

Departamento de Bioquímica del Instituto Español  
de Fisiología y Bioquímica. — Madrid.

## **Aplicaciones de la polarografía al diagnóstico**

### **II.—Mecanismo de producción de la onda polarográfica en sueros fisiológicos**

**N. Jacob Ernst, J. Lucas Gallego y A. Santos Ruíz**

(Recibido para publicar, el día 17 de octubre de 1950)

En una comunicación anterior publicada en esta Revista (11) dos de nosotros (A. S. R. y J. L. G.) confirmábamos que la técnica polarográfica de Brdicka por la cobaltihexamina era útil para el diagnóstico del cáncer, ya que la doble onda del polarograma es más alta en los sueros sanguíneos procedentes de enfermos portadores de tumores malignos que en los sueros de sujetos con tumores benignos y de personas sanas.

Muchas explicaciones se han dado de estos hechos experimentales. Brdicka (2) indica que los sueros patológicos tienen un contenido más bajo de grupos activos -S-S y -SH, los cuales pueden estar libres o en combinación con las proteínas y asegura que sólo tienen una actividad total cuando éstas se desnaturalizan por ruptura de la molécula, enzimática o químicamente.

Waldschmidt-Letiz (14) y Mayer y Waldschmidt-Leitz (7) afirman que los grupos -S-S son los responsables de las diferencias de acción frente al electrodo de gotas de mercurio de los sueros en cuestión, ya que de sus experimentos se deduce que en los hidrolizados de los sueros carcinomatosos, se encuentra menos cistina que en los de los normales. Bergh, Henríquez y Wolfbrandt (1) suponen que se trata de un efecto aditivo de varias sustancias. Sin embargo, estos asertos no parecen estar de acuerdo con los hechos experimentales (3 y 4).

No deja de tener importancia en la interpretación de las curvas polarográficas, los experimentos realizados por L. Polak y A. Nosek y J. Sbornick (9) los cuales demuestran que después de la administración parenteral de ácido ascórbico disminuyen las curvas polarográficas en los sueros de los individuos tratados. Tal parecer lo comparte igualmente Meyer-Heck (8) quien veri-

fica experiencias de precipitación fraccionada, con alcohol, del filtrado de la desalbuminación por ácido sulfosalicílico.

Sin embargo, los estudios de la intervención del glutatión, faltan casi por completo aunque, a nuestro parecer, éste tiene mucha importancia por ser un tripéptido que contiene el grupo -SH y se puede oxidar a la forma disulfídica como la cistina.

Una propiedad biológica del glutatión, que le hace desempeñar un importante papel fisiológico, es el poder activante de ciertas reacciones enzimáticas como otros compuestos sulfhidrilados; recordemos que activa la acción de la papainasa, catépsinasa, arginasa, amilasa, fermentos glucolíticos y quizá también, las fosfatasa (13). El GS-SG activa la catalasa. Específica del glutatión es también la acción activadora de la glioxalasa (6).

Hinsberg (5) fué el primero que hizo resaltar ciertas variaciones en el contenido del glutatión en el cáncer. Nosotros encontramos (10 y 12) que en la sangre total de cancerosos no tratados disminuye el GS-SG y el GT y se comprueba un aumento de GSH. En algunos casos el GS-SG es cero, lo que trae consigo que la cifra en glutatión esté representada exclusivamente por GSH. Parece que existe una relación inversa entre la disminución del GT y del GS-SH y la gravedad del caso y que hay una relación directa con el aumento de GSH, por lo que se debe de tener en cuenta dichas cifras al hacer el pronóstico. En la sangre total de cancerosos tratados, con evolución favorable, aumenta el GT y el GS-SG y se comprueba una disminución del GSH.

En este trabajo nos proponemos estudiar la influencia que en el mecanismo de producción de la curva polarográfica tienen los componentes químicos de los sueros fisiológicos artificiales con y sin adición de glutatión y cistina.

### Métodos

Empleamos en todos los casos la técnica polarográfica ya descrita en la primera comunicación citada y realizamos las experiencias que exponemos a continuación:

- a) Experiencias con solución fundamental sola.
- b) Experiencias con solución fundamental y suero fