de las diferentes fracciones de cobalamina (Ado-Cbl, Me-Cbl, CN-Cbl, OH-Cbl) se ha realizado por el método cromatobiautográfico de Linnell y col. (130)

En 1963 Lindstrand y Stahlberg (131) mostraron por vez primera que el plasma humano contenía varios tipos de cobalamina con diferente actividad microbiológica. Los autores utiliza-

ron una técnica de cromatografía en papel y bioautografía. Es-
tos tipos de cobalamina fueron identificados como Ado-Cbl, Me-
Cbl, CN-Cbl y OH-Cbl (131,132).

La separación de las fracciones de la vitamina B₁₂ ha pre-
sentado siempre grandes dificultades técnicas, debido a los ba-
jísimo niveles de esta vitamina presentes en la sangre y tejidos
del organismo (del orden de pg), lo cual hacía imprescindible
la utilización de volúmenes elevados de las muestras.

El método que hemos empleado (130) está basado en la pro-
piedad que tiene el mutante NCIB 9270 de Escherichia coli de
crecer exclusivamente en presencia de vitamina B₁₂. Esto permi-
te que después de la separación de las cobalaminas mediante una
cromatografía en capa fina, puedan visualizarse las manchas re-
velando las placas con un cultivo del mutante.

El Dr. J.C. Linnell, autor de este método, nos ha donado
una muestra liofilizada del mutante, lo cual nos ha permitido
poder realizar este trabajo.

III.3.1. Reactivos.

- Etanol absoluto, para análisis (Merck).
- Eter etílico, para análisis (Merck).
- Fenol, para análisis (Merck).
- Acetona, para análisis (Merck).
- Hidroxido amónico, para análisis (Merck).
- Sec-butanol, para análisis, Merck.
- Resina de cambio iónico Dowex-50 (AG 50w-x8, 100-200 mesh)

Laboratorios BioRad.

- Cloruro de 2,3,5 trifenil tetrazolio. (Merck).

- Adenosil-cobalamina, Metil-cobalamina, Ciano-cobalamina e Hidroxicobalamina: productos puros de referencia para cromatografía y espectroscopía. Laboratorios Glaxo, Greenford, Middlesex, Inglaterra.

- Disolución concentrada de cada estandar de cobalamina, (1 mg/ml), en agua destilada.

- Disolución de trabajo de cada estandar de cobalamina, (10 ng/ml), preparada a partir de la disolución concentrada del estandar correspondiente. El volumen de 5 µl que se aplica a la placa de cromatografía, contiene 50 pg de cobalamina.

- Disolución de trabajo de la mezcla de las 4 cobalaminas estandar: 5 µl de esta disolución que se toman para la aplicación en la placa de cromatografía, contienen 50 pg de cada una de las 4 cobalaminas.

- Medio de cultivo para el mutante NCIB 9270 de Escherichia coli: está constituido por dos partes que se preparan y almacenan por separado:

a) preparado de agar: contiene 3 g de agar bacteriológico en 100 ml de agua destilada. Se esteriliza en el autoclave y se almacena a T ambiente.

b) Mezcla de sales minerales:

Fosfato dipotásico hidrogenado.....	1.4 g
Fosfato potásico dihidrogenado.....	0.6 g
citrato sodico dihidrogenado.....	0.1 g

Sulfato magnésico heptahidratado.....	0.02 g
Sulfato amónico.....	0.2 g
Cloruro sódico.....	0.01 g
Agua destilada.....	100 ml

El medio se filtra, se ajusta a pH 7, con ClH 0.1M ó NaOH 0.1 M, se esteriliza y se almacena a T ambiente.

- Placas de cromatografía:

Placas de Silica Gel 6061, 20x20 cm. Eastman Kodak.
Placas de celulosa, 20x20 cm, Merck.

III.3.2 Método experimental.

Para estas experiencias se han utilizado ratas normales y ratas portadoras del sarcoma sólido de Yoshida, que fueron sacrificadas de la manera descrita en el apartado III.2.2. 1.

III.3.2.1. Preparación de los extractos de las muestras para cromatografía.

Alicuotas de los mismos sueros, hígados y tumores en los que se determinó el contenido total en vitamina B₁₂, fueron utilizadas para la separación cromatográfica de las diferentes fracciones de la vitamina.

La preparación de los homogeneizados de hígado y tumor se ha llevado a cabo según la técnica descrita por Quadros y col (118), de la siguiente forma:

Los hígados y los tumores extraídos de las ratas, después de lavados en disolución salina (ClNa 0.9% p/v) fueron pesados. Alícuotas de hígado (300-400 mg) y de tumor (400-500 mg) se homogeneizaron en 10 ml de agua destilada, utilizando un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio.

Todos los pasos de este proceso de preparación de los extractos, se realizaron en oscuridad, en presencia de luz roja. La exposición a la luz natural convierte las formas Me-Cbl, Ado-Cbl y CN-Cbl en la forma OH-Cbl. Por esta razón las muestras deben ser protegidas de la luz desde el momento de la extracción del animal y durante su análisis, para evitar alteraciones en la distribución cromatográfica.

La preparación de los extractos para cromatografía se ha realizado según lo descrito por Linnell y col. (130):

2 ml de suero ó de los homogeneizados de los tejidos, se mezclaron con 8 ml de etanol absoluto, y se calentaron a 80°C durante 20 minutos. Una vez enfriados a T ambiente, los tubos fueron centrifugados a 2500 xg durante 5 minutos, para separar el precipitado de proteínas. La vitamina B₁₂, resistente a altas temperaturas y soluble en alcohol y agua, permanece en el sobrenadante. El precipitado proteico se lavó con 2 ml de etanol absoluto, y se mezclaron los sobrenadantes.

Dichas disoluciones alcohólicas se pasaron a vasos de precipitado de 50 ml, y se sometieron a un baño con agitación en el que la temperatura del agua se elevó lentamente desde 25

a 40°C, hasta que todo el etanol presente en el medio hubo desaparecido. El residuo acuoso se lavó 3 veces con 1 ml de eter y se dejó evaporar hasta sequedad.

El residuo seco contenido en cada uno de los vasos de precipitado, se redisolvió en 2 ml de agua destilada, y se trasladó a tubos cónicos de cristal esmerilado, a los que se adicionó 8 ml de fenol conteniendo un 25% de agua.

Los tubos fueron agitados durante un minuto y se desechó la fase acuosa. La fase fenólica inferior se lavó 3 veces con alícuotas de 2 ml de agua destilada. A continuación la fase fenólica se mezcló con 7 ml de acetona, 21 ml de eter y 1 ml de agua destilada, y se agitó vigorosamente durante un minuto. Esta extracción es muy importante, pues en ella las cobalaminas pasan al agua, desechándose la fase orgánica.

El extracto acuoso se lava con 1 ml de eter y a continuación se le adiciona 1 ml de suspensión de resina de cambio iónico Dowex-50, para desalinizar las muestras. Los tubos son agitados con la resina y posteriormente centrifugados para la separación de ésta.

Finalmente, el extracto acuoso resultante, se vierte en vasos de precipitado de 25 ml y se evapora hasta sequedad en un baño con agitación a 37°C.

III.3.2.2. Cromatografía en capa fina.

Linnell y col (130) utilizan placas de cromatografía fabricadas por ellos mismos, compuestas por una mezcla de polvo de celulosa y Silica Gel en agua. Con ellas obtienen una buena separación de las fracciones Me-Cbl y CN-Cbl, pero no de las fracciones Ado-Cbl y OH-Cbl cuando éstos dos compuestos están a baja concentración, como sucede en el suero. Debido a ello, los autores aconsejan realizar una cromatografía bidimensional (133) cuando se quiera obtener una separación neta de las 4 fracciones.

Hemos solucionado estos inconvenientes utilizando dos tipos de placas cromatográficas (de Silica Gel 6061 y de celulosa) en el análisis de cada muestra, y realizando cromatografías monodimensionales de las mismas.

La Silica Gel 6061 proporciona una marcada separación de las fracciones OH-Cbl y Ado-Cbl, permaneciendo la primera en el origen, y emigrando la segunda 1-2 cm durante la cromatografía. Por otra parte, las placas de celulosa separan netamente las manchas correspondientes a la CN-Cbl y Me-Cbl cuya proximidad en la Silica Gel hace que en algunos casos no pueda cuantificarse exactamente el contenido de ambas fracciones. Ambos tipos de placas, fueron activadas en una estufa a 100°C durante 15 minutos antes de su utilización. »

Las cromatografías se realizaron de la siguiente manera:

Los diferentes extractos secos obtenidos de cada una de

las muestras a analizar, se redisolviéron en 20 µl de agua destilada, y volúmenes de 5 µl fueron aplicados a cada uno de los dos tipos de placas cromatográficas.

En ambos casos, la cromatografía se desarrolló durante 4 horas, a 22°C, empleándose como fase líquida una mezcla de secbutanol/hidroxido amónico/ agua, en proporción 95:2:25 en el caso de las placas de Silica Gel, y en proporción de 75:2:25 en el caso de las placas de celulosa. De esta manera se obtiene un claro patrón cromatográfico de las 4 fracciones de la vitamina B₁₂.

En cada cromatografía se introdujeron patrones individuales de cada una de las 4 cobalaminas.

III.3.2.3 Revelado bioautográfico de las placas de cronatografía con el mutante NCIB 9270 de E.coli.

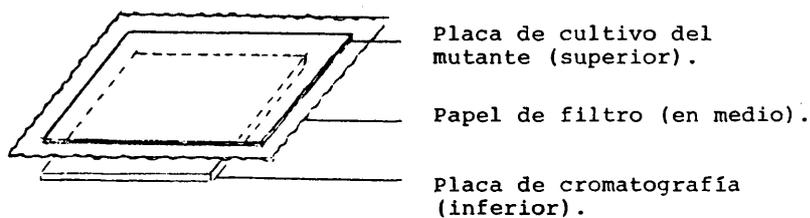
Una vez finalizado el desarrollo de la cromatografía, se preparó una placa de agar de las mismas dimensiones que la placa de cromatografía (20x20 cm), y se inoculó con el cultivo del mutante NCIB 9270 de E. coli.

Para preparar la placa de cultivo, se calienta el preparado de agar bacteriológico hasta que esté completamente líquido, y se vierte sobre la mezcla de sales minerales, a la que se ha añadido 0.6 g de glucosa y 0.3 g. de cloruro de 2,3,5 trifenil tetrazolio. Finalmente se le añade el inóculo, que ha sido preparado con anterioridad incubando el mutante NCIB 9270 de E. co

li en 2 ml de agua de peptona, a 37°C, durante unas 6 a 8 horas antes de su utilización.

La mezcla se vierte sobre un molde de plástico de 20x20 cm, que reposa sobre un papel de filtro estéril humedecido, que a su vez descansa sobre una placa de cristal estéril.

Una vez solidificada la placa, el papel y el agar se levantan y se sitúan sobre la placa de cromatografía, en la disposición que se indica en el dibujo:



Es importante evitar la formación de burbujas de aire entre las dos placas superpuestas.

La placa y el cultivo se incuban a 37°C durante 10 horas.

El crecimiento del mutante en aquellas zonas de la placa en donde está presente la vitamina B₁₂, origina la oxidación de la sal de tetrazolio, produciendo una forma coloreada rojiza que indica la situación de la mancha.

Las manchas de cobalamina fueron cuantificadas por barrido fotométrico, utilizando un dispositivo "Thin layer attachment" acoplado al densitómetro Chromoscan (MKII, Joyce Loebel and Co.), en comparación con los estándar.

Las Figuras 7 y 8 muestran la separación cromatográfica de las diferentes cobalaminas estandar, en placas de celulosa y de Silica Gel 6061.

III.4. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE FOLATO MEDIANTE UNA TECNICA DE RADIOANALISIS.

Para la medida de los niveles totales de folato en el suero de las ratas normales y portadoras de tumor, hemos utilizado el método de radioanálisis de Dunn y Foster (134), adaptándolo posteriormente para su aplicación a tejidos (hígado y tumor).

III.4.1. Reactivos.

- Tampón fosfato, 0.4 M, pH 7.6.
- Diluyente estandar, pH 7.4: se diluyen 25 ml del tampón fosfato 0.4 M, pH 7.6, en unos 800 ml de agua destilada. Se añaden 8.6 g de NaCl. La disolución se ajusta a pH 7.4 con KOH 0.1 M ó con ácido fosfórico 0.033 M, y se lleva a un volumen final de 1 litro con agua destilada. La disolución es estable 3 meses a 4°C.
- Tampón salino de fosfato con albúmina (disolución P-BAS), pH 7.4: se diluyen 25 ml del tampón fosfato 0.4 M, pH 7.6, con 800 ml de agua destilada. Se añaden 8.6 g de NaCl, 5 g de albúmina bovina (Sigma) y 3.8 g de etilendiaminotetra-acetato (sal disódica, Sigma). Se ajusta a pH 7.4 con KOH 0.1 M ó ácido fos

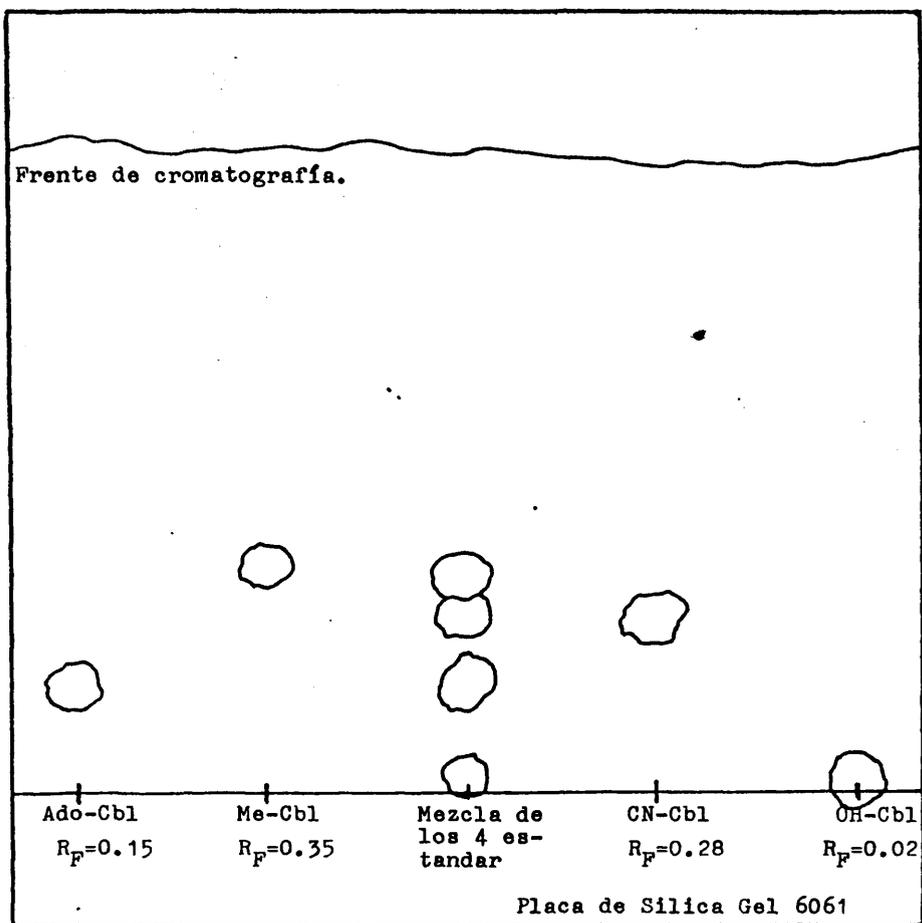


FIGURA 7: SEPARACION DE LOS ESTANDAR DE VITAMINA B₁₂
MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

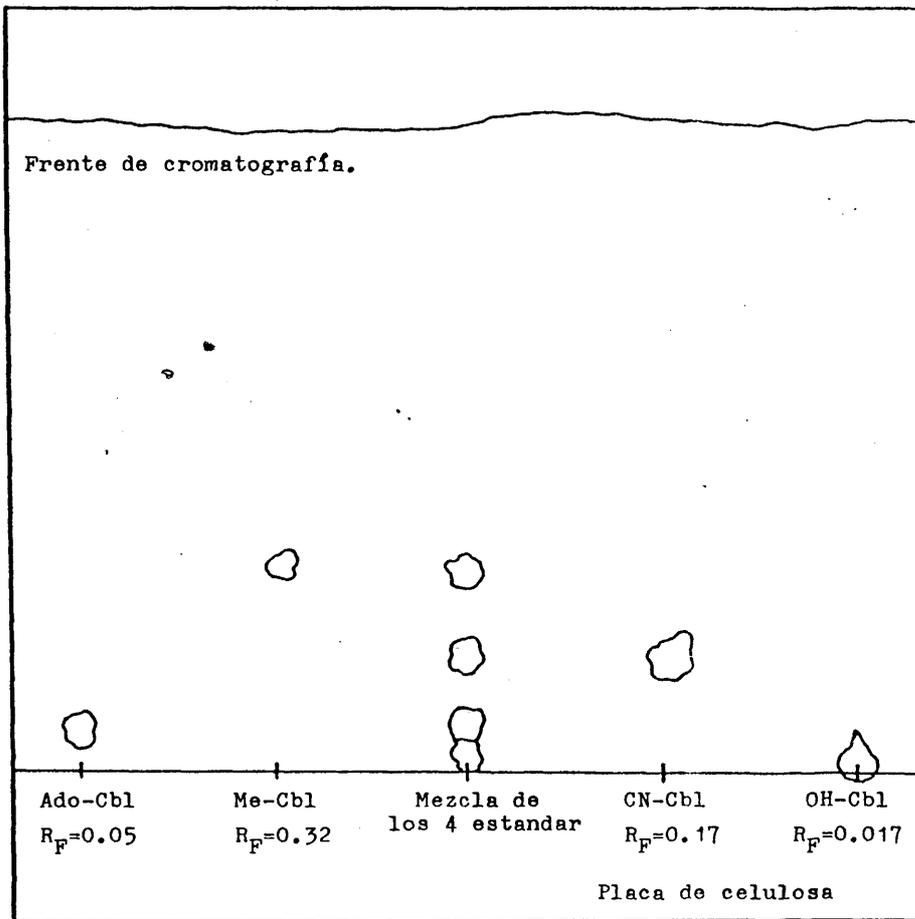


FIGURA 8: SEPARACION DE LOS ESTANDAR DE VITAMINA B₁₂
MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

fórico 0.033 M. Esta disolución es estable 3 meses a 40°C.

- Reactivo de mercaptoetanol: 0.28 % (v/v) de 2-mercaptoetanol (r.p.a. Merck) y 0.9 g% (p/v) de NaCl, en agua destilada.

- Cálculo de la pureza del estándar de N⁵-metil-THF: se ha realizado según lo descrito por Gupta y Huenekens (136). Se pesa exactamente 1 mg de ácido DL-N⁵-metil-tetrahidrofólico (sal de bario, Sigma), y se lleva a 25 ml con tampón fosfato 0.1 M, pH 7. En un espectrofotómetro (en nuestro caso Unicam SP-800) se hace un barrido de esta disolución en la zona del ultravioleta, determinándose el máximo de absorbancia a 290 nm. La aplicación de la ley de Lambert-Beer nos proporciona la pureza de la disolución estudiada:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

A = absorbancia de la disolución a 290 nm.

ϵ = coeficiente de extinción molar del N⁵-metil-THF a 290 nm = $30.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

l = longitud de la cubeta del espectrofotómetro.

c = concentración del soluto en la disolución, en g/l.

- Disolución estándar concentrada de N⁵-metil-THF (1 mg/ml), en reactivo de mercaptoetanol. Se fracciona en alícuotas de 0.2 ml en tubos de plástico y se conserva a -20°C. Conviene ensayar una muestra espectrofotométricamente a 290 nm cada cierto tiempo, para comprobar que no ha habido degradación del estándar.

- Disoluciones estandar de N⁵-metil-THF: se prepara una disolución de N⁵-metil-THF (1 µg/ml) en diluyente estandar pH 7.4, y a partir de ella se preparan 6 disoluciones estandar cuyas concentraciones son las siguientes: 5,10,15,20,25 y 30 ng/ml, que equivalen a 1,2,3,4,5, y 6 ng de N⁵-metil-THF en el tubo de reacción respectivamente. Estas disoluciones deben ser preparadas en cada nuevo ensayo.

- (G-³H)-ácido fólico, sal de potasio. Una ampolla= 250 µCi= 22 µg, Amersham.

- Disolución concentrada de ácido fólico-³H, (2.2 µg/ml), en diluyente estandar pH 7.4 al que se ha adicionado 10 g/l de albúmina bovina (fracción V, Sigma). Se fracciona en alícuotas de 100 µl en tubos de plástico, y se almacena a -20°C.

- Disolución diluida de ácido fólico-³H (2.2 ng/ml): se prepara a partir de la disolución concentrada, con tampón fosfato 0.4 M, pH 7.6. Esta disolución es estable una semana a 4°C.

- Disolución isotópica de trabajo (0.73 ng/ml): se prepara a partir de la disolución anterior, con tampón fosfato 0.4 M, pH 7.6. Esta es la disolución que se utiliza como trazador en el ensayo.

- Suspensión de carbón activo: contiene 2.5 g% (p/v) de carbón activo (Norit A, neutro, Sigma), y 0.125 g% (p/v) de polvo de hemoglobina (Difco).

- Disolución concentrada de β-lactoglobulina (cristalizada, Sigma), (10 mg/ml), en tampón fosfato 0.4 M, pH 7.6. Esta disolución se fracciona en alícuotas de 1 ml en tubos

de cristal aclarados con la disolución P-BAS. Los autores del método (134) aconsejan que la pared de los tubos sea tratada con esta disolución, para conservar la estabilidad de la β -lactoglobulina durante su almacenamiento. En estas condiciones la disolución es estable 3 meses a -20°C . Una vez descongelada, esta disolución no puede ser recongelada para su uso posterior.

- Disolución de trabajo de β -lactoglobulina

(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$): debe prepararse en cada nueva experiencia, a partir de la disolución concentrada, diluyendo con tampón fosfato, 0.4 M, pH 7.6.

- Tampón de lisina, 0.04 M, pH 10.5.

(L-Lisina, monoclóruo, cristalizada, Sigma). Esta disolución es estable 6 meses a T ambiente.

- Tampón fosfato 0.1 M, pH 7, 0.24 mM en ácido ascórbico.

- Suero libre de Folatos (SLF): se prepara de acuerdo con lo descrito por Rothenberg y col. (137). Una vez separado por centrifugación el suero procedente de unas 15 ratas, se mezcla y se le adiciona 15 mg/ml de suero, de carbón activo neutro (Norit A, Sigma). La suspensión se agita en un agitador magnético durante 30 minutos, pasados los cuales se centrifuga a $3000\times g$ durante 20 minutos a 4°C . El sobrenadante se pasa por un filtro Millipore (tamaño de poro= 0.45μ) para extraer del suero los restos de carbón activo. El suero resultante se almacena a -20°C hasta el momento de su uso. »

- Líquido de centelleo: Hemos utilizado una mezcla de naf

taleno-dioxano debido a que 10 ml de la misma admiten perfectamente 1 ml de muestra acuosa sin producir turbidez. La composición del líquido de centelleo utilizado es la siguiente:

30 g de naftaleno (para centelleo, Merck).

20 ml de etilen-glicol (Merck).

100 ml de metanol (Merck).

4 g de PPO (2,5-difeniloxazol, Merck).

0,2 g de POPOP (2.2'-p-fenilen bis (5-feniloxazol), Merck).

Se lleva hasta 1 litro con dioxano (r.p.a. Merck).

III.4.2. Método experimental.

III.4.2.1. Muerte de los animales de experimentación.

Antes de ser sacrificados, en cada uno de los animales se midió el contenido de hemoglobina en sangre total, por el método de la cianometahemoglobina (117), extrayéndoles 20 μ l de sangre de un pequeño corte practicado en el extremo del rabo.

Una vez pesados, los animales fueron sacrificados bajo anestesia de eter. Antes de su muerte, se les extrajeron unos 6 ml de sangre de la vena suprahepática. A continuación les fueron extirpados el hígado y el tumor.

III.4.2.2 Preparación de las muestras de suero.

Las sangres procedentes de los animales sacrificados fue

ron centrifugadas a 2500xg durante 10 minutos, para conseguir la separación del suero. Aquellos sueros que presentaron un leve grado de hemolisis fueron desechados para la experiencias, debido a que el nivel de folato en el glóbulo rojo es muy superior al contenido en el suero, por lo que una ligera hemolisis puede conducir a resultados erróneos en las determinaciones.

0.3 ml de cada muestra de suero fueron separados para la determinación de las proteínas totales por el método del Biuret (138). El suero restante fue preparado para la determinación de folatos, desproteinizándolo de la siguiente manera:

Se diluyó 1 ml de suero con 1 ml de tampón fosfato 0.1 M, pH 7, 8.24 mM en ácido ascórbido. A continuación los sueros fueron calentados a 100°C durante 10 minutos en baño de agua hirviente. Una vez enfriados, fueron sometidos a un doble proceso de congelación-descongelación, y centrifugados a 12000 xg durante 30 minutos a 2°C. Los sobrenadantes procedentes de la centrifigación se conservaron a -20°C hasta el momento del ensayo. El tiempo máximo transcurrido desde el almacenamiento de la muestra hasta su procesamiento fue de 6 días.

III. 4.2.3. Preparación de las muestras de hígado y tumor.

Los hígados y los tumores de los animales sacrificados fueron lavados con disolución salina de NaCl al 0.9% (p/v), y pesados. Alícuotas de hígado (~150 mg) y de tumor (~200 mg) fueron homogeneizadas en un homogeneizador Potter-Elvehjem de vi-

drio. El volumen final se ajustó a 10 ml con tampón fosfato 0.1 M, pH 7, 8.24 mM en ácido ascórbico.

Los homogeneizados se calentaron durante 5 minutos en baño de agua hirviente. Una vez enfriados a T ambiente, los desproteinizados se centrifugaron a 3000xg durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron fraccionados en alícuotas de 1 ml y conservados a -20°C hasta el momento del ensayo.

En el día de la determinación, un volumen de sobrenadante procedente de extracto de hígado se diluyó 30 veces con diluyente estandar pH 7.4, y esta disolución fue empleada en el ensayo como muestra de hígado.

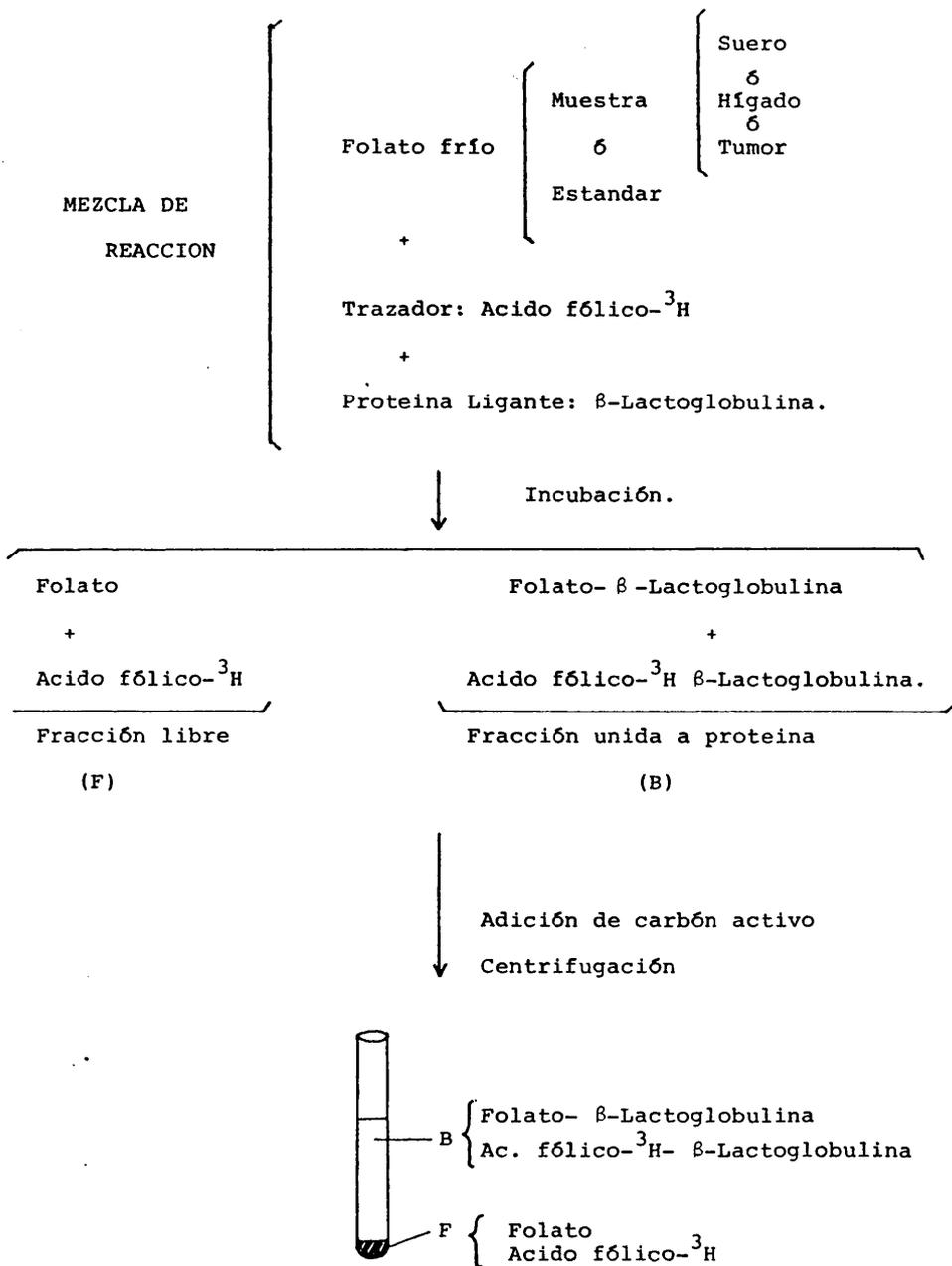
Así mismo, un volumen de sobrenadante procedente de extracto de tumor, se diluyó 4 veces con diluyente estandar pH 7.4, y esta disolución fue empleada como muestra de tumor.

III.4.2.4. Radioanálisis de folato.

En el Cuadro III se representa el esquema del fundamento del método de determinación de folato por radioanálisis. En el Cuadro IV se representa un esquema del desarrollo de esta técnica.

Los tubos de cristal utilizados en la preparación de las disoluciones estandar, almacenamiento de muestras y en la primera parte del ensayo, deben ser aclarados con la disolución P-BAS, para evitar que la muestra sea absorbida por las paredes de cristal. Una vez tratados con dicha disolución, los tubos se colocan boca abajo hasta que esten completamente secos.

CUADRO III: FUNDAMENTO DEL RADIOANALISIS DE FOLATO



CUADRO IV: DESARROLLO DEL METODO DE DETERMINACION DE FOLATOS.

Tubo	Tampón LYS pH 10.5	la parte		problema	SLF (*)
		Diluyente estandar pH 7.4	Disolución estandar.		
Estandar-0	2 ml	0.8 ml	—	—	0.8 ml
Estandar-1	2 "	—	0.8 ml	—	0.8 ml
Estandar-2	2 "	—	0.8 "	—	0.8 ml
Estandar-3	2 "	—	0.8 "	—	0.8 ml
Estandar-4	2 "	—	0.8 "	—	0.8 ml
Estandar-5	2 "	—	0.8 "	—	0.8 ml
Estandar-6	2 "	—	0.8 "	—	0.8 ml
Bi	2 "	0.8 ml	—	—	0.8 ml
Muestra de Suero	2 "	—	—	0.8 ml	0.8 ml
Muestra de hígado	2 "	—	—	0.8 "	0.8 ml
Muestra de tumor.	2 "	—	—	0.8 "	0.8 ml

- a) Se mezcla el contenido de los tubos.
- b) Se calientan los tubos a 100°C, 15 minutos.
- c) Se enfrían a T ambiente.

(*) SLF= Suero Libre de Folatos.

Bi= tubo control para la medida del ligamiento inespecífico.

CUADRO IV: DESARROLLO DEL METODO DE DETERMINACION DE FOLATOS.

Tubo	Mezcla procedente de la 1ª parte.	2ª parte		Tampón de fosfato, 0.4 M, pH 7.6
		Disolución isotópica (³ H)-ac.fólico	Disolución de β-lactoglobulina. (500 µg/ml)	
Tubos estándar	0.9 ml	0.5 ml	0.2 ml	—
Bi	0.9 "	0.5 "	—	0.2 ml
Muestra de suero	0.9 "	0.5 "	0.2 ml	—
Muestra de hígado	0.9 "	0.5 "	0.2 ml	—
Muestra de tumor	0.9 "	0.5 "	0.2 "	—

- a) Reposo 45 minutos a temperatura ambiente.
- b) Adición en frío de la suspensión de carbón activo-hemoglobina (0.5 ml/tubo)
- c) Centrifugación a 1500xg durante 20 minutos, a 4°C.
- e) 1 ml de sobrenadante se lleva al vial de centelleo con 10 ml de líquido de centelleo.
- f) Contaje de las dpm de las muestras en un contador de radiación β.

III.4.3. Discusión del método.

El primer método utilizado para la medida de niveles de folato en suero humano, fue un método microbiológico que data de 1959 y fue introducido por Baker y col. (135). Durante muchos años se han utilizado procesos microbiológicos para la determinación de derivados de ácido fólico en muestras biológicas. Estos procesos miden los diferentes tipos de folato, basándose en la propiedad que presentan estos compuestos de promover el crecimiento de ciertos microorganismos (*Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecalis* y *Pediococcus cerevisiae*), y se han mostrado como métodos precisos y reproducibles, que hoy día mantienen su validez a pesar del tiempo transcurrido. El único inconveniente que presentan es que su desarrollo es complejo, exigiendo unas condiciones de cultivo muy estrictas.

Sobre el año 1967 se demostró la propiedad que poseen ciertas proteínas de la leche de vaca para fijar el ácido fólico (139, 140). Este descubrimiento sentó las bases de las primeras técnicas de radioanálisis de folato (141,142). Actualmente este método parece tener una gran reproducibilidad estando desprovisto de los inconvenientes propios de las técnicas microbiológicas.

La proteína ligante de folato presente en la leche ha sido identificada, correspondiendo a la fracción β -lactoglobulina (143). Se ha demostrado que la β -lactoglobulina a pH alcalino presenta una elevada capacidad de unión tanto con el áci-

do pteroilglutámico (ácido fólico), como con el N⁵-metil-THF (134,144), y además presenta la gran ventaja de poder disponer de ella en forma comercial y cristalizada.

Otra gran ventaja de este método es que corrige errores de técnicas anteriores, ocasionados por la presencia en el suero de proteínas ligantes de folato (Serum Folate Binding Proteins, SFBP), las cuales dan lugar a resultados inferiores a los reales por disminuir los niveles de folato determinables por radioanálisis.

Estudios realizados sobre las SFBP han revelado que son de naturaleza glicoprotéica, y parece ser que actúan retrasando más que favoreciendo, el suministro de folato a la célula (145-150). Estas proteínas son las mismas que las descritas en pacientes con leucemia mieloide crónica (115), en mujeres gestantes y en mujeres sometidas a tratamiento con anticonceptivos orales (152). También se han encontrado niveles elevados de SFBP en pacientes con uremia y cirrosis (153).

Para corregir la fuente de error que supone la presencia de las SFBP, Dunn y Foster (134) diluyen las muestras de suero con tampón de lisina pH 10.5, y las someten al calor en un baño de agua hirviente, para destruir la capacidad de las proteínas séricas de unirse a los folatos. Dicho calentamiento no altera al folato, por ser este metabolito, igual que la vitamina B₁₂, altamente estable a temperaturas elevadas. Los métodos ordinarios de dilución de los sueros y su posterior tratamiento con

calor, conducen a menudo a la formación de un coágulo, o de extrema turbidez en el tubo. El tampón de lisina pH 10.5 presenta la ventaja de que permite la desnaturalización de las proteínas séricas y la liberación del folato, sin producir turbidez en el tubo de ensayo.

Las medidas del nivel de folatos que se obtienen con este método de radioanálisis, son esencialmente idénticas a las proporcionadas por el método microbiológico del *Lactobacillus casei* (134), con la ventaja de que mediante la técnica de radioanálisis se evitan las perturbaciones debidas a la presencia de antibióticos en el suero, que afectan al crecimiento del *Lactobacillus* (154).

Recientemente se ha puesto en tela de juicio la validez del radioanálisis como técnica apropiada para la determinación de folato en muestras biológicas. Shane y col. (155) estudian 3 preparados comerciales de radioanálisis de folato, y comparan los resultados con los obtenidos por el método microbiológico del *Lactobacillus casei*. Los autores se limitan a medir muestras de diferentes tipos de folatos estandar preparados por ellos mismos, y no analizan ninguna muestra biológica. Concluyen que los derivados monoglutamato del folato exhiben diferentes respuestas en el radioanálisis, dependiendo de su constituyente monocarbonado y de su estado de oxidación. Los derivados poliglutamato presentan una mayor respuesta al radioanálisis que los derivados monoglutamato, respuesta que varía dependiendo de la concentración de folato.

Suponiendo válido el resultado de estas experiencias, afectaría solamente a aquellos resultados obtenidos en muestras biológicas tisulares, en las que está demostrada la existencia de varios tipos de folato y de formas poliglutamato. Sin embargo, no afectaría en absoluto a los resultados obtenidos en suero, ya que se sabe que el folato circulante corresponde a la forma monoglutamada del N⁵-metil-THF casi en su totalidad (52).

Diversos autores de métodos de radioanálisis de folatos en suero, comparan su método con el método microbiológico del *Lactobacillus casei*, obteniendo correlaciones estadísticas buenas (134, 142, 144).

Por otra parte, teniendo en cuenta que el contenido tisular en folato está en relación directa con su concentración sérica (156-158), se comprende que la determinación del nivel de folato en suero posea un interés diagnóstico primordial.

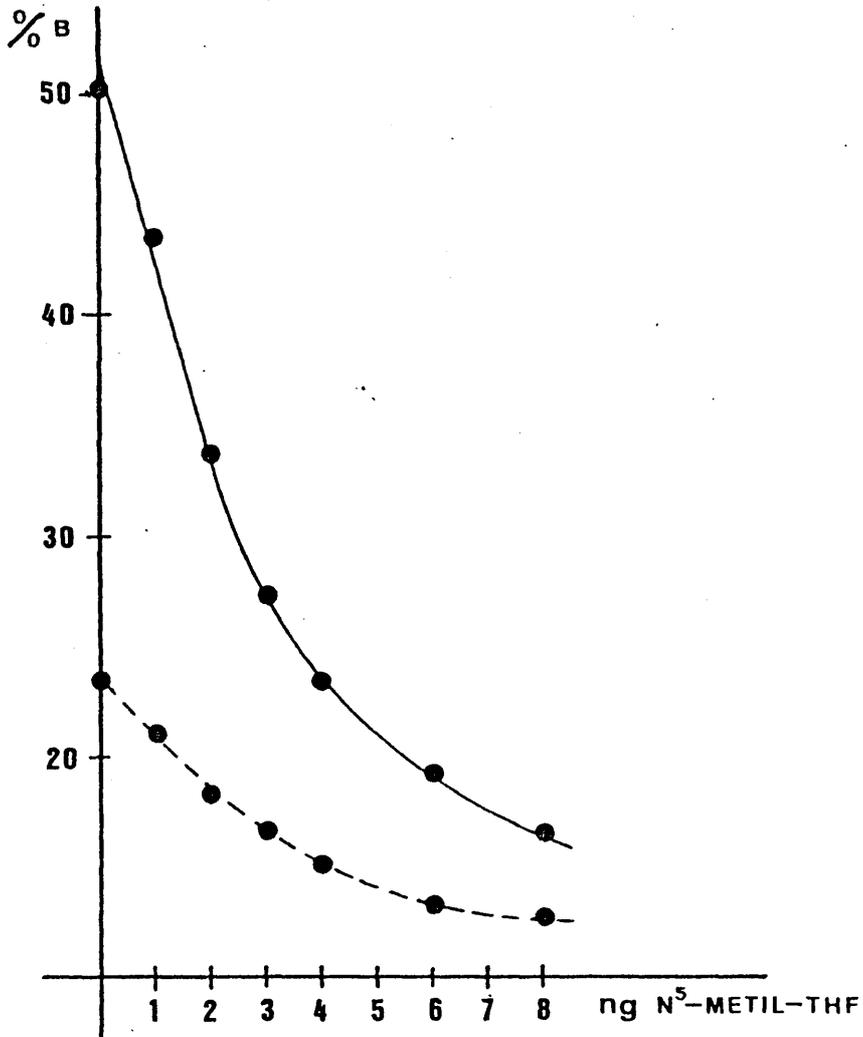
Al hacer un estudio detallado de la técnica que hemos utilizado para comprobar la fiabilidad de la misma, hemos encontrado un aspecto del radioanálisis de Dunn y Foster (134) que creemos puede conducir a errores en los resultados, por lo que hemos introducido ciertas modificaciones. Dichos autores

preparan las disoluciones estandar en un disolvente que contiene albúmina (10 g/l), ya que la muestra de suero que es procesada contiene también proteínas. Sin embargo, la concentración de proteínas totales en el suero de rata normal tiene un valor medio de 70 g/l, es decir, es 7 veces mayor que la empleada en los tubos estandar.

Para comprobar si esta diferencia en el nivel de proteínas del tubo de radioanálisis podría afectar a la reacción de ligamiento folato-proteína, se hizo una experiencia en la que se procesaron dos curvas estandar: una con el diluyente estandar utilizado por Dunn y Foster (134), y otra utilizando un volumen de "Suero Libre de Folatos" (SLF), igual al volumen de suero presente en los tubos problema, con el fin de igualar las concentraciones protéicas de los mismos.

En la Gráfica 5 están representadas dichas curvas. Como puede observarse, la pendiente de la curva correspondiente al SLF es mayor que la de la curva correspondiente al diluyente estandar (10 g/l).

Dado que las ratas portadoras de tumor presentan una hipoproteïnemia marcada (proteínas sericas totales= 5g%) frente a las ratas normales (7g%), nos preguntamos si esta variación en el nivel de proteínas séricas podría ser la causante del menor nivel de folato que encontrábamos en el suero de las ratas portadoras de tumor con respecto al de las ratas control. Para comprobar esto, procesamos 2 curvas estandar, una con SLF de rata normal y otra con SLF de rata portadora de neoplasia.



GRAFICA 5: CURVAS ESTANDAR DEL RADIOANALISIS DE FOLATO, PROCESADAS CON DILUYENTE ESTANDAR (10 g albúmina/litro) (----) Y CON SUERO LIBRE DE FOLATOS (—).

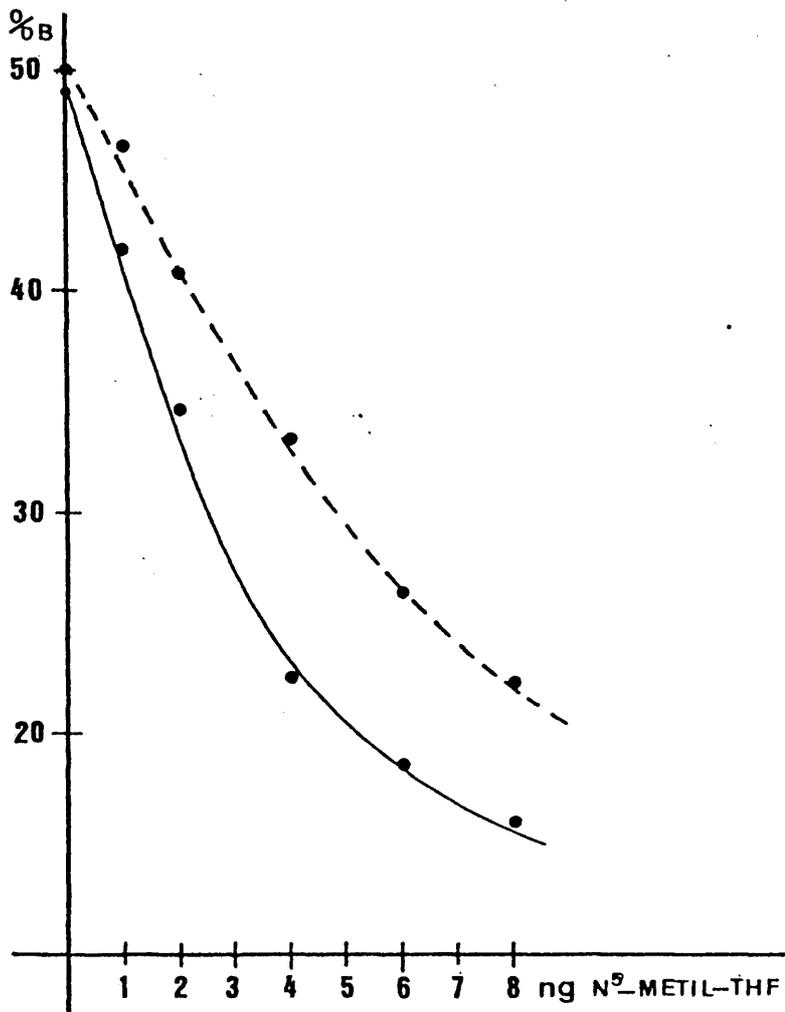
En la Gráfica 6 están representadas ambas curvas. Como puede observarse, la pendiente es menor en el caso en el que se ha utilizado SLF de rata portadora de tumor.

A partir de estos datos dedujimos que había que igualar el contenido en proteínas de todas las muestras que se analizaban para poder comparar los resultados. Creemos que este hecho tiene una gran importancia sobre todo cuando el radioanálisis de folato se utiliza como ensayo clínico de rutina, aplicado a la medicina humana, ya que las variaciones en los niveles de proteínas séricas que frecuentemente se presentan en algunas enfermedades, pueden dar lugar a variaciones en el ligamiento, independientes del contenido de folato en el suero, que al ser calculado mediante una misma recta de calibrado, conduzca a falsos resultados.

Debido a todo ello, hemos modificado el método de Dunn y Foster, trabajando siempre con extractos desproteinizados, y adicionando a todos los tubos (estandar y problema) una cantidad fija de un mismo preparado de SLF.

III.4.4. Control del método.

Durante la puesta a punto del radioanálisis para la determinación de folatos en suero, hígado y tumor de ratas normales y portadoras de neoplasia, hemos utilizado los siguientes controles:



GRAFICA 6: CURVAS ESTANDAR DEL RADIOANALISIS DE FOLATO, PROCESADAS CON SUERO LIBRE DE FOLATOS DE RATA NORMAL (—) Y DE RATA PORTADORA DE TUMOR (-----).

III.4.4.1. Titulación de la proteína ligante.

Hemos medido el porcentaje de unión (%B) frente al total de dpm, de 5 diluciones diferentes de proteína ligante (125,250, 500,750 y 1000 µg de β-lactoglobulina/ml de disolución) en ausencia de folato frío.

Hemos escogido para nuestras experiencias la concentración de 500 µg de β-lactoglobulina/ml por ser la que proporciona un 45% de ligamiento respecto a las dpm totales en ausencia de folato frío, y da valores de porcentaje de la fracción unida a proteína, perfectamente distinguibles en cada uno de los puntos de la curva estandar.

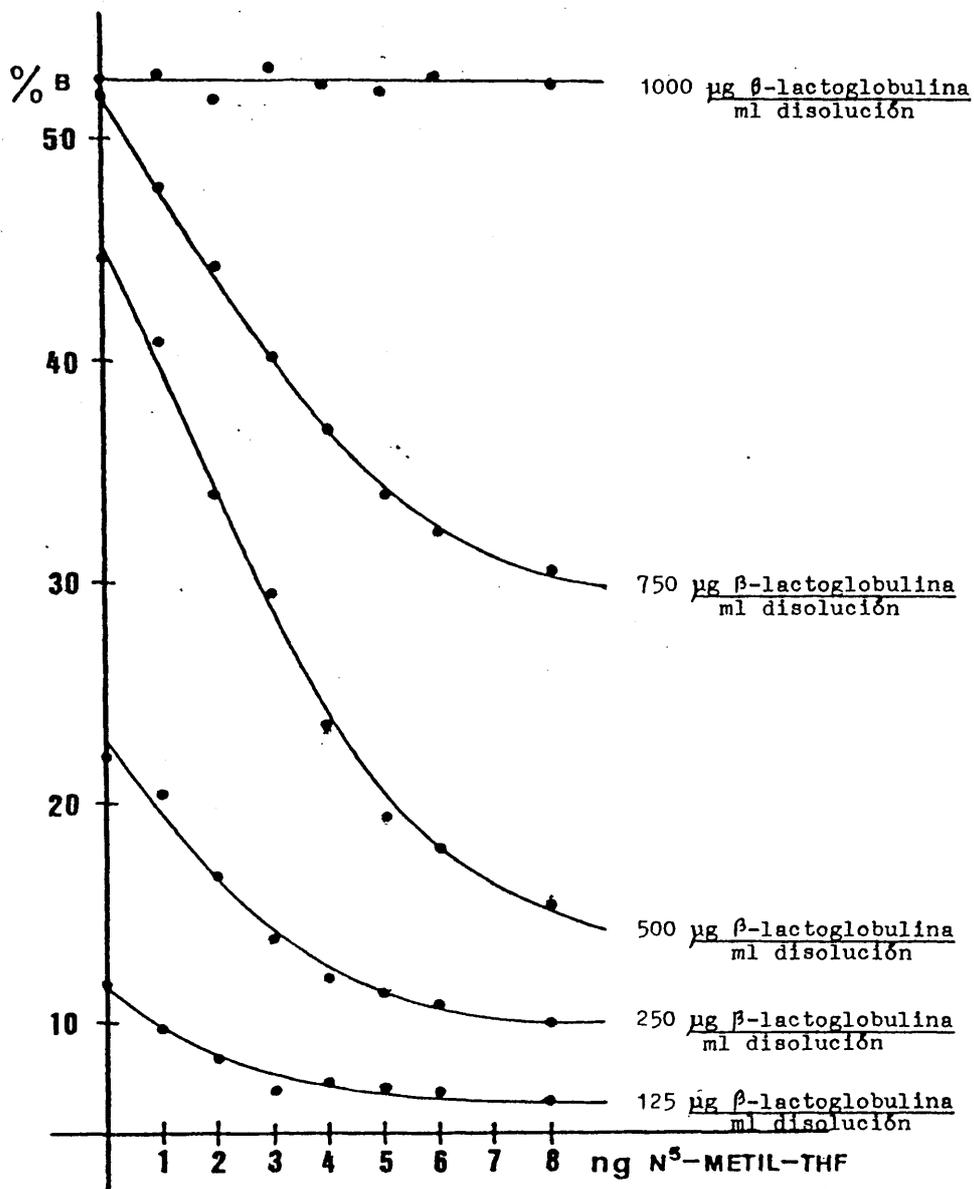
En la Gráfica 7 están representadas las diferentes curvas estandar obtenidas a distintas concentraciones de la proteína ligante.

III.4.4.2. Reproducibilidad de la curva estandar.

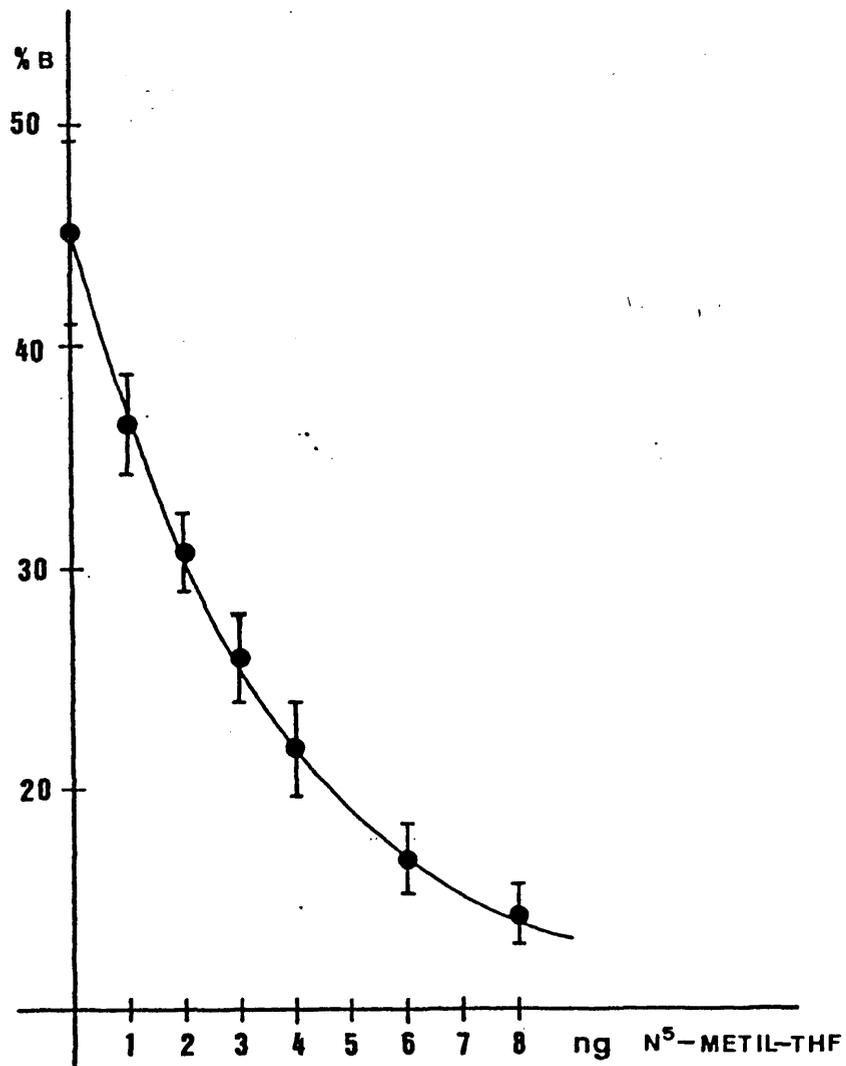
En la Gráfica 8 están representadas las variaciones obtenidas en la curva estandar en 15 experiencias diferentes. Se ha representado el valor $\bar{x} \pm D.S.$ de la fracción unida a proteína (%B) referido al total de dpm, correspondiente a cada una de las concentraciones de las disoluciones estandar.

La precisión en cada punto de la curva estandar ha sido estudiada mediante el cálculo del coeficiente de variación

$$\frac{(D.S.)}{\bar{x}} \times 100).$$



GRAFICA 7: CURVAS ESTANDAR DEL RADIOANALISIS DE FOLATO, A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PROTEINA LIGADORA.



GRAFICA 8: RADIOANALISIS DE FOLATO. VARIACION DE LA CURVA ESTANDAR EN DIFERENTES EXPERIENCIAS. ($\bar{x} \pm D.S.$) (n=15).

Los coeficientes de variación obtenidos son los siguientes:

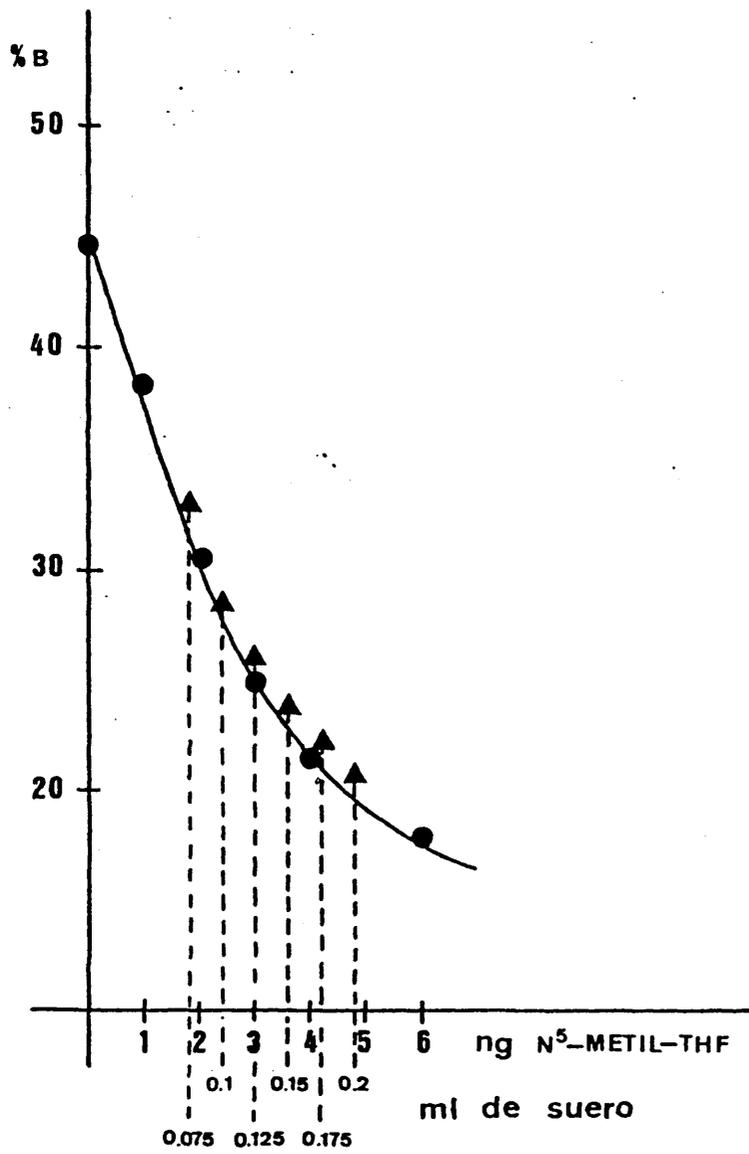
	<u>ng de N⁵-metil-THF</u>	<u>Coef. de variación.</u>
Estandar-0	0	9.15%
Estandar-1	1	6.09%
Estandar-2	2	5.58%
Estandar-3	3	7.27%
Estandar-4	4	9.75%
Estandar-5	6	9.88%
Estandar-6	8	8.77%

Hemos establecido como zona de trabajo la comprendida entre las concentraciones de folato frío de 1-4 ng/tubo, pues en dicha zona las curvas presentan una pendiente óptima.

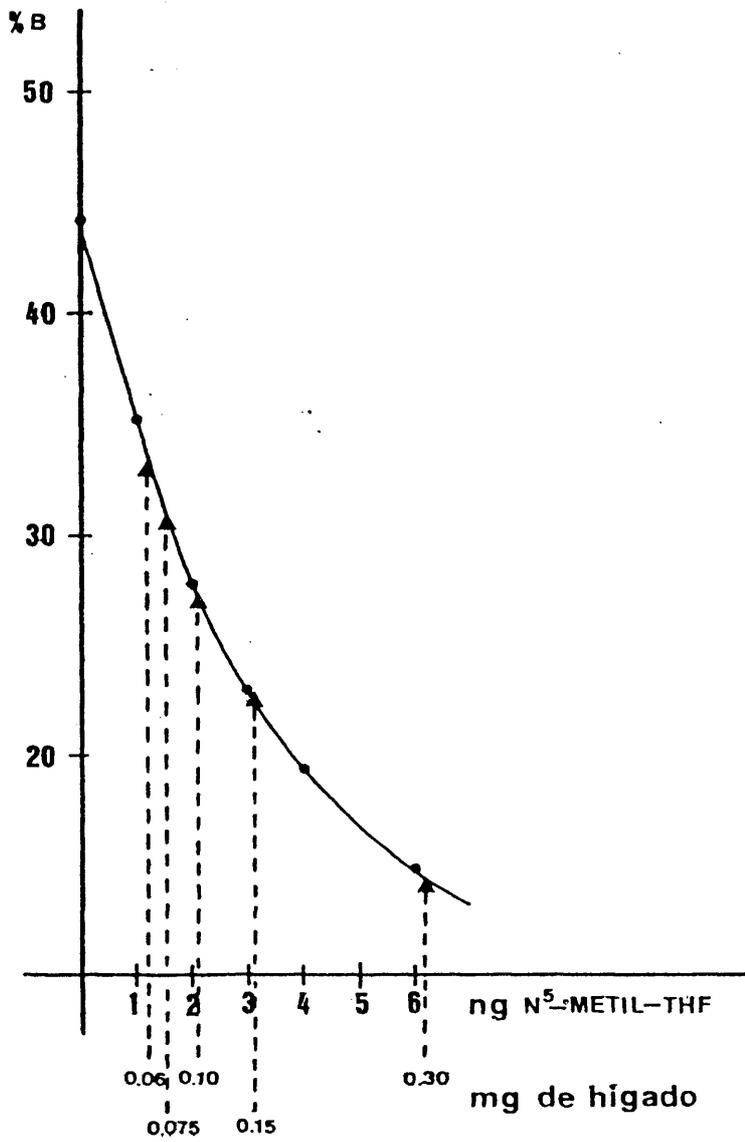
III.4.4.3. Curvas de dilución de suero y tejidos.

En la Gráfica 9 está representada la curva de dilución del suero. Se han ensayado 6 diluciones distintas S₁, S₂, S₃, S₄, S₅ y S₆ que se corresponden a una cantidad de suero en el tubo de ensayo de 0.075 ml, 0.1 ml, 0.125 ml, 0.15 ml, 0.175 ml y 0.2 ml respectivamente. Hemos obtenido una buena correspondencia con la curva estandar en la zona de proporcionalidad de la misma. Según este criterio, hemos escogido la dilución S₂ (0.1 ml de suero/tubo) para el análisis de las muestras.

En la Gráfica 10 está representada la curva de dilución del hígado. Hemos estudiado 5 diluciones H₁, H₂, H₃, H₄ y H₅



GRAFICA 9: RADIOANALISIS DE FOLATO. CURVA ESTANDAR (●) Y DILUCION DE SUERO (▲).



GRAFICA 10: RADIOANALISIS DE FOLATO. CURVA ESTANDAR (•) Y DILUCION DE HIGADO (▲).

del homogeneizado de hígado, que equivalen a 0.06 mg, 0.075 mg, 0.10 mg, 0.15 mg y 0.30 mg de tejido hepático húmedo en el tubo problema. Excepto la dilución H₅, todas las demás diluciones se corresponden perfectamente con el perfil de la curva estandar en el intervalo comprendido entre los estandar 0-4 ng de folato. Hemos escogido la dilución H₃ (0.10 mg de tejido hepático húmedo/tubo) para el procesamiento de la muestra.

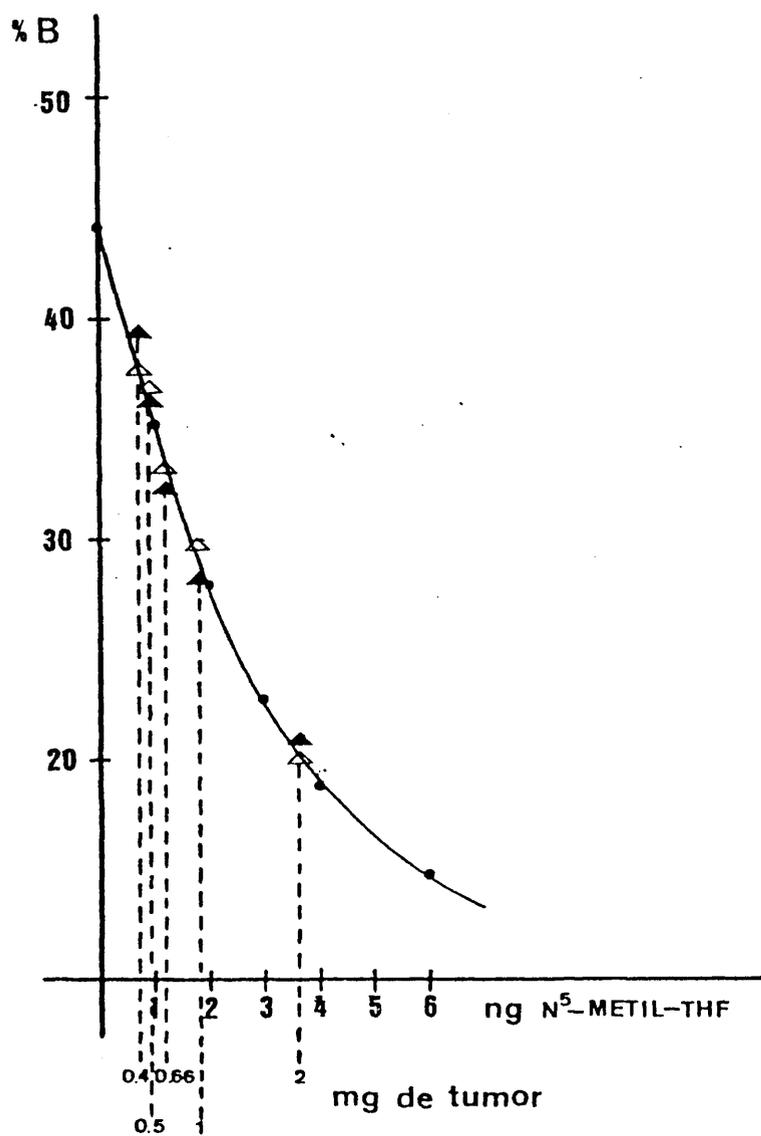
En la Gráfica 11 está representada la curva de dilución del tumor. Se han analizado 5 diluciones T₁, T₂, T₃, T₄ y T₅ de los homogeneizados de tumor Yoshida y Walker-256, que equivalen a la cantidad de 0.4 mg, 0.5 mg, 0.66 mg, 1 mg y 2 mg de tejido tumoral húmedo en el tubo de reacción. Todos los puntos medidos se corresponden con la zona de proporcionalidad de la curva estandar, tanto para el tumor Yoshida como para el Walker-256. Para las experiencias hemos escogido la dilución T₄ (1 mg de tejido tumoral húmedo/tubo) de los homogeneizados desproteinizados.

III.4.4.4. Ligamiento inespecífico.

El valor medio de ligamiento inespecífico calculado como el porcentaje de dpm en el sobrenadante (fracción ligada a proteína) respecto al total de dpm, ha sido de 5.77%.

III.4.4.5. Recuperación del método.

Se ha medido el porcentaje de folato recuperado de distintas cantidades de folato frío añadidas a las muestras de su



GRAFICA 11: RADIOANALISIS DE FOLATO. CURVA ESTANDAR (•),
DILUCION DE TUMOR YOSHIDA (▲) Y DE TUMOR WALKER-256 (△).

ro, hígado y tumor.

La proporción de folato recuperado la hemos calculado mediante el cociente:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{folato ensayado}}{\text{folato endógeno} + \text{folato añadido}} \times 100.$$

Las recuperaciones que hemos obtenido para las distintas muestras, son las siguientes:

	<u>ng de folato añadidos</u>	<u>%Recuperación</u>
Suero:	1.15	110
	2.30	107
Hígado:	1.15	105
	2.30	110
Tumor:	1.15	110
	2.30	115

III.4.4.6. Reproducibilidad intra-análisis e inter-análisis.

Una misma muestra ha sido procesada 4 veces dentro del mismo ensayo, con el fin de obtener el valor de la reproducibilidad intra-análisis del método. La variación del valor medido en el nivel de folatos correspondientes a 2 hígados normales, ha sido:

- a) 22.29 µg de folato/g tejido hepático húmedo.
- b) 17.87 " "
- c) 23.32 " "
- d) 17.98 " "

$$\bar{x} \pm D.S. = 20.36 \pm 2.85$$

$$\text{Coeficiente de variación} = \frac{D.S.}{\bar{x}} \times 100 = 14\%$$

- a) 16.37 μg de folato/g tejido hepático húmedo.
- b) 20.88 " "
- c) 17.18 " "
- d) 25.15 " "

$$\bar{x} \pm D.S. = 19.89 \pm 4.01$$

$$\text{Coeficiente de variación} = 20\%$$

Se ha estudiado también la variación de valores producida por el método, sobre la misma muestra medida en ensayos diferentes, para obtener la reproducibilidad inter-análisis.

Las variaciones del valor de folatos obtenido en 2 ensayos diferentes, han sido:

Suero: a) 10.55 ng de folato/ml de suero.

b) 14.50 " "

Coeficiente de variación=22%

a) 20.25 ng de folato/ml de suero.

b) 20.68 " "

Coeficiente de variación= 1.4%

a) 38.59 ng de folato/ml de suero.

b) 37.50 " "

Coeficiente de variación= 2%

a) 29.10 ng de folato/ml de suero.

b) 33.75 " "

Coeficiente de variación= 10%

Hígado: a) 18.75 µg de folato/g tejido hepático húmedo.
b) 14.69 " " "
Coeficiente de variación= 17%

a) 22.18 µg de folato/g tejido hepático húmedo
b) 24.83 " " "
Coeficiente de variación= 8%

a) 18.29 µg de folato/g tejido hepático húmedo.
b) 21.53 " " "
Coeficiente de variación= 11%

a) 14.00 µg de folato/g tejido hepático húmedo.
b) 19.25 " " "
Coeficiente de variación= 22%

a) 27.75 µg folato/g tejido hepático húmedo.
b) 21.75 " " "
Coeficiente de variación= 17%

Tumor: a) 2.23 µg de folato/g tejido tumoral húmedo
b) 2.88 " " "
Coeficiente de variación=18%

a) 1.88 µg de folato/g tejido tumoral húmedo.
b) 2.13 " " "
Coeficiente de variación= 8%

a) 1.90 µg de folato/g tejido tumoral húmedo.
b) 2.25 " " "
Coeficiente de variación= 11%

a) 4.39 µg de folato/g tejido tumoral húmedo.

b) 4.66 " " "

Coefficiente de variación= 4%

Aunque estos porcentajes de variación son permitidos dentro de los ensayos de radioanálisis, para minimizar en lo posible estos errores, se han procesado siempre dentro del mismo ensayo, un grupo de muestras de ratas control, junto con las muestras correspondientes a las ratas portadoras de tumor.

III.5. DETERMINACION CUANTITATIVA DE LA ENZIMA TIMIDILATO SINTETASA (E.C.2.1.1.45).

Para el ensayo de la actividad enzimática de la timidilato sintetasa en hígado y tumor de las ratas portadoras del sarcoma sólido de Yoshida, hemos utilizado el método de Lomax y Greenberg (159), modificado por Gómez y Montañés (160). Este método está basado en la liberación del tritio contenido en el sustrato dUMP-5-³H al agua presente en el medio, durante el transcurso de la reacción. (Ver Figura 6 del apartado I.2.3. de la Introducción).

III.5.1. Reactivos.

Salvo que se especifique lo contrario, todos los reactivos utilizados han sido productos para análisis de Merck.

- Disolución de MgCl₂, 1 M.

- Tampón de homogeneización, sacarosa 0.25 M, Tris

0.01 M, pH 7.5

- Tampón Tris-formaldehido-mercaptoetanol, pH 7.5:

Tris:ClH 0.5 M, 2-mercaptoetanol 30 mM y formaldehido 35 mM.

- Disolución de THF, 0,25 g% (p/v) de ácido dl,L-tetra-hidrofólico (Sigma) en tampón Tris-formaldehido-mercaptoetanol, pH 7.5. Esta disolución se prepara en cada nueva experiencia.

- Disolución de dUMP-³H (0.05 mCi/ml): disolución de la sal amónica de desoxi - (5-³H)-uridina 5' -monofosfato, en etanol al 50%. Actividad específica= 10 Ci/m mol. Radiochemical Centre, Amersham.

- Suspensión de carbón activo: contiene 10 g% (p/v) de carbón activo (Norit A, no tratado, Sigma), en tampón fosfato 0.01 M, pH 7.

- Líquido de centelleo: su composición es la siguiente:

1 l. de tolueno.

300 ml de etanol absoluto.

80 g. de naftaleno.

6 g de PPO (2,5-difeniloxazol).

0.2 g. de POPOP (2,2' -p-fenilén bis (5-feniloxazol)).

- Mezcla de reacción: esta mezcla ha de ser preparada en el momento del ensayo. La proporción de sus componentes es la siguiente:

20 µl de disolución de MgCl₂, 1 M.

500 μ l de disolución de THF.

50 μ l de disolución de dUMP, 0,05 mCi/ml.

Cada tubo contiene 500 μ l de esta mezcla de reacción.

III.5.2. Método experimental.

III.5.2.1. Muerte de los animales de experimentación.

Para las experiencias destinadas a la determinación de la actividad de la timidilato sintetasa, se han utilizado ratas Wistar, macho, de 3 meses de edad y de peso comprendido entre 200 y 300 g.

A un grupo de estas ratas se les transplantó el sarcoma sólido de Yoshida, de acuerdo con lo descrito en el apartado III,1.

Se han escogido animales adultos cuyos crecimiento ha finalizado, ya que la actividad de la timidilato sintetasa es muy elevada en el hígado de ratas jóvenes.

Los animales fueron sacrificados por decapitación y se les extrajo el hígado y el tumor. La actividad de esta enzima no es detectable en suero de rata.

La determinación de hemoglobina en sangre total se realizó en todos los animales sacrificados, por el método de la cimetahemoglobina (117).

III.5.2.2 Preparación de las muestras de hígado y de tumor.

Los hígados y los tumores procedentes de los animales de experimentación, se lavaron con disolución salina (NaCl 0.9%, p/v) y se pesaron.

Alicuotas de 5 g de hígado y de 1.5 g de tumor fueron homogeneizadas en tampón de sacarosa-Tris, pH 7.5, en un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio. El volumen final del homogeneizado fue de 4 ml/g de tejido.

Los homogeneizados se centrifugaron a 105000xg durante 90 minutos a 0°C. Los sobrenadantes procedentes de la centrifugación se conservaron a -20°C hasta el momento del ensayo.

III.5.2.3. Desarrollo del método.

El día del ensayo se prepara una mezcla de reacción que contiene $MgCl_2$, THF, formaldehído y dUMP-³H.

50 μ l del extracto de tejido se adicionan a 500 μ l de la mezcla de reacción. Los tubos se agitan y se incuban a 37°C durante 40 minutos. Pasado este tiempo, los tubos se enfrían rápidamente en un baño de hielo, y se les adiciona 500 μ l de una suspensión de carbón activo con el fin de separar la fase acuosa del resto de los componentes de la mezcla de reacción. Una vez agitados, los tubos se dejan en reposo durante 30 minutos. A continuación se centrifugan a 4000xg, a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se hace pasar a través de un filtro Millipore (tamaño de poro= 0.45 μ).

Todas las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado.

En cada ensayo se procesó un tubo control que tenía todos los reactivos antes mencionados, excepto los 50 μ l del extracto

tisular que fueron sustituidos por 50 μ l de un extracto hepático procedente de una rata normal adulta, de 6 meses de edad y de peso 460 g. Los hígados procedentes de ratas de estas características presentan una actividad nula de la enzima timidilato sintetasa, la cual fue comprobada con anterioridad al ensayo.

Todas las operaciones previas a la incubación se realizan manteniendo los tubos a 0°C.

En el Cuadro V se representa el esquema del proceso seguido durante el desarrollo de esta técnica.

III.5.3. Discusión del método.

Los ensayos que existen hasta la fecha para la determinación de la actividad de la enzima timidilato sintetasa, pueden dividirse en 3 grupos.

a) Métodos basados en la utilización de un sustrato marcado isotópicamente, y posterior aislamiento del timidilato radioactivo formado en el transcurso de la reacción, mediante una técnica cromatográfica (161).

b) Método espectrofotométrico basado en la variación de absorbancia a 338 nm, originada por la oxidación de N⁵, N¹⁰-metilén-THF a DHF (162).

c) Métodos basados en la liberación del ³H contenido en el sustrato dUMP-³H al agua presente en el medio de reacción (159, 163).



CUADRO V: METODO DE DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA
TIMIDILATO SINTETASA.

	<u>Blanco</u>	<u>Control</u>	<u>Problema</u>
Mezcla de reacción (MgCl ₂ , THF, dUMP- ³ H)	500 µl	500 µl	500 µl
Extracto tisular (Hígado, tumor)	—	—	50 µl
Extracto de hígado de rata adulta (actividad nula)	—	50 µl	—
Tampón sacarosa- -Tris, pH 7.5	50 µl	—	—

Mezcla del contenido de los tubos.
Incubación a 37°C, 40 minutos.
Se detiene la reacción pasando los tubos
a un baño de hielo.

Suspensión de carbón activo	500 µl	500 µl	500 µl
--------------------------------	--------	--------	--------

Agitación de los tubos.
Reposo 30 minutos, 4°C.
Centrifugación a 4000xg, 4°C, 15 minutos.
Filtración de los sobrenadantes a través
de membrana Millipore (poro= 0.45 µ)

Sobrenadante	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Líquido de centelleo	10 ml	10 ml	10 ml

Lectura de las dpm producidas por el ³H
en un contador de centelleo.

El método espectrofotométrico presenta la ventaja de su sencillez y fiabilidad de resultados, pero su sensibilidad es muy limitada, y cuando se utilizan extractos crudos de la enzima, se producen con frecuencia incrementos de absorbancia, aún en ausencia de sustrato.

Los métodos isotopo-cromatográficos poseen una sensibilidad mayor que la del método espectrofotométrico pero su desarrollo es largo, presentan a menudo reacciones de interferencia que enmascaran los resultados, y producen valores del "blanco" (ausencia de enzima) muy elevados.

El método basado en la medida del ^3H liberado al agua del medio de reacción, presenta los mismos requerimientos que el método espectrofotométrico en cuanto a concentración de sustrato y pH de reacción, pero tiene las ventajas de una mayor sensibilidad, valores de "blanco" bajos, y es aplicable a extractos crudos de preparaciones de la enzima.

La validez de este método requiere una relación estequiométrica entre el ^3H liberado y el dTMP formado. En ausencia de enzima se ha comprobado que la mayor proporción de la radioactividad presentada por el "blanco", se debe a la presencia del agua tritiada presente en las disoluciones de dUMP- ^3H , procedente de una lenta disociación ó por degradación del dUMP- ^3H (159).

III.5.4. Control del método.

Hemos realizado el estudio de la variación de la actividad enzimática de la timidilato sintetasa, con la cantidad de en

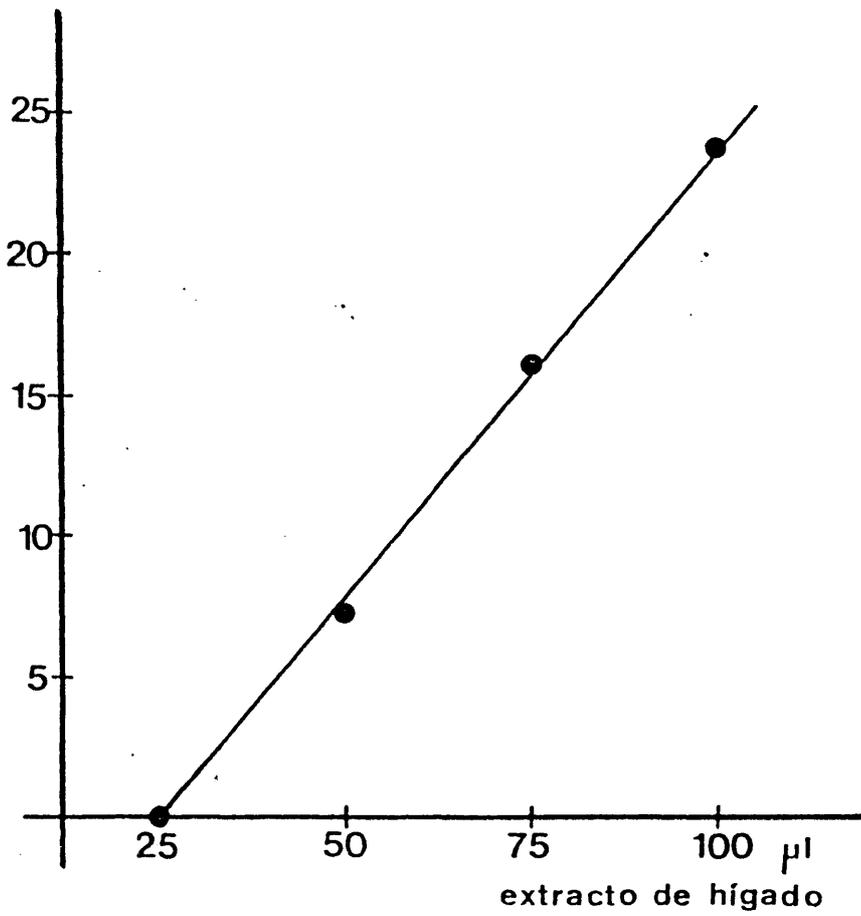
zima presente en la muestra (extracto de hígado o de tumor) y con el tiempo de incubación a 37°C.

En la Gráfica 12 se observa que el aumento de actividad de la timidilato sintetasa es proporcional en el intervalo de concentraciones del extracto de hígado comprendido entre 25 y 100 μ l. En nuestras experiencias hemos utilizado volúmenes de 50 μ l del extracto hepático.

En la Gráfica 13 se muestra la variación de la actividad de la timidilato sintetasa a diferentes concentraciones del extracto de tumor en el tubo de reacción. Como puede observarse el aumento de actividad es proporcional en el intervalo comprendido entre 25 y 75 μ l del extracto tumoral. Debido a ello, nos ha parecido apropiado escoger el volumen de 50 μ l de extracto de tumor para la realización de las experiencias.

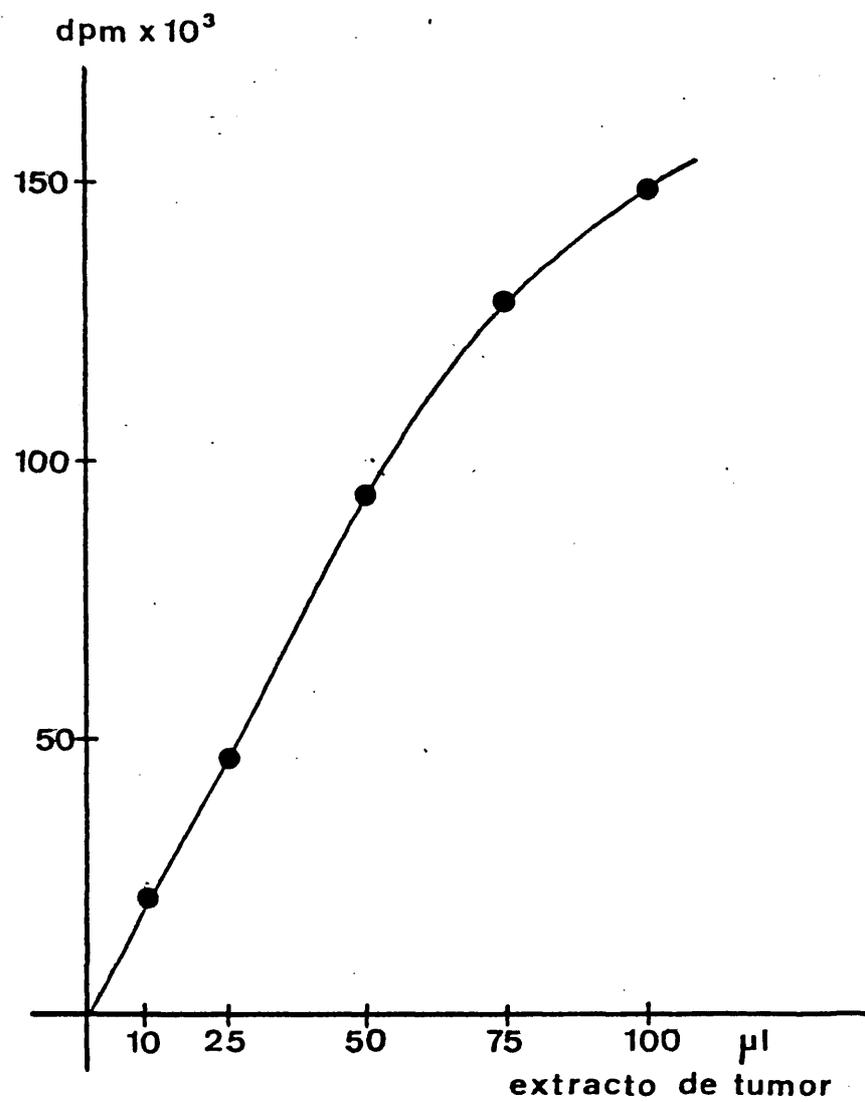
La Gráfica 14 muestra la variación de la actividad enzimática que presentan 50 μ l de los correspondientes extractos tisulares, con el tiempo de incubación. Para nuestras experiencias hemos escogido el tiempo de 40 minutos, al cual la actividad de la timidilato sintetasa es máxima y estable.

Actividad enzimática
dpm x 10³



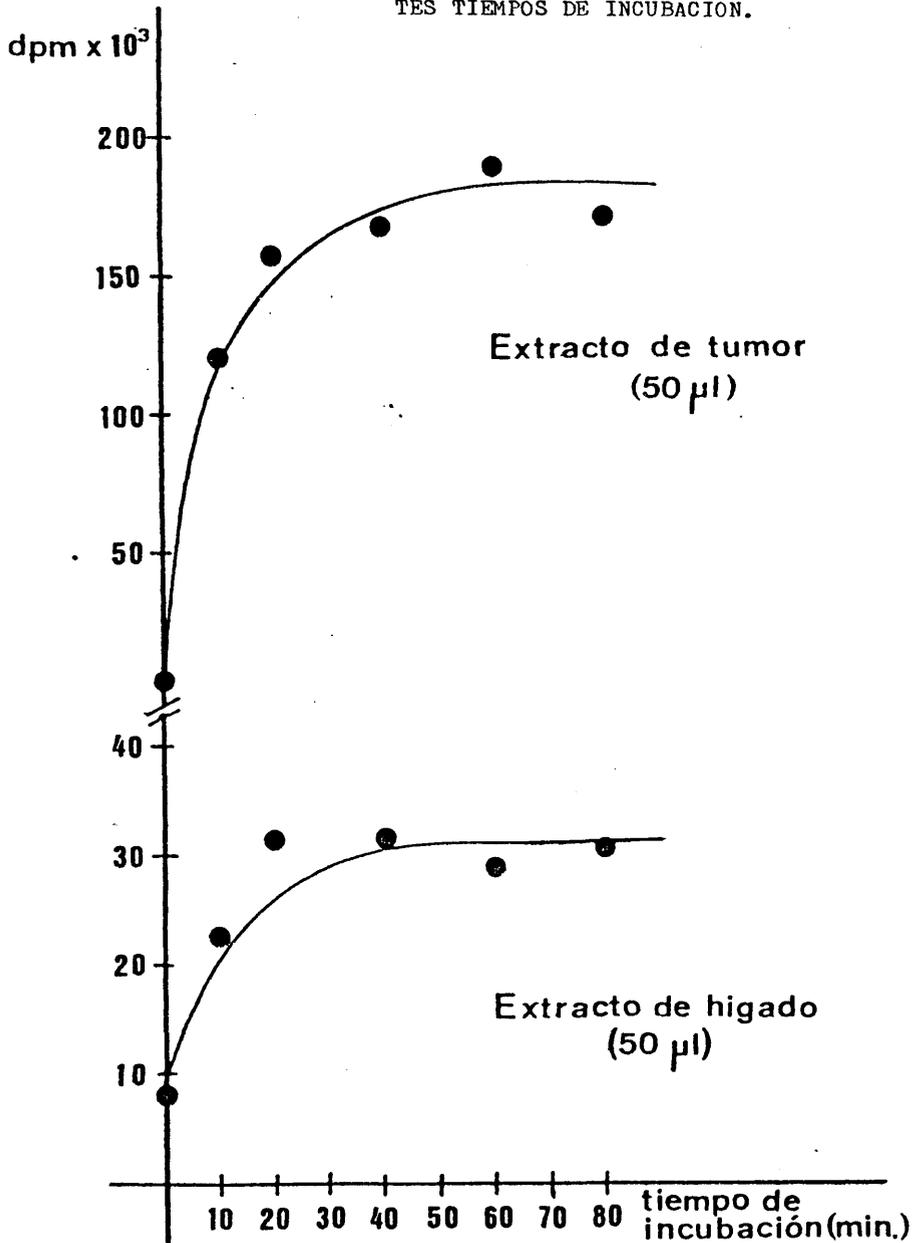
GRAFICA 12: VARIACION DE LA ACTIVIDAD DE LA TIMIDILATO SINTETASA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE HIGADO.

Actividad enzimática



GRAFICA 13: VARIACION DE LA ACTIVIDAD DE LA TIMIDILATO SINTETASA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE TUMOR.

GRAFICA 14: ACTIVIDAD DE LA ENZIMA TIMIDILATO SINTETASA A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION.



IV. RESULTADOS

IV. 1. DATOS GENERALES DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION

En la Tabla II se encuentran recogidos los valores de la media y desviación estandar de algunos parámetros (peso corporal, porcentajes relativos de los pesos de hígado y tumor respecto al peso total del animal, nivel de hemoglobina en sangre y concentración de proteínas séricas), característicos de los animales utilizados a lo largo de este trabajo.

Estos parámetros muestran una diferencia estadística muy significativa entre el grupo de ratas normales y el grupo de ratas portadoras de tumor. En la Gráfica 15 está representada la diferencia entre estos valores en los dos grupos de animales estudiados.

Las ratas portadoras de tumor presentan un aumento de la masa hepática, siendo ésta unas 1.3 veces superior a la presentada por los animales normales.

Hemos comprobado también la producción de anemia y de caquexia originada por el tumor en el huesped portador, manifestada en un marcado descenso en el nivel de hemoglobina en sangre y en el de proteínas séricas.

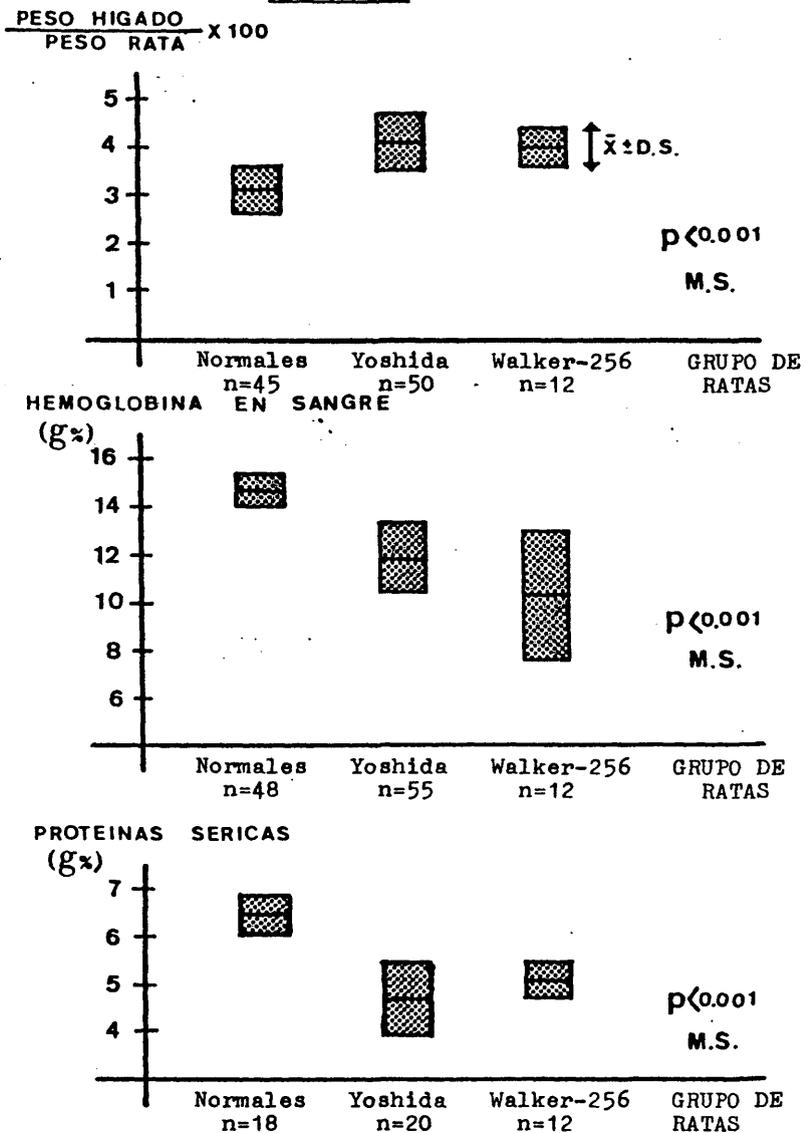
En la Gráfica 16 está representada la relación entre el porcentaje de peso del tumor respecto al peso total del animal, y el nivel de hemoglobina en sangre del mismo. Podemos observar que cuanto mayor es la proporción del peso del tumor en el or-

TABLA II: DATOS GENERALES DE LOS ANIMALES UTILIZADOS A LO LARGO DE TODAS LAS EXPERIENCIAS. ($\bar{x} \pm D.S.$)

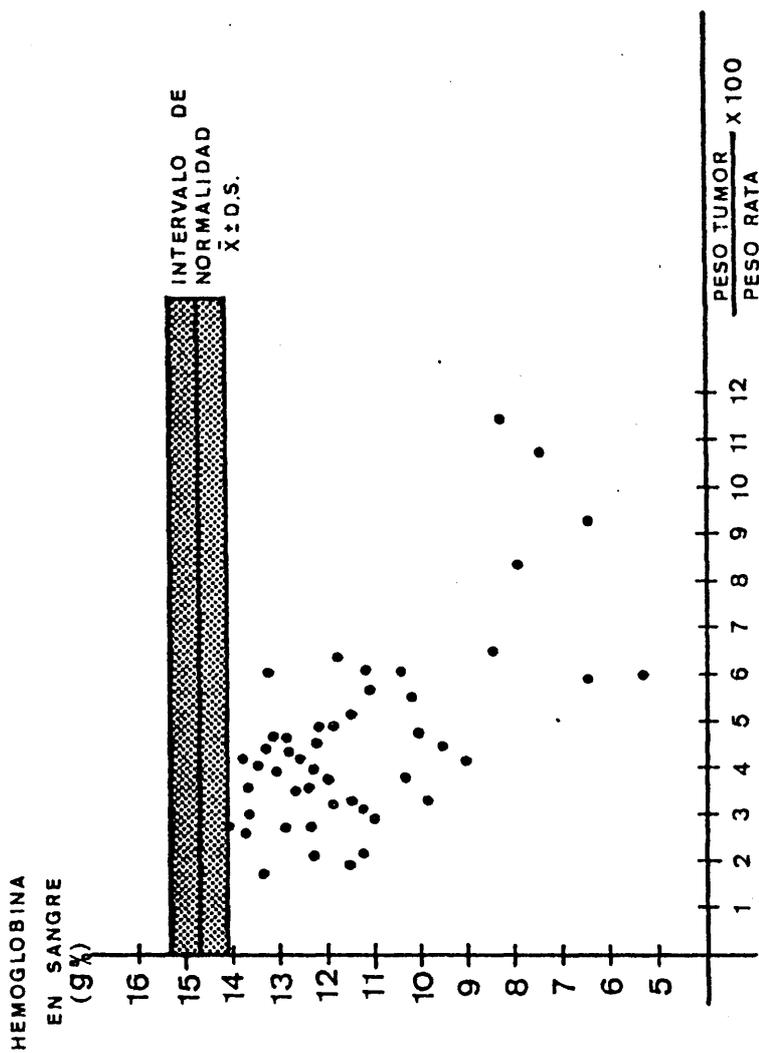
	<u>RATAS</u>	<u>RATAS PORTADORAS</u>	<u>RATAS PORTADORAS</u>
	<u>NORMALES</u>	<u>DEL TUMOR YOSHIDA</u>	<u>DEL TUMOR WALKER-256</u>
Peso (g)	209±29 n=42	162±30 n=50	150±21 n=12
$\frac{\text{Peso hígado}}{\text{Peso total}} \times 100$ (%)	3.12±0.45 n=42	4.14±0.54 n=50	3.98±0.34 n=12
$\frac{\text{Peso tumor}}{\text{Peso total}} \times 100$ (%)		4.11±1.67 n=50	5.65±2.67 n=12
Hemoglobina en sangre (g%)	14.74±0.62 n=42	11.87±1.44 n=50	10.25±2.85 n=12
Proteínas séricas (%)	6.5±0.4 n=18	4.8±0.7 n=20	5.1±0.4 n=12

Significación estadística aplicando la prueba de la t de Student, comparando cada grupo de ratas portadoras de tumor, con el grupo de animales control: $p < 0.001$ en todos los casos \implies diferentes estadística Muy Significativa.

GRAFICA 15



p= parámetro de significación estadística obtenido por la prueba de la t de Student, comparando cada uno de los grupos de ratas portadoras de tumor, con el grupo de animales control.



Gráfica 16

ganismo de la rata, menor es el nivel de hemoglobina que presenta. Aquellos tumores que constituyen más del 6% del peso del animal, originan en el organismo portador un marcado descenso en el nivel de hemoglobina, alcanzándose cifras inferiores a los 9 g%.

IV.2. NIVELES TOTALES DE VITAMINA B₁₂ EN SUERO, HIGADO Y TUMOR DE RATAS PORTADORAS DEL SARCOMA SOLIDO DE YOSHIDA. COMPARACION CON LOS VALORES ENCONTRADOS EN ANIMALES NORMALES.

En la Tabla III se muestra el contenido total de vitamina B₁₂ en el suero de ratas Wistar portadoras del sarcoma sólido de Yoshida (1027±64 pg/ml), en comparación con un grupo de animales control (1077±67 pg/ml). No se observa diferencia estadísticamente significativa (p < 0.30) entre los valores encontrados en el suero de los dos grupos de ratas.

En la Tabla IV están recogidos los valores del contenido de vitamina B₁₂ en el hígado de los animales normales (84 ± 5 pg/mg tejido) y portadores de tumor (104±9 pg/mg tejido).

Dado que el hígado de las ratas portadoras de tumor tiene un peso superior al de las ratas normales, hemos expresado el contenido en vitamina B₁₂ del tejido hepático, tanto por mg de tejido húmedo, como por peso de tejido correspondiente a 100 g de animal. La prueba de significación estadística de la t de Student arroja un valor de p < 0.05 cuando expresamos la cantidad de vitamina B₁₂ por mg de tejido húmedo, y de p < 0.005 cuan

TABLA III: NIVELES TOTALES DE VITAMINA B₁₂ EN SUERO.

UNIDAD: pg de vitamina B₁₂/ml de suero.

RATAS NORMALES

RATAS PORTADORAS DEL
SARCOMA SOLIDO DE YOSHIDA

1130	1321
1372	1242
679	1281
1197	1141
1298	1064
1106	1414
1015	1120
1417	1207
1197	1137
875	822
1302	621
1190	1029
639	1099
1337	686
1218	1078
1449	679
630	472
1274	1085
612	
609	

\bar{x} = 1077
D.S. = 293
E.S.M. = 67
n = 20

\bar{x} = 1027
D.S. = 263
E.S.M. = 64
n = 18

t Student = 0.5498

p < 0.30 Diferencia
estadística No Significativa.

TABLA IV: NIVELES TOTALES DE VITAMINA B₁₂ EN HIGADO

pg vitamina B₁₂/mg tejido hepático húmedo ng vitamina B₁₂/peso de hígado correspondiente a 100 g de animal

<u>Ratas normales</u>	<u>Ratas portadoras tumor Yoshida</u>	<u>Ratas normales</u>	<u>Ratas portadoras tumor Yoshida.</u>
75	73	282	257
60	82	203	449
79	78	252	382
53	182	194	846
108	92	412	453
54	148	206	821
104	126	375	670
85	187	310	753
67	170	348	777
105	56	382	260
79	71	242	315
77	147	379	766
92	70	401	270
133	79	548	309
135	59	513	221
84	74	333	253
89	105	281	406
71	95	248	307
65	50	190	158
129	64	362	221
67	129	201	467
61	148	197	499
70		243	
\bar{x} = 84	\bar{x} = 104	\bar{x} = 309	\bar{x} = 448
D.S. = 24	D.S. = 43	D.S. = 102	D.S. = 223
E.S.M. = 5	E.S.M. = 9	E.S.M. = 22	E.S.M. = 48
n = 23	n = 22	n = 23	n = 22
$t_{\text{Student}} = 1.93939$		$t_{\text{Student}} = 2.71008$	
p < 0.05 Diferencia Significativa		p < 0.005 Diferencia Muy Significativa	

do referimos la cantidad al porcentaje del hígado respecto al peso total del animal. Esto nos indica que la elevación en los niveles de vitamina B₁₂ que encontramos en el hígado de las ratas portadoras de tumor, se hace aún más patente cuando referimos la cantidad de vitamina B₁₂ al peso relativo del hígado, debido a que las ratas portadoras de tumor presentan un aumento del tamaño hepático respecto a las ratas normales.

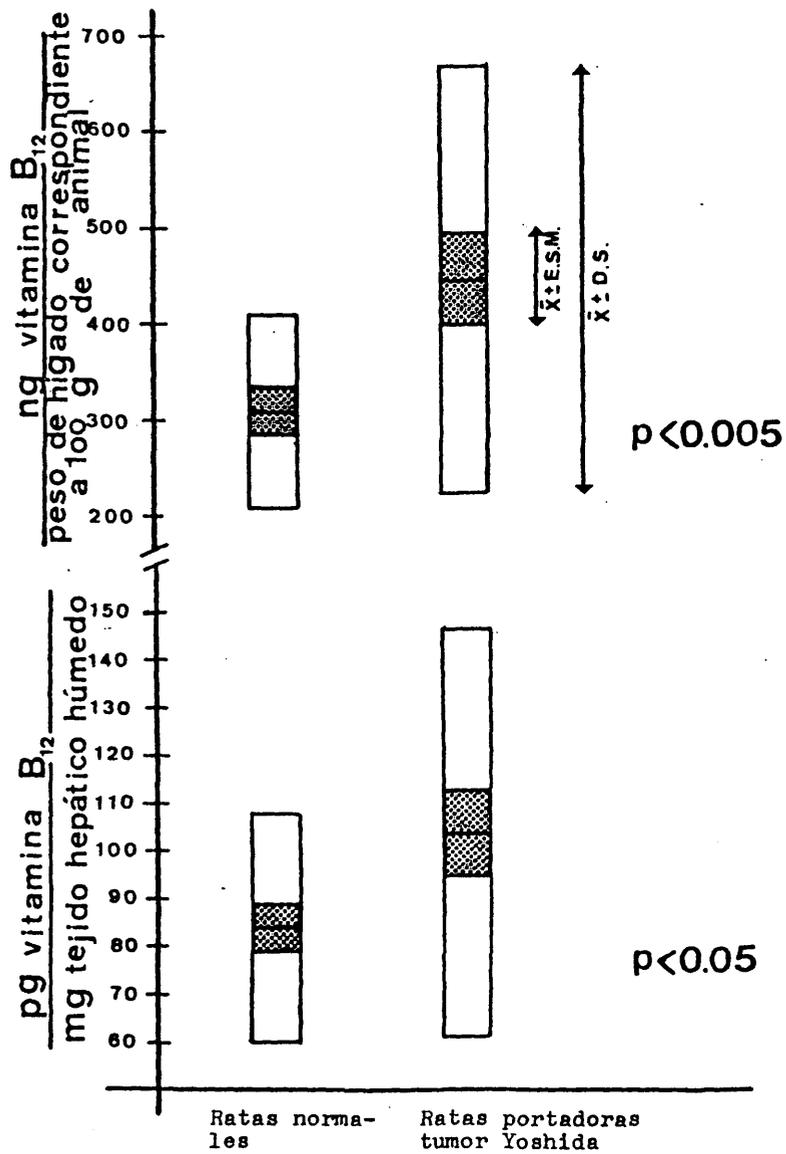
En la Gráfica 17 hemos representado mediante un diagrama de barras, la diferencia de niveles de vitamina B₁₂ en el hígado de animales normales y portadores de tumor.

En la Tabla V se encuentran los valores de vitamina B₁₂ encontrados en el sarcoma sólido de Yoshida. Hemos expresado el contenido total en vitamina B₁₂ referido a mg de tejido tumoral húmedo, y a peso de tumor respecto al peso total del animal. En el tejido tumoral Yoshida se detecta la presencia de vitamina B₁₂, con un valor medio que oscila en el intervalo de 12.33±2.84 pg de vitamina B₁₂/mg de tejido tumoral húmedo. Este valor de vitamina B₁₂ es unas 8.5 veces inferior al encontrado en el hígado de los animales portadores de la neoplasia y unas 80 veces inferior al encontrado en 1 ml de suero de los mismos animales.

IV.3. DISTRIBUCION DE LAS DIFERENTES FRACCIONES DE COBALAMINA

- EN EL SUERO, HIGADO Y TUMOR DE RATAS PORTADORAS DEL SARCOMA SOLIDO DE YOSHIDA. COMPARACION CON LOS VALORES ENCONTRADOS EN ANIMALES NORMALES.

La Tabla VI muestra los valores medios de los porcenta-



GRAFICA 17: NIVELES DE VITAMINA B₁₂ EN HIGADO.

TABLA V: NIVELES TOTALES DE VAMINA B₁₂ EN EL SARCOMA SOLIDO DE YOSHIDA.

<u>pg vitamina B₁₂</u> <u>mg tejido tumoral húmedo</u>	<u>ng vitamina B₁₂</u> <u>peso del tumor correspondiente</u> <u>a 100 g de animal.</u>
9.39	28
7.37	40
14.26	30
13.75	29
11.04	20
12.94	13
13.75	30
15.14	61
10.84	27
6.69	24
12.22	47
14.43	26
12.30	24
7.85	21
13.22	41
15.55	63
14.43	57
16.81	28
12.40	34
x= 12.33	x= 34
D.S.= 2.84	D.S.= 14
E.S.M= 0.65	E.S.M.= 2.23
n= 19	n=19

TABLA VI: FRACCIONES DE COBALAMINA EN SUERO, HIGADO Y TUMOR DE RATAS PORTADORAS DEL SARCOMA SOLIDO DE YOSHIDA.

		% ($\bar{x} \pm E.S.M.$)	
	<u>Fracción cobalamínica</u>	<u>Ratas normales</u> n=18	<u>Ratas portadoras del tumor Yoshida</u> n= 11
SUERO	Me-Cbl.....	no detectable..... (0.6% en un caso)	no detectable
	Ado-Cbl.....	no detectable.....	no detectable
	CN-Cbl.....	84.8±4.0.....	80.0±5.3
	OH-Cbl.....	14.4±3.6.....	20.0±5.3
HIGADO		n=19	n=14
	Me-Cbl.....	1.3±0.7.....	3.4±2.1
	Ado-Cbl.....	51.4±6.8.....	49.8±5.5
	CN-Cbl.....	30.0±7.3.....	22.6±5.2
	OH-Cbl.....	16.7±4.6.....	23.2±5.1
TUMOR			n=12
	Me-Cbl.....		0.7±0.4
	Ado-Cbl.....		39.0±5.7
	CN-Cbl.....		41.0±5.3
	OH-Cbl.....		19.0±1.8

La prueba de significación estadística de la t de Student da un valor de $p < 0.20$, en todos aquellos casos en los que se comparan valores de ratas normales con los de ratas portadoras de tumor, lo cual indica que la diferencia entre ellos es NO SIGNIFICATIVA estadísticamente.

jes de las distintas fracciones de cobalamina en suero e hígado de ratas Wistar portadoras del sarcoma sólido de Yoshida, en comparación con las obtenidas en ratas controles, así como los porcentajes de dichas fracciones en el tejido tumoral Yoshida.

No encontramos diferencias significativas entre los porcentajes de las diferentes fracciones de cobalamina en los dos grupos de animales estudiados. De todas maneras, en un análisis detenido de los resultados, nos parece importante señalar que las ratas portadoras de tumor presentan en el hígado un valor medio de Me-Cbl (3.4%) superior al presentado por las ratas normales (1.3%). La gran dispersión de los valores de los porcentajes en el primer grupo de animales, hace que el cálculo estadístico no arroje diferencia entre los mismos.

Es interesante destacar que en ninguno de los casos se ha detectado la fracción Ado-Cbl en el suero de las ratas, siendo sin embargo ésta la fracción existente en mayor proporción en el tejido hepático.

Salvo en un único caso, tampoco fue detectable la presencia de la fracción Me-Cbl en suero, correspondiendo el mayor porcentaje a la fracción CN-Cbl.

En el tejido tumoral Yoshida se han detectado las 4 fracciones de cobalamina, siendo la Ado-cbl y la CN-Cbl las fracciones existentes en mayor proporción.

IV.4. NIVELES DE FOLATO EN SUERO, HIGADO Y TUMOR DE RATAS PORTADORAS DEL SARCOMA SOLIDO DE YOSHIDA Y DEL CARCINOSARCOMA WALKER-256. COMPARACION CON LOS NIVELES DE FOLATO EN ANIMALES NORMALES.

En la Tabla VII se encuentran los valores de niveles de folato totales correspondientes al suero de ratas portadoras de los tumores Yoshida (21.56 ± 1.92 ng/ml) y Walker-256 (20.29 ± 2.16 ng/ml), en comparación con los de los animales control (24.27 ± 2.04 ng/ml). Las diferencias estadísticas entre cada uno de los grupos, calculadas mediante la prueba de la t de Student,, arrojan valores superiores de $p < 0.15$, que indican que no son significativas.

En la Gráfica 18 están representadas la media y desviación estandar de los niveles de folato sérico, correspondientes a cada uno de los grupos estudiados.

En las Tablas VIII y IX se encuentran recogidos los valores de folato total correspondientes al hígado de las ratas portadoras de los tumores Yoshida (18.93 ± 1.15 µg/g tejido) y Walker-256 (20.68 ± 1.98 µg/g tejido) así como los valores encontrados en los hígados de los animales control (20.55 ± 3.82 µg/g tejido).

No hemos encontrado diferencia estadísticamente significativa entre los 3 grupos de animales estudiados, en los niveles de folato hepático expresados por gramo de tejido. Sin em-

TABLA VII: NIVELES TOTALES DE FOLATO EN SUERO.

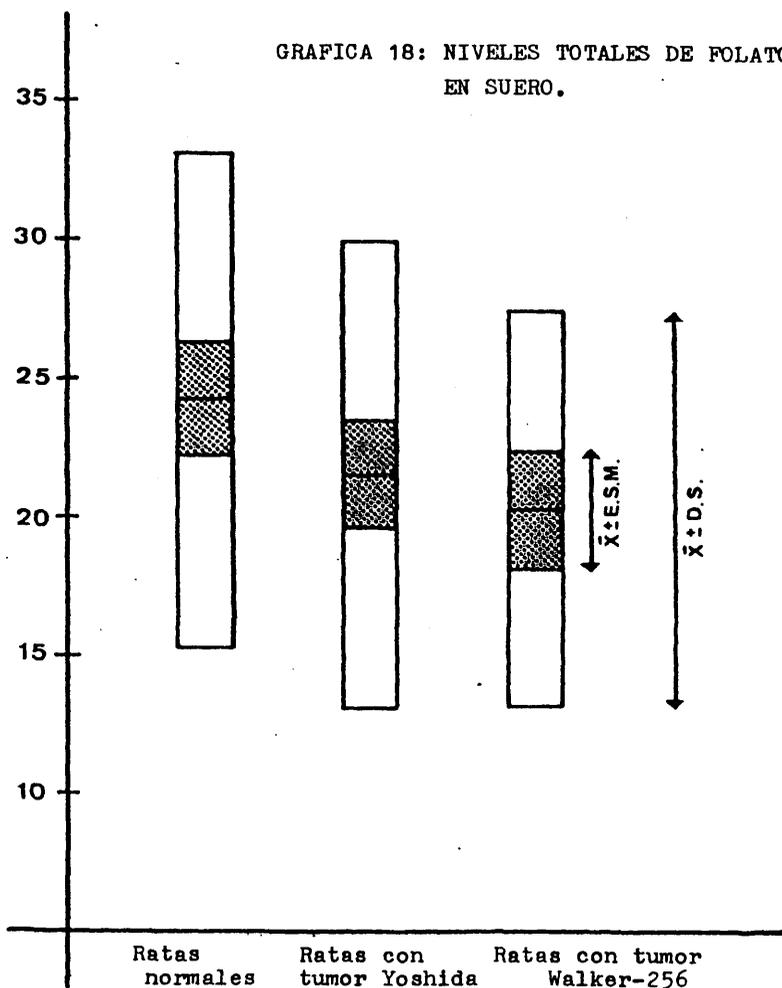
UNIDAD: ng de folato/ml de suero.

<u>Ratas normales</u>	<u>Ratas portadoras de tumor Yoshida</u>	<u>Ratas portadoras de tumor Walker-256</u>
11.37	12.50	20.50
15.20	16.56	12.83
33.62	18.44	16.75
22.00	20.00	14.50
29.50	14.37	11.00
16.00	16.25	12.50
19.25	16.50	28.25
16.75	18.66	21.50
22.70	27.25	20.70
26.60	20.25	30.27
16.00	13.37	32.40
28.00	32.48	22.30
14.50	18.50	
15.70	24.87	
37.50	12.37	
20.25	28.62	
40.25	12.00	
37.50	34.25	
33.75	35.90	
29.00	38.10	
\bar{x} = 24.27	\bar{x} = 21.56	\bar{x} = 20.29
D.S. = 8.91	D.S. = 8.39	D.S. = 7.16
E.S.M. = 2.04	E.S.M. = 1.92	E.S.M. = 2.16
n = 20	n = 20	n = 12

p (Normal-Yoshida) < 0.475 Diferencia estadística No significativa
 p (Normal-Walker-256) < 0.15 "
 p (Yoshida-Walker-256) < 0.35 "

ng folato
ml suero

GRAFICA 18: NIVELES TOTALES DE FOLATO EN SUERO.



p (Normales-Yoshida)<0.47. Diferencia estadística N.S.
 p (Normales-Walker-256)<0.15. " " "
 p (Yoshida-Walker-256)<0.35 " " "

TABLA VIII: NIVELES TOTALES DE FOLATO EN HIGADO

UNIDAD: μg de folato/g de tejido hepático
húmedo.

<u>Ratas normales</u>	<u>Ratas portadoras del tumor Yoshida</u>	<u>Ratas portadoras del tumor Walker-256</u>
23.80	23.92	16.87
20.50	19.13	15.53
14.58	21.53	14.69
23.80	18.64	25.18
17.42	17.52	13.59
23.57	23.23	22.66
19.06	11.12	18.75
24.83	17.89	16.89
23.11	15.94	16.18
24.73	26.09	34.77
21.20	23.59	23.41
19.36	18.75	29.68
18.82	21.00	
22.15	13.01	
21.69	13.50	
17.14	14.95	
11.69	12.75	
17.68	15.75	
25.67	21.00	
21.53	22.75	
16.11	34.29	
19.25	11.50	
17.75	17.67	
27.75		
\bar{x} = 20.55	\bar{x} = 18.93	\bar{x} = 20.68
D.S. = 3.82	D.S. = 5.39	D.S. = 6.58
E.S.M. = 0.79	E.S.M. = 1.15	E.S.M. = 1.98
n = 24	n = 23	n = 12

p (Normales-Yoshida) < 0.15 No Significativa.
 p (Normales-Walker-256) < 0.49 No Significativa.
 p (Yoshida-Walker-256) < 0.25 No Significativa,

TABLA: IX NIVELES TOTALES DE FOLATO EN HIGADO

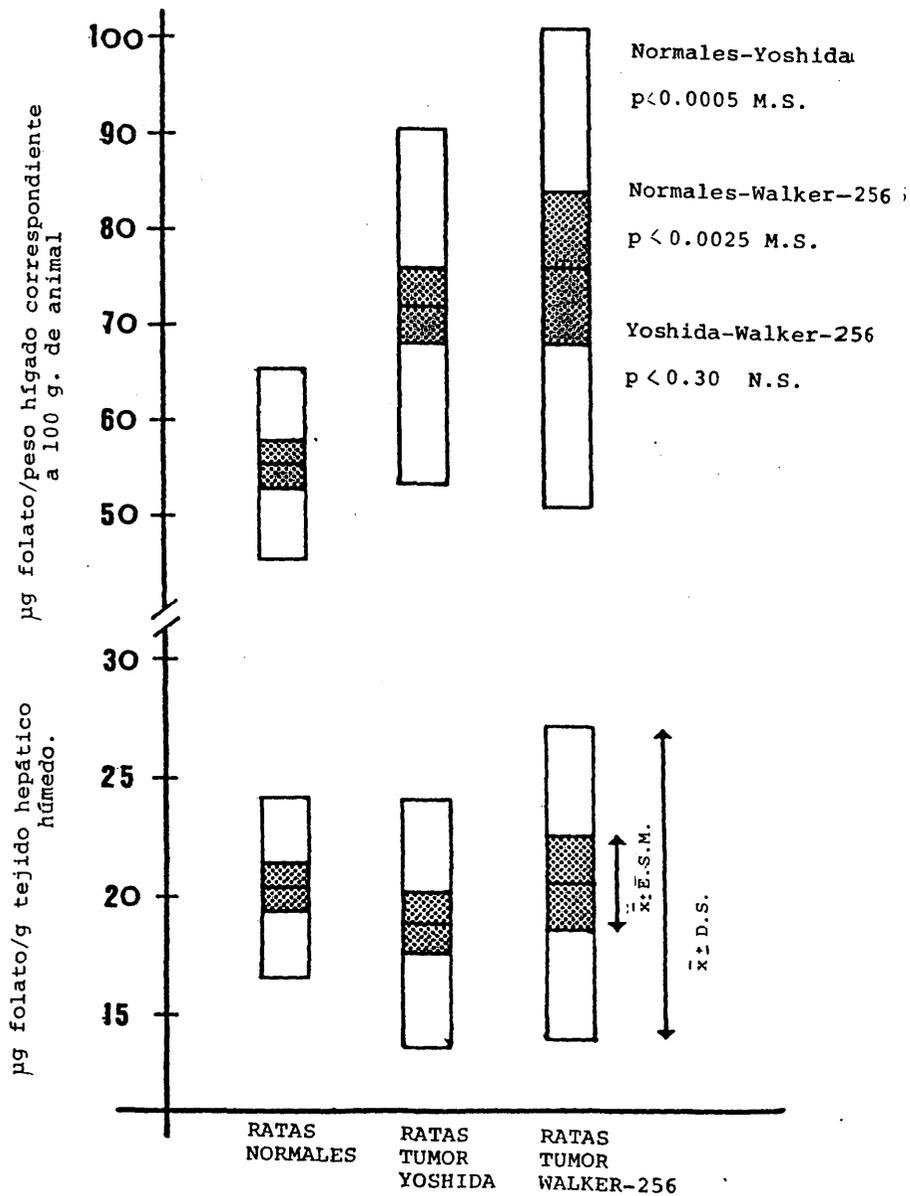
UNIDAD: μg de folato/peso de hígado correspondiente a 100 g de animal.

<u>Ratas normales</u>	<u>Ratas portadoras del tumor Yoshida</u>	<u>Ratas portadoras del tumor Walker-256</u>
64.73	97.39	55.16
55.76	74.88	65.38
39.66	80.07	52.06
64.73	68.68	85.70
47.38	84.25	43.92
64.11	83.97	68.87
50.40	47.48	83.89
71.64	66.55	69.02
67.94	79.85	67.10
64.78	89.85	135.00
53.20	84.66	81.30
50.61	71.61	109.42
48.23	88.00	
57.34	50.06	
50.83	44.67	
43.21	45.30	
43.84	48.78	
45.23	60.60	
73.93	86.85	
57.60	83.81	
46.73	111.99	
50.92	50.60	
51.38	56.98	
70.43		
\bar{x} = 55.61	\bar{x} = 72.17	\bar{x} = 76.40
D.S.=9.93	D.S.= 18.72	D.S.=25.42
E.S.M.= 2.07	E.S.M.=3.99	E.S.M.=7.66
n= 24	n= 23	n=12
p (Normales-Yoshida) < 0.0005		Muy Significativa.
p (Normales-Walker-256) < 0.0025		Muy Significativa.
p (Yoshida-Walker-256) < 0.30		No Significativa.

bargo, debido al mayor peso del hígado en los animales portadores de la neoplasia, tanto los animales con tumor Yoshida como los portadores del tumor Walker-256, presentan un mayor nivel de folato referido a peso de hígado correspondiente a 100 g de animal, que el presentado por el grupo de animales control. Dicho nivel es comparable en los 2 grupos de animales portadores de tumor. La relación entre estos valores está representada en la Gráfica 19.

En la Tabla X se encuentran recogidos los valores de folato medidos en el sarcoma sólido de Yoshida y en el carcinosarcoma Walker-256. Dichos valores varían en el intervalo de 1.5-5 µg de folato/g de tejido tumoral húmedo, en ambos tipos de tejido neoplásico, lo cual representa un porcentaje del 15-17% del nivel de folato presentado en el hígado de las ratas portadoras de tumor.

No hemos encontrado ninguna relación entre el tamaño del tumor y el contenido en folato del mismo (coeficiente de correlación $r = 0.245$ para el tumor Yoshida y $r = 0.564$ para el tumor Walker-256). Hemos buscado también una posible relación entre el peso relativo del tumor y el contenido en folato expresado en peso de tumor correspondiente a 100 g de animal. No hemos encontrado relación entre estos 2 parámetros (coeficiente de correlación $r = 0.405$ para el tumor Yoshida y $r = 0.330$ para el tumor Walker-256).



GRAFICA 19: NIVELES TOTALES DE FOLATO EN HIGADO

TABLA X: NIVELES TOTALES DE FOLATO EN TUMOR.

ug de folato/g tejido tumoral húmedo		ug de folato/peso de tumor correspondiente a 100 g de animal	
Ratas portadoras tumor Yoshida.	ratas portadoras Walker-256	Ratas portadoras tumor Yoshida	Ratas portadoras tumor Walker-256
2.39	2.41	10.79	6.63
3.29	1.59	19.89	9.85
2.13	3.21	13.98	16.82
1.83	2.25	12.00	10.57
2.84	1.26	17.09	14.61
5.18	2.89	31.43	26.97
4.41	4.66	20.19	28.01
2.88	3.05	13.39	16.59
3.10	2.91	15.00	19.36
2.50	5.05	9.11	29.69
4.71	3.63	20.74	22.92
2.03	4.66	6.20	15.10
3.08		8.87	
2.47		12.25	
5.05		18.36	
3.94		14.45	
3.66		12.29	
3.14		13.34	
2.10		8.92	
5.16		20.48	
$\bar{x}=3.28$	$\bar{x}=3.13$	$\bar{x}=14.94$	$\bar{x}=18.09$
D.S.=1.11	D.S.=1.20	D.S.= 5.78	D.S.= 7.49
E.S.M.=0.25	E.S.M.=0.36	E.S.M.= 1.32	E.S.M.= 2.26
n=20	n=12	n=20	n=12
p < 0.40	No significativa	p < 0.10	No significativa

IV.5. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA TIMIDILATO SINTETASA (E.C.2.1.1.45)
EN HIGADO Y TUMOR DE RATAS PORTADORAS DEL SARCOMA SOLIDO
DE YOSHIDA. COMPARACION CON LA ACTIVIDAD ENZIMATICA PRE-
SENTADA POR EL GRUPO DE ANIMALES CONTROL.

En la Tabla XI están recogidos los valores de la actividad de la enzima timidilato sintetasa en el sarcoma sólido de Yoshida. Dicha actividad es muy elevada, presentando un rango de $\bar{x} \pm D.S. = 235395 \pm 62898$ unidades de actividad.

En la Tabla XII están recogidos los valores de actividad de la timidilato sintetasa, que presentan los hígados de las ratas portadoras del sarcoma sólido de Yoshida, en comparación con la actividad presentada por los hígados de los animales control.

Los hígados de los animales normales presentan actividades enzimáticas bajas, aproximadamente de un 1.6% en comparación con la actividad del tumor, variando en un intervalo entre 1066 y 6426 unidades de actividad enzimática, e incluso en 4 de las 16 muestras estudiadas, la actividad no pudo ser detectada.

En los hígados de los animales portadores del sarcoma sólido de Yoshida hemos encontrado que 9 de los 19 casos estudiados, presentan valores de actividad (5358 ± 3408 unidades) iguales a los presentados por los hígados normales (3746 ± 2580 unidades) ($p < 0.20$), mientras que en el resto la actividad es significativamente superior (49633 ± 29808 unidades) ($p < 0.001$).

Dado que el sarcoma sólido de Yoshida es un tumor expe-

TABLA XI: ACTIVIDAD DE LA ENZIMA TIMIDILATO SINTETASA EN EL SARCOMA SOLIDO DE YOSHIDA.

Unidad de actividad: $\frac{\text{dpm producidas por } ^3_1\text{H}}{\text{mg de tejido húmedo, 40 min., } 37^\circ\text{C}}$

<u>Muestra</u>	<u>Unidades de actividad.</u>
1	150000
2	323461
3	342120
4	316024
5	264150
6	221812
7	171582
8	202488
9	159494
10	209109
11	217652
12	330404
13	284623
14	221939
15	192263
16	220038
17	174566

$\bar{x}=235395$

D.S.=62898

n= 17

TABLA XII: ACTIVIDAD DE LA ENZIMA TIMIDILATO SINTETASA EN HIGADO DE RATAS NORMALES Y PORTADORAS DEL SARCOMA SOLIDO EN YOSHIDA.

Unidad de actividad: $\frac{\text{dpm producidas por } ^3\text{H}}{1 \text{ mg tejido húmedo, 40 min., } 37^{\circ}\text{C}}$

Hígado de rata normal.	Hígado de rata portadora de tumor.	Presencia de infiltraciones metastásicas.
6044	indetectable	
1750	indetectable	
indetectable	4200	
1375	1074	
1866	6294	
5832	3642	
indetectable	2729	
indetectable	9981	
8606	9588	
872		
322	26890	+
3044	23912	+
7144	35988	+
indetectable	37625	+
4514	25211	+
3580	22709	+
	72619	++
	71427	++
	68675	++
	111281	+++

Hígado de rata normal.	Hígado de rata portadora de tumor (baja actividad)	t de Student
$\bar{x} = 3746$	$\bar{x} = 5358$	1.1465 p<0.20 No Significativo
D.S. = 2680	D.S. = 3408	
n = 12	n = 7	
Hígado de rata normal.	Hígado de rata portadora de tumor (actividad alta)	t de Student
$\bar{x} = 3746$	$\bar{x} = 49633$	5.3332 p<0.001 Muy Significativo
D.S. = 2680	D.S. = 29808	
n = 12	n = 10	

rimental metastatizable (164), y dada la elevadísima actividad de la timidilato sintetasa que presentan las células tumorales, nos cuestionamos la posibilidad de que la mayor actividad presentada por algunos hígados de animales portadores de tumor, fuera debida a la presencia de infiltraciones de células tumorales en la masa hepática. Debido a ello, enviamos al Departamento de Anatomía Patológica de esta Fundación, muestras de los hígados de las ratas portadoras de tumor, cuya actividad de la timidilato sintetasa era determinada en el laboratorio.

Los resultados obtenidos indicaron la presencia de células tumorales en aquellos hígados que presentaban actividades elevadas de la timidilato sintetasa, superiores a las 20000 unidades de actividad. La apreciación cualitativa del grado de infiltración del tejido, estaba relacionada con un mayor nivel de actividad enzimática.

Esto indica que la actividad de la enzima timidilato sintetasa en el hígado de las ratas portadoras del sarcoma sólido de Yoshida, no difiere significativamente de la que presenta el hígado de los animales controles, y que en aquellos casos en los que existen diferencias, éstas son debidas a la presencia de infiltraciones de células tumorales en el tejido hepático, y no a la propia actividad de las células del hígado del huesped.

V. DISCUSION

Las experiencias realizadas durante el desarrollo de este trabajo han tenido como fin el intentar esclarecer si la captación de metabolitos del huesped, que provoca el crecimiento de una neoplasia, se extiende también a aquellas vitaminas y cofactores esenciales para que se lleven a cabo con normalidad todas las reacciones implicadas en los procesos de división celular.

Hemos escogido la vitamina B₁₂ y los folatos como objeto de esta investigación, por tener sus metabolismos relacionados y estar implicados en la biosíntesis del timidilato, uno de los pasos limitantes de la biosíntesis del DNA.

V.1. Los animales portadores de tumor manifiestan un marcado descenso en el nivel de hemoglobina en sangre y de proteínas séricas.

Estas dos manifestaciones son indicativas de la caquexia general que el crecimiento tumoral provoca en el metabolismo del huesped.

Hemos observado que aquellos tumores que constituyen más del 6% del peso corporal del animal, originan en el organismo portador un marcado descenso en el nivel de hemoglobina, alcanzándose en algunos casos cifras de 9 g. %.

Existe una relación directa entre el descenso en los niveles de hemoglobina y el aumento del tamaño del tumor (Gráfica 16).

Investigaciones anteriores han demostrado que las ratas con tumor Yoshida y Walker-256, junto con la anemia desarrollan una intensa hipoglucemia, que va haciéndose mayor a medida que aumenta el tamaño del tumor (5). De la Piedra y col. (12) llegan a la conclusión de que la anemia que se desarrolla en los animales portadores de tumores experimentales, está causada fundamentalmente por una disminución de precursores metabólicos derivados del metabolismo de los hidratos de carbono, necesarios para la formación de la succinil-CoA, punto de partida para la biosíntesis del Hemo. Dichos autores denominan este tipo de anemia como "anemia por falta de precursores".

En cuanto a la disminución de proteínas séricas en el huesped, es fácil de explicar, ya que está demostrado un acelerado catabolismo de la albúmina en los animales portadores de tumor (18,19) e incluso la captación de la proteína completa por el tejido tumoral (20,21).

V.2. El hígado del huesped portador de una neoplasia, aumenta significativamente de tamaño, en comparación con el hígado de un animal normal.

Este fenómeno podría ser debido a una hiperfuncionalidad del tejido hepático, ya que debido a la acción del tumor, el hígado se ve sometido a un metabolismo intenso, en el que han sido demostrados un activo desdoblamiento de glucógeno para la formación de glucosa (5,7), un intenso metabolismo de la alanina procedente de las proteínas musculares hacia glucosa (16)

y un desdoblamiento de los lípidos hacia la formación de ácidos grasos que van a ser utilizados como combustible metabólico (14).

En resumen, el hígado está sometido durante el desarrollo neoplásico a un metabolismo exacerbado que puede ser el causante de la hipertrofia del órgano.

V.3. Los niveles de vitamina B₁₂ son normales en el suero de los animales portadores de tumor.

Hemos medido un nivel de vitamina B₁₂ de 1077±67 (*) pg/ml de suero en ratas normales, y de 1027±64 pg/ml de suero en ratas portadoras del sarcoma sólido de Yoshida.

Los niveles de vitamina B₁₂ ya habían sido medidos con anterioridad en sueros normales de rata y otros animales de experimentación (118), pero no hemos encontrado ningún trabajo previo sobre los valores de vitamina B₁₂ sérica en ratas portadoras de tumor.

V.4. No hemos detectado la presencia de las fracciones Ado-Cbl y Me-Cbl en suero de rata.

La ausencia de Ado-Cbl en los sueros de las ratas, tanto normales como portadoras de tumor, puede tener su explicación en el hecho de que la Ado-Cbl es la forma de la vitamina que se sintetiza y actúa en la mitocondria, y por lo tanto no debe estar presente en la sangre. En humanos ha sido descrita la ausencia de Ado-Cbl en sangre circulante (131). Sin

(*) $\bar{x} \pm E.S.M.$

embargo, en ratas y en otras especies de mamíferos se ha medido la Ado-Cbl como forma mayoritaria de la vitamina en plasma. En este aspecto, nuestros resultados no concuerdan con los de Quadros y col. (118), que encuentran un valor medio del 55% de Ado-Cbl en el plasma de 3 ratas Wistar. Estos autores encuentran también que la Me-Cbl es la forma de cobalamina minoritaria en la mayoría de los tejidos de rata. Nosotros, salvo en un sólo caso, no hemos detectado la fracción Me-Cbl en suero.

Creemos importante señalar que nosotros hemos analizado 18 sueros normales y 11 sueros de ratas portadoras de tumor, mientras que Quadros y col. (118) basan sus resultados en solamente 3 muestras, lo cual pensamos no permite sacar conclusiones válidas, dada la dificultad que el método cromatobioautográfico entraña.

Ante la sorpresa que nos causó la ausencia de Me-Cbl en suero de rata, nos preguntamos si sería debida a un fallo en el proceso de aislamiento de la vitamina B₁₂ del suero (dicha fracción era determinada en extractos hepáticos y tumorales), y dado que la Me-Cbl ha sido descrita como la forma predominante de la vitamina presente en plasma humano, procesamos 5 sueros humanos normales, apareciendo en todos ellos la fracción Me-Cbl, lo cual indicaba que su ausencia en suero de rata, no era debida a un error en el proceso de extracción.

Por todo ello, nuestros resultados nos conducen a pensar que la Me-Cbl y la Ado-Cbl en suero de rata, o bien están ausentes, o bien están presentes en concentraciones muy bajas,

no sensibles a la determinación por el método cromatobioautográfico que hemos utilizado.

Lo que nos parece más importante es el hecho de que los patrones de distribución de las fracciones de cobalamina sérica, coinciden en los animales normales y portadores de tumor.

V.5. El hígado del huesped portador de la neoplasia presenta niveles de vitamina B₁₂ superiores a los de los animales controles.

El hígado es el órgano del cuerpo en el que el folato está sometido a un metabolismo más intenso, y alberga más de la mitad del total de folatos corporal (165,192).

Si el tumor se abasteciera de la vitamina B₁₂ de procedencia hepática, cabría esperar encontrar una disminución en el nivel de vitamina del hígado del huesped, acompañado de un mayor nivel de vitamina sérica. Pero según nuestros resultados, esto no sucede así. Por el contrario, el animal portador de tumor presenta una elevación en los niveles de vitamina en hígado, es decir, un aumento en el poder de almacenamiento hepático de la vitamina. Creemos que esto puede ser interpretado a la luz de la hiperfuncionalidad del tejido hepático, que exige un nivel mayor de las formas coenzimáticas de cobalamina para cubrir una mayor demanda de coenzimas de folato metabólicamente activas. Esta mayor demanda de folatos activos es lógico que tenga lugar en el hígado, tejido

con un metabolismo intenso provocado por la acción del tumor, en el que las reacciones de transporte de fragmentos de un carbono deben estar aumentadas.

Dado el aumento de tamaño que experimenta el hígado del huésped, cabría incluso preguntarse si esa demanda de folatos activos sería debida a un aumento en la tasa de división de las células hepáticas. A la luz de esta posibilidad la actividad enzimática de la timidilato sintetasa de hígado de los animales portadores de tumor nos indica que no hay un aumento en la tasa de proliferación celular, ya que en los hígados del huésped en los que la actividad es elevada, hemos detectado la presencia de infiltraciones tumorales, y dada la elevadísima actividad de la timidilato sintetasa en células neoplásicas, esa mayor actividad correspondería a las células infiltradas, y no a las del tejido hepático.

Por todo ello, creemos que el aumento en los niveles de vitamina B₁₂ en el hígado del animal portador del sarcoma sólido de Yoshida, puede ser debido a un aumento en el poder de almacenamiento hepático de la vitamina B₁₂, ante el elevado grado de actividad metabólica que desarrolla para proporcionarle al tumor los metabolitos energéticos que éste necesita para su crecimiento.

V.6. En el sarcoma sólido de Yoshida está presente la vitamina B₁₂ pudiéndose detectar en dicho tejido las 4 fracciones de cobalamina.

En el tejido tumoral Yoshida hemos medido un nivel de vi-

tamina B₁₂ de 12.33±2.84 (*) pg/mg de tejido húmedo. Este valor representa solamente un 11,80% del nivel de vitamina B₁₂ que hemos medido en el hígado del huésped.

Por otra parte, si comparamos el valor de vitamina B₁₂ en el tumor, con los encontrados en otros tejidos de rata por Quadros y col. (118), podríamos considerar que el tumor tiene un nivel relativamente bajo de esta vitamina.

Como ejemplos de niveles de vitamina B₁₂ en diversos tejidos de rata, tenemos los siguientes (118):

Eritrocitos: 300±54 (**) pg/ml

Hígado: 64 ±5.6 pg/mg.

Corteza renal: 551±60 pg/mg

Bazo: 46±3.2 pg/mg

Cápsulas adrenales: 259±11.8 pg/mg.

Cerebro: 30±1.6 pg/mg

Corazón: 126±14.5 pg/mg

Mucosa del intestino delgado proximal: 25±3.2 pg/mg

Mucosa del intestino delgado distal: 46±6.4 "

Músculo esquelético: 9±1.8 pg/mg .

Ya con anterioridad había sido descrito que el contenido total de cobalamina en tumores de hígado de rata, es bajo (78,79)

(*) $\bar{x} \pm$ E.S.M.

(**) $\bar{x} \pm$ E.S.M.; n=6 para todos los tejidos, excepto para eritrocitos, en donde n= 3.

Linnell y col. (77) han medido los niveles de vitamina B₁₂ en los hepatomas experimentales de rata, Morris 7777 y Morris 7800, y han encontrado que ambos tipos de hepatomas presentan niveles diferentes de esta vitamina:

Hepatoma Morris 7777: 15.2±0.8 pg/mg tejido húmedo.

(Este valor representa un 12.5% del contenido en vitamina B₁₂ del tejido hepático normal del huesped).

Hepatoma Morris 7800: 81±10 pg/mg tejido húmedo.

(Este valor representa un 51% del contenido en vitamina B₁₂ del tejido hepático normal del huesped).

Una posible causa de la diferencia tan grande de niveles de vitamina B₁₂ en estos dos tipos de hepatoma, puede residir en que el hepatoma 7777 generalmente crece más deprisa y es un tejido menos diferenciado que el hepatoma Morris 7800.

El nivel de vitamina B₁₂ que hemos encontrado en el sarcoma sólido de Yoshida, coincide con el medido en el hepatoma Morris 7777. Por otra parte, dicho nivel es del orden del encontrado en la médula ósea humana normal (12.96±1.44 pg/mg (*)), considerando esta como un tejido normal en proliferación (116). No existen datos sobre valores de vitamina B₁₂ en médula ósea de rata.

(*) $\bar{x} \pm E.S.M.$; n = 13

Todas estas comparaciones nos conducen a la conclusión de que aunque el nivel de vitamina B₁₂ en el tumor pudiera parecerse bajo en comparación con el presentado por el hígado y otros órganos de rata, dicho nivel se corresponde con el de un tejido proliferativo normal.

El no existir un transporte sérico, aumentado de vitamina B₁₂ en los animales portadores de tumor, quizá sea indicativo de que con el aporte normal de la sangre circulante el tumor cubre sus necesidades en vitamina B₁₂, lo cual es lógico si tenemos en cuenta que para desempeñar la función de coenzima, se necesitan cantidades mínimas de la vitamina.

V.7. Posible interpretación de los elevados niveles de CN-Cbl medidos en todos los tejidos estudiados.

La elevada proporción de CN-Cbl que hemos determinado en suero (84.8%), hígado (30%) y tumor (41%), puede extrañar en un principio ya que la CN-Cbl no es una forma de vitamina B₁₂ con actividad de coenzima, e incluso ha sido descrita por algunos autores como forma no fisiológica de la vitamina (167,168). Sobre este último aspecto existen discrepancias, pues hay autores que indican que la CN-Cbl está presente en el organismo, y puede transformarse en las formas de cobalamina metabólicamente activas (51).

En el plasma de sujetos fumadores y en pacientes con afección del nervio óptico, o que presentan algún trastorno en el meta

bolismo del ión cianuro, se han encontrado proporciones muy elevadas de CN-Cbl (169-171). En todos estos casos parece ser que tiene lugar una inactivación de la vitamina B₁₂ metabólicamente activa mediante su conversión en CN-Cbl, fácilmente excretable.

El nivel de CN-Cbl en plasma de rata es muy superior al encontrado en el hombre, y dicho derivado se detecta en todos los tejidos de rata estudiados (118). Esto puede tener su explicación en el hecho de que los niveles del ión cianuro y de tiocianato en plasma de rata normal son mucho más elevados que los humanos, y es posible que parte de ese cianuro se combine con la cobalamina.

Aparte de esta explicación, los animales utilizados en nuestra experiencia reciben el aporte de vitamina B₁₂ de la dieta en forma de CN-Cbl (ver Tabla I), con lo cual no es de extrañar que su presencia en suero sea tan elevada.

V.8. El contenido total de folato en suero e hígado de las ratas portadoras de tumor, no manifiesta ninguna variación respecto a los valores normales.

El nivel de folato total medido por radioanálisis en suero e hígado de rata no muestra diferencias entre el grupo de animales normales y portadores de los tumores Yoshida y Walker-256.

V.9. El tumor satisface su demanda de folato activo con un nivel relativamente bajo de este metabolito.

A pesar del elevado grado de proliferación celular del tejido neoplásico, el nivel de folato medido por radioanálisis es sólo un 15-17% del nivel de folato que presenta el hígado del huesped.

Si comparamos el valor de folato de los dos tipos de tumores con los que hemos trabajado, con los medidos por otros autores

en tejidos en proliferación, encontramos la siguiente relación:

	$\bar{x} \pm E.S.M.$	<u>n</u>
Sarcoma sólido Yoshida	3.28±0,25 µg/g de tejido	20
Carcinosarcoma Walker-256	3.13±0,36 "	12
Hepatoma Novikoff (93)	3.3±0.3 µg/g de tejido	4
Médula ósea de rata (172)	2.38±0.22 "	3

Como podemos observar, estos valores son del mismo orden. Por otra parte, los niveles de folato en tumor son algo superiores a los detectados en riñón, bazo, músculo, intestino, cerebro y corazón de rata (172). Sin embargo, la efectividad metabólica del folato contenido en el tumor es alta, ya que en el tejido tumoral se ha descrito una tasa elevada de síntesis de timidilato y de purinas (173-175).

Los mecanismos de regulación enzimática de la timidilato sintetasa y de la timidina quinasa en el tumor son diferentes de los presentados por un tejido normal no proliferativo (176-179).. En el fibrosarcoma RNC 290, linfoma linfocítico RNC 354, linfoma monocítico 140, hepatoma Morris 7777 y tumor pancreático implantados a ratas, se ha observado que tanto la actividad de la timidilato sintetasa como la de la timidina quinasa son muy altas en comparación con las actividades que presentan los tejidos normales (49). Estas investigaciones indican que en los tejidos neoplásicos hay un desbloqueo de la "vía de recuperación" de la síntesis de timidilato, mediada por la timidina quinasa, independiente de

de folato. Las actividades de estas dos enzimas implicadas en la biosíntesis de timidilato, no presentan una relación recíproca entre ellas durante la diferenciación celular asociada al proceso neoplásico y las actividades que presentan son independientes entre sí (49).

V.10 El contenido celular de los cofactores individuales de folato puede diferir de unos tejidos a otros.

Del estudio de diversos trabajos en los que se han identificado las formas de folato mayoritarias en tumor y en hígado del huésped, se desprende la idea de que los distintos tejidos de un organismo manifiestan requerimientos diferentes de derivados de folato activos, dependiendo de sus rutas metabólicas funcionales más importantes.

Por ejemplo, en dos tipos diferentes de tumores sólidos transplantables, el linfosarcoma Murphy-Sturm y el carcinosarcoma Walker-256, la relación entre los derivados N^{10} -formil-THF: N^5 -metil-THF es de 7:1 en el primer caso, y de 1:4 en el segundo caso (95,180). Dichos tumores difieren en su respuesta al metotrexato como inhibidor de la DHF-reductasa, enzima que presenta el mismo nivel de actividad en ambos tipos de tumor.

Trabajos realizados en los últimos años en los que se han caracterizado las distintas formas de folato presentes en diversos tejidos, muestran que el hígado de las ratas normales tiene una proporción mayor de las formas de folato metiladas (60%) que de las formas formiladas (20%) (181,193), mientras que en las

ratas con tumor la forma hepática mayoritaria es el N^{10} -formil-folato. En ambos casos, la mayor proporción corresponde a las formas pentaglutamato (101, 102, 182).

Los derivados de folato mayoritarios en la orina de las ratas normales están en forma de monoglutamatos, y se detecta una elevada proporción de N^5 -formil-folato y de N^5 -metil-THF (183). Sin embargo, las ratas portadoras de tumor excretan principalmente N^{10} -formil-folato y N^{10} -formil-THF en la orina de 24 horas (99, 104).

Estos resultados son coincidentes con los de otro grupo de investigadores que han demostrado que la actividad de las enzimas que intervienen en la síntesis del N^{10} -formil-THF, está aumentada en condiciones de malignidad (184). Parece probable que en condiciones caracterizadas por un aumento en la tasa de proliferación celular, haya un mayor requerimiento de la forma N^{10} -formil-THF para la biosíntesis de las bases púricas de los ácidos nucleicos.

En extractos de tumor Walker-256 y de hígado de los animales portadores, no se ha detectado la existencia de N^5 -metil-THF como sucede en los hígados normales (99). Connor y Blair (98) han caracterizado la forma N^{10} -formil-folato pentaglutamato en hígado de ratas tanto normales como portadoras de tumor. Sin embargo en el tumor el derivado mayoritario de folato corresponde a la forma reducida N^{10} -formil-THF, y se encuentra también en forma poliglutamato (99, 101).

La presencia de N¹⁰-formil-THF en el tumor puede tener un papel regulador en la división celular. Se sabe que los poliglutamatos del N¹⁰-formil-folato (presentes en el hígado) son potentes inhibidores de la DHF-reductasa, mientras que los poliglutamatos del N¹⁰-formil-THF (presentes en el tumor) no lo son (99,185). Este hecho puede significar la existencia de un mecanismo de control diferente en los tejidos proliferativos y no proliferativos, de manera que en el tumor el folato se metabolice preferentemente hacia el derivado que más favorezca la regeneración del THF.

Los autores de estos trabajos tampoco desechan la posibilidad de que una parte importante del N¹⁰-formil-folato pentaglutamato que miden en el hígado de ratas normales y con neoplasia, derive por simple oxidación del N¹⁰-formil-THF pentaglutamato, durante el proceso de extracción (102).

El análisis de estos trabajos y de nuestros resultados nos sugiere que la regulación metabólica de las reacciones implicadas en el transporte de fragmentos de un carbono en el tumor, no se realiza a través de un aumento del nivel de folato total sino a través de una conversión preferencial del THF hacia los derivados metabólicos más importantes para el desarrollo de dichas reacciones.

Anteriormente se había descrito la existencia de una deficiencia en folatos en pacientes con cancer y en animales portadores de tumores transplantables, medida por una excrección urinaria aumentada de FIGLU (108,93), por el descenso de acti-

vidad en el tumor de varias enzimas implicadas en reacciones de transferencia de un átomo de carbono (94), velocidad de aclaramiento sérico de folato aumentada (113) y niveles séricos de folato disminuidos (109-111). Creemos que dichas deficiencias pueden ser explicadas por la existencia de un cambio en las proporciones y distribución de los cofactores de folato que actúan en condiciones de normalidad, originado por la presencia del tumor.

Los resultados que hemos obtenido a partir de la medida de los niveles de vitamina B₁₂ y de folatos en ratas portadoras del sarcoma sólido de Yoshida y del carcinosarcoma Walker-256, nos llevan a concluir que la presencia del tumor no produce una deficiencia ni de folato ni de vitamina B₁₂ en el huesped portador. El aumento en el nivel de vitamina B₁₂ encontrado en el hígado del huesped debe estar relacionado exclusivamente con la hiperfuncionalidad de este órgano provocada por la presencia del tumor, y no con las necesidades de cobalamina o de folato del tejido neoplásico. Es probable que el efecto del tumor sobre el metabolismo de folato resida en una síntesis preferencial dentro del tejido tumoral, de aquellos cofactores de folato necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos.

VI. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados que hemos obtenido, así como el estudio de los trabajos publicados sobre el metabolismo de la vitamina B₁₂ y de los folatos en procesos neoplásicos, nos ha conducido a las siguientes conclusiones:

1a.- Las ratas portadoras del sarcoma sólido de Yoshida y del carcinosarcoma Walker-256, manifiestan un marcado descenso en el nivel de hemoglobina en sangre, y en el nivel de proteínas séricas. Estas dos manifestaciones son indicativas de la caquexia general que el crecimiento tumoral provoca en el organismo del huésped.

2a.- El hígado de las ratas portadoras de neoplasia manifiesta un destacado aumento de tamaño, en comparación con el hígado de un animal normal. Este aumento del tamaño del hígado no es debido a un aumento en el grado de división de las células hepáticas, ya que la actividad de la enzima timidilato sintetasa es la misma en los hígados de las ratas normales y de las ratas portadoras de tumor.

Creemos que la causa de la hipertrofia del hígado reside en la hiperfuncionalidad metabólica a la que está sometido durante el desarrollo neoplásico, debida a la movilización masiva del combustible metabólico que va a ser utilizado por el tumor.

3a.- Los niveles de vitamina B₁₂ en el suero de las ratas portadoras del sarcoma sólido de Yoshida (1027±64 (*) pg de vitamina B₁₂/ml de suero) coinciden con los que presentan las ratas normales (1077±67) pg de vitamina B₁₂ ml de suero).

En el suero de rata hemos detectado únicamente las fracciones CN-Cbl (84.8±4%) (*) en ratas normales, 80.0±5.3% en ratas portadoras de tumor) y OH-Cbl (14.4±3.6%) en ratas normales, 20.0±5.3% en ratas portadoras de tumor). Las fracciones Me-Cbl y Ado-Cbl en suero de rata, o bien están ausentes, o bien están presentes en concentraciones muy bajas, no sensibles a la determinación por el método cromatobioautográfico que hemos utilizado.

Nos parece importante destacar el hecho de que los patrones de distribución de las fracciones de cobalamina sérica coinciden en los animales normales y portadores de tumor.

4a.- Los hígados de los animales portadores del sarcoma sólido de Yoshida presentan niveles de vitamina B₁₂ (104±9 (*) pg vitamina B₁₂/mg tejido hepático húmedo) superiores a los de los animales control (84±5 pg vitamina B₁₂/mg tejido hepático húmedo).

Se han detectado las 4 fracciones de cobalamina en los hígados estudiados, presentando un patrón de distribución similar en las ratas normales (Me-Cbl=1.3±0.7% (*), Ado-Cbl=51.4±6.8% CN-Cbl=30.0±7.3% y OH-Cbl=16.7±4.6%) y en las ratas portadoras de tumor (Me-Cbl= 3.4±2.1%, Ado-Cbl=49.8±5.5%, CN-Cbl=22.6±5.2% y OH-Cbl=23.2±5.1%)

(*) $\bar{x} \pm E.S.M.$

Creemos que el aumento en los niveles de vitamina B₁₂ en el hígado del animal portador del sarcoma sólido de Yoshida puede ser debido a un aumento en el poder de almacenamiento hepático de la vitamina B₁₂, ante el elevado grado de actividad metabólica que desarrolla.

5a.- En el sarcoma sólido de Yoshida está presente la vitamina B₁₂ (12.33[±] 0.65 (*) pg vitamina B₁₂/mg tejido tumoral húmedo), pudiéndose detectar en dicho tejido las 4 fracciones de cobalamina (Me-Cbl=0.7[±]0.4% (*), Ado-Cbl=39.0[±]5.7%, CN-Cbl=41.0[±]5.3% y OH-Cbl=19.0[±]1.8%).

Aunque el nivel de vitamina B₁₂ en el tumor pudiera ser considerado bajo en comparación con el presentado por el hígado y otros órganos de rata, dicho nivel se corresponde con el de un tejido proliferativo normal, como es la médula ósea humana.

6a.- Los folatos totales medidos en el suero de las ratas portadoras de tumor Yoshida (21.56[±]1.92 (*) ng folato/ml suero) y de las ratas portadoras del tumor Walker-256 (20.29[±]2.16 ng folato/ml suero) no manifiestan ninguna variación significativa respecto a los valores normales (24.27[±]2.04 ng folato/ml suero).

Así mismo, el nivel de folato que hemos medido en el hígado de las ratas portadoras del tumor Yoshida (18.93[±]1.15 (*) µg folato/g tejido hepático húmedo) coinciden con el medido en el hígado de los animales control (20.55[±]0.79 µg folato/g tejido hepático húmedo).

(*) $\bar{x} \pm$ E.S.M.

7a.- El tumor satisface su demanda de folato activo con un nivel reducido de esta vitamina (1.5-5 μg folato/g tejido tumoral húmedo, en ambos tipos de tejido neoplásico) lo cual representa un 15-17% del nivel de folato presentado por el hígado de las ratas portadoras de tumor. Dicho nivel es similar al de la médula ósea de rata.

8a El análisis de varios trabajos publicados sobre las formas de folato presentes en los tumores y de nuestros resultados, nos sugiere que la regulación metabólica de las reacciones implicadas en el transporte de fragmentos de un carbono en el tumor, no se realiza a través de un aumento del nivel de folato total, sino a través de una conversión preferencial de ese folato hacia los derivados metabólicos más importantes para el desarrollo de dichas reacciones o hacia aquellos derivados que a través de mecanismos de control enzimáticos (DHF-reductasa) favorezcan la regeneración de THF.

9a.- La actividad de la enzima timidilato sintetasa que hemos medido en el sarcoma sólido de Yoshida (235395 \pm 62898 unidades de actividad (**)), es muy elevada como sucede en todo tejido en proliferación.

La actividad de la timidilato sintetasa en el hígado de las ratas portadoras del sarcoma sólido de Yoshida (5358 \pm 3408 unidades de actividad) no difiere de la que presenta el hígado de los animales control (3746 \pm 2680 unidades de actividad), y en aquellos casos en los que existen diferencias éstas son debidas a la presencia de infiltraciones de células tumorales,

(**) $\bar{x} \pm$ D.S.; Una unidad de actividad = $\frac{\text{dpm producidas por } ^3\text{H}}{\text{mg de tejido húmedo, 40 min. } 37^{\circ}\text{C}}$

y no a la propia actividad de las células del tejido del huesped.

10a.- En resumen, los resultados que hemos obtenido de la medida de los niveles de vitamina B₁₂ y de los folatos en ratas portadoras del sarcoma sólido de Yoshida y del carcinosarcoma Walker-256, nos llevan a concluir que la presencia del tumor no produce una deficiencia ni de folato ni de vitamina B₁₂ en el huesped portador.

El aumento en el nivel de vitamina B₁₂ encontrado en el hígado del huesped debe de estar relacionado exclusivamente con la hiperfuncionalidad metabólica de este órgano provocada por la presencia del tumor, y no con las necesidades de cobalamina o de folato del tejido neoplásico.

Es probable que el efecto del tumor sobre el metabolismo del folato resida en una síntesis preferencial dentro del tejido tumoral de aquellos cofactores de folato necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos.

VII. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Shapot, V.S. Some biochemical aspects of the relationship between the tumor and the host. Adv. Cancer Res., 15.253, 1972.
- 2.- de la Piedra, C. Anemia y cancer experimental. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid. Año 1977.
- 3.- Weinhouse, S. Glycolysis, respiration and anomalous gene expression in experimental hepatomas: G.H.A. (Clowes Memorial Lecture). Cancer Res., 32, 2007,1972.
- 4.- Waterhouse, C. How tumors affect host metabolism. Ann. N. Y. Acad. Sci., 230,86,1974.
- 5.- de la Piedra, C. y Castro Mendoza, H.J. Glucosa, glucógeno y lactato en ratas portadoras de tumores experimentales carcinosarcoma Walker-256 y sarcoma sólido de Yoshida. Rev. Clin. Esp. 153, 273, 1979.
- 6.- Block, J.B. Lactic acidosis in malignancy and observations on its possible pathogenesis. Ann. N.Y. Acad. Sci., 230, 94, 1974.
- 7.- Gold, J. Cancer cachexia and gluconeogenesis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 230,103, 1974.
- 8.- Landau, E., Wills, N., Craig, J.W., Leonards, J.R. y Moriwaki, T. The mechanism of hepatoma-induced hipoglycemia. Can-

cer, 15,1188, 1962.

- 9.- Carey, R.W., Pretlow, T.G., Ezdinli, E.Z. y Holland, J.F.
Studies on the mechanism of hypoglycemia in a patient with
massive intraperitoneal leiomyosarcoma. Amer.Med., 40,458,1966.
- 10.- Silbert, C.K. Rossini, A.A., Ghazvinian, S., Widrich, W.C.,
Marks, L.J. y Sawin, C.T. Tumor hypoglycemia: Deficient
Splanchnic glucose output and deficient glucagon secretion.
Diabetes, 25,202, 1976.
- 11.- de la Piedra, C., Rubert, L.D., Jerez, E. y Castro Mendo
za, H.J. Glucagon and epinephrine effect on blood glucose
levels in ratas carrying Yoshida solid sarcoma and Walker-
256 carcinosarcoma. Biomedicine, 31, 139, 1979.
- 12.- de la Piedra, C. y Castro Mendoza, H.J. Paralelismo entre
el desarrollo de la anemia y la hipoglicemia en ratas por
tadoras de tumores experimentales carcinosarcoma Walker-
256 y sarcoma sólido de Yoshida. Rev. Clin. Esp., 151,355,
1978.
- 13.- de Wys, W. Working conference on anorexia and cachexia of
neoplastic disease. Cancer Res., 30, 2816, 1970.
- 14.- Bloch- Frankental, L., Langan, J., Morris, H.P. y Weinhouse,
S. Fatty acid oxidation and ketogenesis in transplantable
liver tumors. Cancer Res., 25,732, 1965.

- 15.- Carter, R.L. Experimental tumours and their counterparts in man: some similarities and differences. Br. J. Cancer 41,494, 1980
- 16.- Felig, P.; Pozefsky, T., Marliss, E. y Cahill, G.F. Alanine: key role in gluconeogenesis. Science, 167, 1003, 1970.
- 17.- Felig, P., Owen, O.E.; Wahren, J. y Cahill, G.F. Amino-acid metabolism during prolonged starvation. J. Clin. Invest., 48,584, 1969.
- 18.- Hradec, J. Metabolism of serum albumin in tumour-bearing rats. Br. J. Cancer, 12,290, 1958.
- 19.- Rossing, N. Albumin metabolism in neoplastic disease. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 22,211. 1968.
- 20.- Ryser, H.J.P. Uptake of protein by mammalian cells. An underdeveloped area. Science, 159,390, 1968.
- 21.- Jewell, W.R.; Krishnan, E.C. y Schloerb, P.R. Apparent cellular ingress of albumin in Walker-256 tumor and rat muscle. Cancer Res., 35,405, 1975.
- 22.- Minot, G.R. y Murphy, L.P. Treatment of pernicious anaemia by a special diet. JAMA, 87, 470, 1926,

23. La Land, P. y Klem, A. Acta Med. Scand, 88, 620, 1936
(Cita recogida en "The History of corrinoids", en "Cobalamin Biochemistry and Pathophysiology". Editado por Babior B.M. John Wiley and sons. Pag. 1,1975.
- 24.- Smith, E.L. Purification of anti-pernicious anemia factors from liver. Nature, 161,638, 1948.
- 25.- Rickes E.L. Brinck, N.G., Koniveszky F.R., Wood, T.R. y Folkers K. Crystalline vitamin B₁₂. Science, 107, 396 1948.
- 26.- West, R. Science, 107, 398, 1948. (Recogida en "The History of corrinoids", cita 23).
- 27.-Shord, M.S.J. Biol. Chem. 169, 455, 1947 (Recogida en "The History of corrinoids" cita 23).
- 28.- Barker, H.A., Weissbach, H. y Smyth, R.D. A coenzyme containing pseudovitamin B₁₂. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 44, 1093, 1958
- 29.- Hodgkin, D.C., Kamper, J., MacKay, M., Pickworth, J. Trueblood, K. N. y White, J.G. Structure of vitamin B₁₂. Nature, 178, 64, 1956.
- 30.- Lenhert, P.G. y Hodgkin, D.C. Nature 192, 937, 1961 (Recogida en "The History of corrinoids", cita 23)

- 31.- Foster, M.A., Dilworth, M.J. y Woods, D.D. Nature, 201 39, 1964 (Recogida en "The History of corrinoids", cita 23).
- 32.- Marston, H.R., Allen, S.H. y Smith, R.M. Primary metabolic defect supervening on vitamin B₁₂ deficiency in the sheep. Nature, 190, 1085, 1961.
- 33.- Ertel, R., Brot, N. Taylor, R. y Weissbach, H. Studies on the nature of the bound cobamide in E. Coli N⁵-Methyltetrahydrofolate-homocysteine transmethylase. Arch. Biochem. Biophys., 126, 353, 1968.
- 34.- Taylor, R.T. y Weissbach, H.E. coli B N⁵-Methyltetrahydrofolate homocysteine methyltransferase: Sequential formation of bound methylcobalamin with S-adenosyl-L-Methionine and N⁵-methyltetrahydrofolate. Arch. Biochem. Biophys., 129, 728, 1969.
- 35.- Vitols, E., Walker, G.A. y Heunneken, F.M. Enzymatic conversion of vitamin B₁₂ to a cobamide coenzyme, α (5,6-dimethylbenzimidazolyl) deoxyadenosylcobalamin (adenosyl B₁₂). J. Biol. Chem. 241, 1455, 1966.
- 36.- Walker, G.A., Murphy, S. y Heunneken, F.H. Enzymatic conversion of vitamin B₁₂ to adenosyl B₁₂. Evidence for the existence of two separate reducing systems. Arch.

Biochem. Biophys., 134,95,1969.

- 37.- Mahoney, M.J. y Rosenberg, L.E. Synthesis of cobalamin coenzymes by human cells in tissue culture. J. Lab. Clin. Med. 78, 302, 1971
- 38.- Wills, L. Treatment of "pernicious anaemia of pregnancy" and tropical anaemia. Br. Med. J., 1.1059, 1931
- 39.- Wills, L. y Stewart, A. Experimental anemia in monkeys with special reference to macrocytic nutritional anemia. Br. J. Exp. Path. 16,444, 1935.
- 40.- Snell, E.E. y Peterson, J. J. Bacteriol.,39, 273, 1940
(Cita recogida en "Folic acid, its analogs and antagonist", Girdwood, R. H. Adv. Clin. Chem, 3, 235, 1960)
- 41.- Mitchell, H.K., Snell, E.E. y Williams, R.J. Concentrations of folic acid. J. Am. Chem. Soc., 63, 2284, 1941.
- 42.- Angier, R.B., Booth, J.H., Hutchings, B.L., Mowat, J.H. Semb, J., Stokstad, E.L.R. Subbarow, Y., Waller, C.W. Cosulich, D.B., Fahrenbach, M.J., Hulquist, M.E., Kuh, E., Northey, E.H., Seeger, D.R. Sickls, J.P. y Smith, J.M.Jr. The structure and synthesis of the liver L. casei factor. Science, 103, 667, 1946.

- 43.- Daron, H.H. y Aull, J.L. A Kinetic study of thymidylate synthetase from *Lactobacillus casei*. *J. Biol. Chem.*, 253, 940, 1978
- 44.- Pastore, E.J. y Friedkin, M. The enzymatic synthesis of thymidylate. II. Transfer of tritium from tetrahydrofolate to the methyl group of thymidylate. *J. Biol. Chem.*, 237, 3802, 1962.
- 45.- Bresnick, E. y Karjala, R.J. End-product inhibition of thymidine kinase activity in normal and human leucocytes. *Cancer Res.* 24, 841, 1964.
- 46.- Ferdinandus, J.A., Morris, H.P. y Weber, G. Behavior of opposing pathways of thymidine utilization in differentiating, regenerating and neoplastic liver. *Cancer Res.*, 31,550, 1971.
- 47.-Hooton, J.W.L. y Hoffbrand, A.V. Thymidine kinase in megaloblastic anaemia. *Br. J. Haematol.*, 33,527, 1976
- 48.- Haurani, F.I., Kardinal, C.G. y Bierman, W.A. Thymidylate synthetase and dihydrofolic acid reductase in the stimulated human lymphocyte. *J. Cell. Physiol.*, 95,49, 1978
- 49.- Herzfeld, A. y Raper, S.M. Relative activities of thymidylate synthetase and thymidine kinase in rat tissues.

Cancer Res., 40,744, 1980

- 50.- Metz, J., Kelly, A., Swett, V.C., Waxman, S. y Herbert, V. Deranged DNA synthesis in bone marrow from vitamin B₁₂ deficient humans. Br.J.Haematol., 14, 575, 1968
- 51.- Herbert, V. y Das, K.C. The role of vitamin B₁₂ and folic acid in hemato and other cell- Poiesis. Vitam. Horm., 34,1,1976
- 52.- Herbert, V. y Zalusky, R. Interrelations of vitamin B₁₂ and folic acid metabolism: Folic acid clearance studies. J. Clin. Invest., 41, 1263, 1962.
- 53.- Donaldson, K.O. y Keresztesy, J.C. Naturally occurring forms of folic acid. II. Enzymatic conversion of methylene THF to prefolic A-methyl-THF. J. Biol. Chem. 237, 1298, 1962.
- 54.- Kutzbach, C. Stokstad, E.L.R. Mammalian methylene THF reductase. Partial purification, properties and inhibition by S-adenosylmethionine. Biochem. Biophys. Acta. 250, 459, 1971.
- 55.- Stebbins, R.D., Meller, E., Rosengarten, H., Friedhoff, A y Silber, R. Identification of N⁵, N¹⁰-Methylentetrahydrofolate reductase as the enzyme involved in the 5-

methyltetrahydrofolate-dependent formation of a β -carbo-
line derivative of 7-hydroxy-tryptamine in human platelets.
Arch. Biochem. Biophys., 173,673, 1976.

- 56.- Pearson, A.G.M. y Turner, A.J. Folate dependent 1-car-
bon transfer to biogenic amines mediated by methylene
tetrahydrofolate reductase. Nature, 258, 173, 1975.
- 57.- Lavoie, A., Tripp, E. y Hoffbrand, A.V. The effect of
vitamin B₁₂ deficiency on methyl folate metabolism and
pteroyl-plyglutamate synthesis in human cells. Clin.
Sci. Mol. Med., 47, 617, 1974.
- 58.- Levy H.L., Mudd, S.S., Schulman, J.D., Dreyfus, P.M.
y Abeles, R.H. A derangement in B₁₂ metabolism associa-
ted with homocystinemia, cystathionemia, hypomethione-
mia and methylmalonic aciduria. Am. J. Med., 48, 390, 1970
- 59.- Goodman, S.I., Mee, P.G., Hammond, K.P., Mudd, S.H. y
Uhlendorf, B.W. Homocystinuria with metylmalonic aciduria.
Two cases in a sibships. Biochem. Med., 4:500. 1970
- 60.- Dillon, M.J., England., Gompertz, D., Goodley, P.A.
Grant, D.B. Hussein, H.A.A., Linnel, J.C., Matthews, D.M.
Mudd, S.H., Newns, G.H., Seakind, J.W., Uhlendorf, B.W.
y Wise, I.J. Mental retardation, myeloblastic anaemia,
methylmalonic aciduria, and abnormal homcysteine meta-

bolism due to an error in vitamin B₁₂ metabolism. Clin. Sci. Mol. Med., 47,43, 1974

61.- Zittoun, J., Marquet, J. y Zittoun, R. Effect of folate and cobalamin compounds on the deoxyuridine supresion test, in vitamin B₁₂ and folate deficiency. Blood, 51, 119, 1978.

62.- Lushy, A.L., Eagle, F.J., Roth, E. y Cooperman, J.M. Relapsing megaloblastic anemia in an infant due to a specific defect in gastrointestinal absorption of folic acid. Am. J. Dis. Child, 102, 482, 1961.

63.- Lanzhowsky, P. Congenital malabsorption of folate. Am. J. Med., 48, 580, 1970.

64.- Oleson, J.J. y Little, P.A. Effect of pteroylglutamic acid and vitamin B₁₂ on growth of Rous tumour implants. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 71, 226, 1949.

65.- Yamamoto, R.S. Effect of vitamin B₁₂ deficiency in colon carcinogenesis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 163, 350, 1980.

66.- Day P.L., Payne L.D. y Dinning J.S. Procarcinogenic effect of vitamin B₁₂ on p-dimethylaminoazobenzene-fed rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 74,854, 1950.

- 67.- Miller, E.C., Plescia, A.M., Miller, J.A. y Heidelberg, C.H. The metabolism of methylated aminoazo dyes. *J. Biol. Chem.*, 196, 863, 1952.
- 68.- Grossowicz, N. Hochman, A., Aronovitch, J. Izak, G. y Rachmilewitz, M. Malignant growth in the liver and serum vitamin B₁₂ levels. *Lancet*, 1, 1116, 1957.
- 69.- Waxman, S. y Gilbert, H.S. A tumor-related vitamin B₁₂ binding protein in adolescent hepatoma. *N. Engl. J. Med.* 289, 1053, 1973.
- 70.- Waxman, S. y Gilbert, H.S. Characteristics of a novel serum vitamin B₁₂ -binding protein associated with hepatocellular carcinoma. *British J. Haematol.* 27, 229, 1974.
- 71.- Burger, R.L. Waxman, S., Gilbert, H.S., Mehlman, C.S. y Allen, R. H. Isolation and characterization of a novel vitamin B₁₂ binding protein associated with hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Invest.*, 56, 1262, 1975.
- 72.- Ellenbogen, L. Absorption and transport of cobalamin. En: "Cobalamin, Biochemistry and pathophysiology". Editado por Babior. John Wiley and sons. Pag. 215, 1975
- 73.- Waxman, S., Llu, C.K., Schreiber, C. y Helson, L. The

clinical and physiological implications of Hepatoma B₁₂
-binding proteins. Cancer Res., 37, 1908, 1977.

74.- Kubasik, N.P., Ricotta, M. y Sine, H.E. Comercially -su
plied binders for plasma cobalamin (vitamin B₁₂) analy
sis. Clin. Chem., 26,598,1980

75.- Carmel, R. y Eisenberg, R. Serum vitamin B₁₂ and trans-
cobalamin abnormalities in patients with cancer. Cancer,
40, 1348, 1977.

76.- Pierce, K., Abe, T. y Cooper, B.A. Incorporation and
metabolic conversion of cyanocobalamin by Enrich as-
cites carcinoma cells in vitro and in vivo. Biochim.
Biophys. Acta, 381, 348, 1975.

77.- Linnell, J.C., Quadros, E.V., Matthews, D.M., Morris,
H.P. y Poirier, L.A. Altered cobalamin distribution in
rat hepatomas and in liver of rats treated with diethyl
nitrosamine. Cancer Res, 37, 2975, 1977.

78.- Stein, O., Stein, Y., Aronovitch, J., Grossowickz, N. y
Rachmilewitz, M. Isotopic and microbiological studies
of vitamin B₁₂ distribution in normal and hepatoma -bea
ring rats. Cancer Res. 18,849,1958.

79.- Mitbander, V.B. Noronha, J.M., Rege, D.V. y Sreenivasan,

- A. Studies on 4-Dimethylaminoazobenzene-induced hepatoma in rats. I. Certain biochemical alterations in liver and blood. Indian J.Med. Res., 50,478, 1962
- 80.- Myasishcheva, N.V., Quadros, E.V., Vares, Y.V. y Linnell, J.C. Interference with cobalamin metabolism and tumor growth by an analogue of methyl cobalamin. En: "Vitamin B₁₂". Editado por B. Zagaak y V. Piedrich. Pag 1125, 1979.
- 81.- Halpern, B.C., Clark, B.R., Hardy, D.N., Halpern, R.M. y Smith, R. A. The effect of replacement of methionine by homocystine on survival of malignant and normal adult mammalian cells in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 71, 1133, 1974.
- 82.- Ashe, H., Clark, B.R., Chu, F., Hardy, D.N., Halpern, B.C., Halpern, R.M. y Smith, R.A. N⁵-methyltetrahydrofolate: homocysteine methyltransferase activity in extracts from normal, malignant and embryonic tissue culture cells. Biochem. Biophys. Res. Commun, 57, 417, 1974.
- 83.- Ashe, H., Hardy, D.N. Jenkinson, P.Y., Chour, S.C. y Smith, R.A. New approach to antifolate treatment of certain cancers as demonstrated in tissue culture. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 72, 4018, 1975.
- 84.- Kreiss, W. y Hession, C. Biological effects of enzymatic

deprivation of L-methionine in cell culture and in experimental tumor. *Cancer Res.*, 33, 1866, 1973.

85.- Craft, I.L. Matthehs, D.M. y Linnell, J.C. Cobalamins in human pregnancy and lactation. *J. Cli. Path.*, 24,449 1971.

86.- Linnell, J.C. The fate of cobalamin in vivo. En: "Cobalamin. Biochemistry and pathophysiology". Editado por Babior. John Wiley and sons, pag. 287, 1975.

87.- van der Weyden. M.B., Cooper, M. y Firkin, B.G. Defective DNA synthesis in human megaloblastic bone marrow. *Blood* 41, 299, 1973.

88.- Rosen F. y Nichol, C.A. Inhibition of an amethopterin-refractory tumor by dietary restriction of folic acid. *cancer res*, 22, 495, 1962.

89.- Landi, L. Pasquali, P. y Marchetti, M. Metabolism of folate coenzymes in the developing chick embryo. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 141,173,1972.

90.- Barbiroli, B., Bovina, C., Tolomelli, B. y Marchetti M. Folate metabolism in the rat liver during regeneration after partial hepatectomy. *Biochem. J.*, 152,229, 1975.

- 91.- Halpern, R.M., Halpern, B.C., Clarck, B.R., Ashe, H., Hardy, D.N., Jenkinson, P.Y., Chou, S.C. y Smith, R.A. New approach to antifolate treatment in certain cancers as demonstrated in tissue culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 72, 4018, 1975.
- 92.- Semon, J.H. y Gridney, G.B. Potentiation of the antitumor activity on methotrexate by concurrent infusion of thymidine. Cancer Res., 38, 2905, 1978.
- 93.- Poirier, L.A. Folate deficiency in rats bearing the Walker tumor 256 and the Novikoff Hepatoma. Cancer Res., 33, 2109, 1973.
- 94.- Lepage, R., Poirier, L.A., Poirier, M.C. y Morris H.P. The enzymology of the formation and interconversion of labile 1-carbon groups in five hepatomas and on Walker tumor 256. Cancer Res., 32, 1099, 1972.
- 95.- Sotobayashi, H. Rosen, F. y Nichol, C.A. Tetrahydrofolate cofactors in tissues sensitive and refractory to amethopterin. Biochemistry, 5, 3878, 1966
- 96.- Werkheiser, W.C. The biochemical, cellular and pharmacological action and effects of the folic acid antagonists. Cancer Res. 23, 1277, 1963.
- 97.- Barford, P.A., Staff, F.J. y Blair, J.A. Retained fola-

tes in the rat. Biochem.J., 164,601, 1977.

- 98.- Connor, M.J., Blair, J.A. y Barford P.A. Isolation, purification, characterization and metabolism of high-molecular weight folate from rat liver. Biochem. Soc. Trans., 5,1319, 1977.
- 99.- Barford, P.A. y Blair, J.A. Effect of an implanted Walker tumour on metabolism of folic acid in the rat. Br. J. Cancer, 38, 122, 1978.
- 100.- Barford, P.A., Staff, F.J. y Blair, J.A. The metabolic fate of (2-¹⁴C)-Folic acid and a mixture of (2-¹⁴C) and (3', 5', 9-³H) -Folic acid in the rat. Biochem. J., 174,579,1978.
- 101.- Bates.J., Pheasant, A.E. y Connor,H.J. Folate polyglutamate biosynthesis in the liver tumour and intestine of rats bearing the Walker 256 carcinosarcoma. Biochem. Soc. Trans., 8, 575, 1980.
- 102.- Connor, M.J. y Blair, J.A. The identification of the folate conjugates found in rat liver 48 h. after the administration of radioactively labelled folate tracers. Biochem. J., 186,235, 1980.
- 103.- Barford,P.A. Blair, J.A., Staff, F.J. y Malghani M.A.K.

The metabolism of folates in the rat: studies with ^3H and ^{14}C -labelled folic acid in the presence and absence of methotrexate. *Biochem. Soc. Trans.*, 5, 1316, 1977.

- 104.- Connor, M.J. y Blair, J.A. The metabolism of 10-formyl folate in the normal rat and the rat bearing the Walker 256 carcinoma. En "Chemistry and Biology of pteridines". Editado por Kisliuk & Brown. Elsevier North Holland, Inc. Pag. 531, 1979.
- 105.- Ratanasthien, K., Blair, J.A., Leeming, R.J., Cooke, W.T. y Melikian, V. Folates in human serum. *J. Clin. Path.*, 27, 875, 1974.
- 106.- Ives, D.H., Morse, P.A. Jr. y van Potter, R. Feed-back inhibition of thymidine kinase by thymidine triphosphate. *J. Biol. Chem.*, 238, 1467, 1963.
- 107.- Marchetti, M., Tolomelli, B. Formiggini, G. y Bovina, C. Distribution of pteroilglutamates in rat liver during regeneration after partial hepatectomy. *Biochem. J.*, 188, 553, 1980.
- 108.- Carey, R.W., Brena, G.P. y Krant, M.J. Urinary formimino glutamic acid excretion in patients with neoplastic disease. *Cancer*, 17, 713, 1964.
- 109.- Rao, R.P.B., Lagerlöf, B. Einhorn, J. y Reizenstein,

P.G. Folic acid activity in leukemia and cancer. *Cancer Res.*, 25, 221, 1965.

110.- Rao, R.P.B., Lagerlöf, B., Einhorn, J. y Reizenstein, P.G. Low serum-folic acid in malignancy. *Lancet* 1, 1193, 1963.

111.- Hellman, S., Iannotti, A.T. y Bertino, J.R. Determinations of the levels of serum folate in patients with carcinoma of head and neck treated with methotrexate. *Cancer Res.*, 24, 105, 1964.

112.- Rose, D.P. Folic acid deficiency in leukaemia and lymphomas. *J. Clin. Path.*, 19,29,1966

113.- Einhorn, J. y Reizenstein, P. Metabolic studies on folic acid in malignancy. *Cancer Res.*, 26,340. 1966.

114.- Salem, A.M., Pheasant, A.E., Blair, J.A. y Allan, R.N. The effect of malignant disease on the metabolism of pteroylglutamic acid in man. 590th Meeting Sheffield, 1980.

115.- Pheasant, A.E., Blair, J.A. y Allan, R.N. Folic acid metabolism in man. En "Chemistry and Biology of pteridines". Editado por Kisliuk/Brown. Elsevier North Holland. Inc. Pag. 327, 1979.

- 116.- Matthews, D.M. Gunasegaram, R. y Linnell, J.C. Results with radioisotopic assay of serum B₁₂ using serum binding agent. J. Clin. Path., 20,683,1967
- 117.- Henry, R.J. Determinación de la hemoglobina en sangre. Técnica de la cianmetahemoglobina. En "Química Clínica. Principios y técnicas". Editorial Jims, Barcelona. Pag. 904,1969.
- 118.- Quadros, E.V., Matthews, D.M., Wise, I.J. y Linnell, J.C. Tissue distribution of endogenous cobalamins and other corrins in the rat, cat and guinea pig. Biochim Biophys. Acta, 421, 141, 1976.
- 119.- Rothenberg, S.P. Assay of serum vitamin B₁₂ concentration using Co⁵⁷-B₁₂ and Intrinsic Factor. Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 108, 45,1961.
- 120.- Rothenberg, S.P. Radioassay of serum vitamin B₁₂ by quantitating the competition between Co⁵⁷-B₁₂ and unlabeled B₁₂ for the binding sites of Intrinsic Factor. J. Clin. Invest., 42, 1391,1963.
- 121.- Lau, K.S., Gottlieb, C., Wasserman, L.R. y Herbert, V. Measurement of serum vitamin B₁₂ level using radioisotope dilution and coated charcoal. Blood, 26,202, 1965.
- 122.- Grossowicz, N., Silitzeanu, D. y Merzbach, D. Isotopic

determination of vitamin B₁₂ binding capacity and concentration. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 109,604,1962.

123.- Barakat, R.M., y Ekins, R.P. An isotopic method for the determination of vitamin B₁₂ levels in blood. Blood, 21,70,1963.

124.- Ekins, R.P. y Sgherzi, A.M. En: "Radiochemical methods of analysis". International Atomic Energy Agency. Vienna, 1965. Pag. 239 (Recogida en la cita 116).

125.- Hall, C.A. Vitamina B₁₂ assay. Lancet, 2,862, 1966

126.- Spray, G.H. An improved method for the rapid estimation of vitamin B₁₂ in serum. Clin. Sci., 14, 661,1955

127.- Hippe, E. Reliability of cobalamin assays. N. Eng. J. Med., 300, 141, 1979

128.- Kolhouse, J.F., Kondo, H., Allen, N.C., Poddel, E. y Allen, R.H. Interference by cobalamin analogues with measurement of plasma cobalamin. N. Eng. J. Med., 299,785,1978

129.- Babior, B.M. Cobalamin. Biochemistry and pathophysiology. Editado por John Wiley and sons. New York, 1975

- 130.- Linnell, J.C., Mackenzie, H.M., Wilson, J. y Matthews D.M. Patterns of plasma cobalamins in control subjects and in cases of vitamin B₁₂ deficiency. J. Clin. Path., 22,545, 1969.
- 131.- Lindstrand, K. Stalhberg, K.G. On vitamin B₁₂ forms in human plasma. Acta Med. Scand.,174, 665, 1963.
- 132.- Lindstrand, K. Isolation of methylcobalamin from natural source material. Nature, 204, 188, 1964.
- 133.- Linnell, J.C., Hussein, H.A-A. y Matthews, D.M. A two-dimensional chromato-bioautographic method for complete separation of individual plasma cobalamins. J. Clin. Path., 23,820, 1970.
- 134.- Dunn, R.T. y Foster, L.B. Radioassay of serum folate. Clin. Chem, 19,1101, 1973.
- 135.- Baker, H., Herbert, V, Frank, O., Pasher, I., Hutner S.H., Wassermann, L.R. y Sobotka, H. A Microbiological method for detecting folic acid deficiency in man. Clin Chem., 5,275, 1959.
- 136.- Gupta, V.S. y Huennekens, F.M. Preparation and properties of crystalline 5-Methyl-tetrahydrofolate and related compounds. Arch. Biochem. Biophys., 120,712, 1967.

- 137.- Rothenberg, S.P., da Costa, M. y Rosenberg, Z. A radio assay for serum folate: use of a two-phase sequential-incubation, ligand-binding system. N. Eng. J. Med., 286, 1335, 1972.
- 138.- Henry, R.J. Determinación de las proteínas mediante la reacción del Biuret. En: "Química Clínica. Principios y técnicas". Editorial Jims, Barcelona. Pag, 216, 1969
- 139.- Ghitis, J. The folate binding in milk. Am. J. Clin. Nutr., 20,1, 1967.
- 140.- Metz, J., Zalusky, R. y Herbert, V. Folic acid binding by serum and milk. Am. J. Clin. Nutr., 21, 289, 1968
- 141.- Waxman, S., Schreiber, C. y Herbert, V. Measurement of serum folate levels by radioisotope dilution assay. Blood, 36, 858, 1970.
- 142.- Waxman, S., Schreiber, C. y Herbert, V. Radioisotopic assay for measurement of serum folate levels. Blood, 38, 219, 1971
- 143.- Ford, J.E., Salter, D.N. y Scott, K.J. The folate binding protein in milk. J. Dairy Res., 36.435, 1969
- 144.- Longo, D.L. y Herbert, V. Radioassay for serum and red cell folate. J. Lab. Clin. Med., 87, 138, 1976.

- 145.- Markkanen, T. y Peltola, O. Carrier proteins of folic acid activity in human serum. *Acta Haematol.*, 45 106, 1971.
- 146.- Waxman, S. y Schreiber, C. Further studies of serum folic acid binding protein (FABP). *Am. J. Clin. Nutr.*, 25, 450, 1972
- 147.- Waxman, S. y Schreiber, C. Characteristics of folic acid-binding protein in folate deficient serum. *Blood*, 42, 291, 1973.
- 148.- Waxman, S. y Schreiber, C. The role of folic acid binding proteins (FABP) in the cellular uptake of folate *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 147, 760, 1974
- 149.- Zettner, A. y Duly, P.E. New evidence for a binding principle specific for folates as a normal constituent of human serum. *Clin. Chem.*, 20, 1313, 1974
- 150.- Waxman, S. Folate binding proteins. *Br. J. Haematol.*, 29, 23, 1975.
- 151.- Rothenberg, S.P. and da Costa, M. Further observations on the folate binding factor in some leukemic cells. *J. Clin. Invest.* 50, 719, 1971
- 152.- Da Costa, M. y Rothenberg, S.P. Appearance of a folate

binding protein in leucocytes and serum of women who are pregnant or taking oral contraceptives. J. Lab. Clin. Med., 83,207,1974.

- 153.-Eichner, E.R., Painer, C.J., Dickson, V.L. y Hargrove, M.D. Clinical and laboratory observations on serum f_olate binding protein. Blood, 46,599,1975.
- 154.- Beard, M.E.J. y Allen, D.M. Effect of antimicrobial agents on the Lactobacillus casei folate assay. Amer J. Clin. Path., 48, 401,1967.
- 155.- Shane, B., Tamura, T. y Stokstadd, E.L.R Folate assay: a comparison of radioassay and microbiological methods. Clin. Chim. Acta., 100,13, 1980
- 156.- Klipstein, F.A.;Lipton, S.D. y Schek, A. Folate deficiency of the intestinal mucosa. Am. J. Clin.Nutr., 26,728,1973.
- 157.- Bennet, M.C., Berry, V., Chanarin, I. y Ardeman, S. The assay of folic acid activity of liver. J. Clin. Pathol., 17,27,1964
- 158.- Laso, F.J., Culebras, J.M. y Celada, A. Dosificación del ácido fólico sérico, aislada y simultaneamente con la de vitamina B₁₂, mediante radioanálisis. Sangre, 23,587,1978

- 159.- Lomax, M.I.S. y Greenberg, G.R. A new assay of Thymidylate synthetase activity based on the release of tritium from Deoxyuridylate-5-³H. J. Biol. Chem., 242, 109 1967.
- 160.- Gomez, C., Montanés, I. y Vicente, J. Biosíntesis del DNA en el hígado de animales portadores de tumores extrahepáticos: Papel de la Timidilato sintetasa. Rev. Clin. Esp., 159,163,1980.
- 161.- Friedkin, M.J. Methods in Enzymology. Editado por Colowick y Kaplan. Academic Press, N.Y. Vol. VI, pag. 124, 1963.
- 162.- Wahba, A.J. y Friedkin, M. The enzymatic synthesis of thymidylate. I. Early steps in the purification of thymidylate synthetase of Escherichia coli. J. Biol. Chem., 237,3794,1962.
- 163.- Roberts, D. An isotopic assay for thymidylate synthetase. Biochem., 5,3546,1966
- 164.- Carter, R.L. Metastasis. En: "Biology of Cancer". Editado por Ambrose E.J. y Roe, F.J.C. pag. 75, 1975
- 165.- Chanarin, I. Cobalamins and nitrous oxide: a review. J. Clin. Pathol., 33,909, 1980.

- 166.- Linnell, J.C., Hoffbrand, A.V., Hussein, H.A.; Wise, I.J. y Matthews, D.M. Tissue distribution of coenzyme and other forms of vitamin B₁₂ in control subjects and patients with pernicious anaemia. Clin.Sci. Mol Med., 46,163,1974
- 167.- Rosenberg, L.E. Disorders of propionate, methylmalonate and cobalamin metabolism. En "The metabolic basis of inherited disease". Editado por Stanbury, J.B. McGraw-Hill Book Company. Londres, pag. 411,1978.
- 168.- Mervyn, L. The metabolism of the cobalamins. En "Metabolism of vitamins and trace elements". Comprehensive Biochemistry, 21,153,1971. Editado por Elsevier Publishing Company.
- 169.- Linnell, J.C., Wilson, J. y Matthews, D.M. Estimation of cyanocobalamin and other plasma cobalamins in hereditary optic atrophies and other ophtalmological disorders. Clin.,37, 878,1969.
- 170.- Wilson, J., Linnell, J.C. y Matthews, D.M. Plasma cobalamins in neuro-ophtalmological diseases. Lancet, i, 259,1971
- 171.- Osuntokun, B.O., Matthews, D.M., Hussein, H.A.A., Wise, I.J. y Linnell, J.C. Plasma and hepatic cobalamins

in tropical ataxic neuropathy (TAN). Clin. Sci. Mol. Med., 46,563,1974.

- 172.- Richardson, R.E., Healy, M.J. y Nixon, P.F. Folates of rat tissue. Bioassay of tissue folypolyglutamates and relationship of liver folypolyglutamates to nutritional folate sufficiency. Biochim. Biophys. Acta., 585, 128,1979.
- 173.- O'Brien, J.S. The role of the folate coenzymes in the cellular division: a review. Cancer Res., 22,267,1962
- 174.- Wheeler, G.P., Alexander, J.A. y Morris, H.P. Synthesis of purines and nucleic acids and catabolism of purines by rat liver hepatomas. Advan. Enzyme Regulation 2, 347,1963
- 175.- Weber, G. The molecular correlation concept: Studies on the metabolic pattern of hepatomas. Gann. Monograph., 1, 151, 1966.
- 176.- Gordon, H.L., Bardos, T.J., Chmielewicz, Z.F. y Ambrus, J.L. Comparative study of the thymidine kinase and thymidylate kinase activities and of the feed-back inhibition of thymidine kinase in normal and neoplastic human tissue. Cancer Res., 28, 2068,1968.
- 177.- Fridland, A., Langenbach, R.J. y Heidelberger, C. Puri

fication of thymidylate synthetase from Enrich ascites carcinoma cells. J. Biol. Chem., 246, 7110, 1971

- 178.- Ohashi, M. y Taguchi, T. Two forms of thymidine kinase in normal and tumor tissues of animals. Cancer Res., 36,2216,1976.
- 179.- Roth, J.J. y Roth, J.S. Thymidylate synthetase activity in the Novikoff hepatoma. Cancer Res., 36,4500, 1976.
- 180.- Nichol, C.A. Studies on Dehydrofolate Reductase related to the drug sensitivity of microbial and neoplastic cells. Adv. Enzyme Regulation, 6, 305, 1968.
- 181.- Scott, J.M. The identification of the intracellular folate coenzymes of different cell types. Biochem. Soc. Trans., 4,29, 1976.
- 182.- Shin, Y.S., Williams, M.A. y Stokstad, E.R.L. Identification of folic acid compounds in the rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun., 47,35,1972.
- 183.- Shin, Y.S., Buehring, K.U. y Stokstad, E.L.R. Studies of folate compounds in nature. Folate compounds in rat kidney and red blood cells. Arch. Biochem. Biophys., 162,211,1974.
- 184.- Grezelakowska-Sztabert, B. Chmurznysks, W. y Landman, H.

Four folate-metabolizing enzymes of mouse embryo fibroblasts and L-cells as tested during the culture cycle
En: "Chemistry and Biology of Pteridines". Editado por Walker de Gruyter, Berlin y N. York. Pag. 143, 1976.

- 185.-Friedkin, M., Plante, L.T., Crawford, E.J. y Crumm, M. Inhibition of thymidylate synthetase and dehydrofolate reductase by naturally occurring oligoglutamate derivate of folic acid. J. Biol. Chem., 250,5614, 1975.
- 186.- England, J. M., y Linnell, J.C. Problems with the serum vitamin B₁₂ assay. Lancet, 2, 1072, 1980.
- 187.- Matthews, D.M., y Linnell, J.C. Vitamin B₁₂. An area of darkness. Br. Med. J., 2,533,1979.
- 188.- Zacharakis, R., Muir, M. y Chanarin, I. Comparison of serum vitamin B₁₂ estimation by saturation analysis with intrinsic factor and with R-protein as binding agents. J. Clin. Pathol., 34, 357, 1981.
- 189.- Degley, J. y Hall, C.A. Forms of vitamin B₁₂ in radioisotope dilution assays. J. Clin. Pathol., 34,630, 1981.
- 190.- Dawson, D.W., Delamore, I.W., Fish, D.I., Flaherty, T.A. Gowehlock, A.H. Hunt, L.P., Hyde, K., Maciver, J.E., Thornton, J.A. y Waters, H.M. An evaluation of commercial radioisotope methods for the determination of folate and vitamin B₁₂. J. Clin. Pathol., 33,234, 1980.
- 191.- Gilbert, R.B. y Mailhot E.A. Cobalamin radioassays. JAMA 246,734, 1981.

- 192.- Brody, T. Watson, J.E. y Stokstad, E.R.L. Folate penta-
glutamate and folate hexaglutamate mediated one carbon
metabolism. *Biochemistry*, 21, 276, 1982.
- 193.- Pheasant, A.E., Connor, M.J. y Blair, J.A. The metabo-
lism and physiological desposition of radioactively la-
belled folate derivatives in the rat. *Biochemical Medi-*
cine, 26, 435, 1981
- 194.- Jägerstad, M., Akesson, B. y Fehling, C. Effect of me-
thionine on the metabolic fate of liver folates in vi-
tamin B₁₂ -deficient rats. *Br. J. Nutr.*, 44,361, 1980
- 195.- Billings, R.E., Noker, P.E. y Tephly, T.R. The role of
methionine in regulating folate dependent reactions in iso-
lated rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 208,108, 1981
- 196.- Blackburn, R. Kyaw, M. Reaction of cob (I) alamin with
nitrous oxide and cob (III) alamin. *J. Chem. Soc. Fara-*
day Transactions, 33,250,1977.
- 197.- Lumb. M., Deacon, R., Perry, J., Chanarin, I., Minty,
B., Halsey, M.J. y Nunn, J.F. The effect of nitrous
oxide inactivation of vitamin B₁₂ on rat hepatic fola-
te. Implications for the methylfolate-trap hypothesis.
Biochem. J., 186,933, 1980.
- 198.- Deacon, R., Derry, L.M. Chanarin, I., Barbara, M., Hal-

- sey M. y Nunn, J. Inactivation of methionine synthase by nitrous oxide. *Eur. J. Biochem.*, 104, 419, 1980.
- 199.- Chanarin, L. Deacon, R., Lumb. M. y Perry, J. Vitamin B₁₂ regulates folate metabolism by the supply of formate. *Lancet*, 2, 505, 1980.
- 200.- Steinberg, S.E., Campbell, C. y Hillman, R.S. The effect of nitrous oxide-induced vitamin B₁₂ deficiency on "in vivo" folate metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 98, 983, 1981
- 201.- Kano, Y., Sakamoto, S., Sakuraya, K., Kubota, T, Hida, K., Suda K. y Takaku, F. Effect of nitrous oxide on human bone marrow cells and its synergistic effect with methionine and methotrexate on functional folate deficiency. *Cancer Res.*, 41, 4689, 1981
- 202.- Kondo, H., Osborne, M.L. y Kolhouse, J.F. Nitrous oxide has multiple deleterious effects on cobalamin metabolism and causes decreases in activities of both mammalian cobalamin-dependent enzymes in rats. *J. Clin. Invest.*, 12, 1270, 1981.
- 203.- McGing, P., Reed, B., Weir, D.G. y Scott, J.M. The effect of vitamin B₁₂ inhibition in vivo: impaired folate polyglutamate biosynthesis indicating that 5-methyltetrahydropteroylglutamate is not its usual sub-

trate. Biochem. Biophys. Res. Commun, 82,540,1978

- 204.- Deacon, R., Chanarin, I., Perry, J. y Lumb, M. Impaired deoxyuridine utilization in the B₁₂ inactivated rat and its correction by folate analogues. Biochem. Biophys. Res. Commun., 93,516,1980.
- 205.- McGing, P.G. y Scott, J.M. Evidence that the decreased liver folate status following vitamin B₁₂ inactivation in the mouse is due to increased loss rather than impaired uptake. Biochem. Biophys. Acta, 673, 594, 1981.
- 206.- Scott, J.M., Din, J., Wilson, P. y Weir, D.G. The pathogenesis of subacute combined degeneration, a result of methyl group deficiency. Lancet, 2,334, 1981.
- 207.- Scott, J.M. y Weir, D.G. The methyl folate trap. A physiological response in man to prevent methyl group deficiency in kwashiorkor (methionine deficiency) and an explanation for folic acid induced exacerbation of subacute combined degeneration in pernicious anaemia. Lancet, 2,337,1981
- 208.- Kano Y., Sakamoto, S., Hida, K., Tsuboyama, A. y Takaku, F. Vitamin B₁₂-dependent methyletrahydrofolate: homocysteine methyltransferase activity in normal and leukemic human hematopoietic cells. Clin.Chim.Acta, 109, 69,1981.

69, 1981.

209.- Kondo, H., Kolhouse, J.F. y Allen, R.H. Presence of cobalamin analogues in animal tissues. Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 817,1980.

210.- Weinhouse, S. New dimensions in the biology of cancer. Cancer, 45,2975,1980.

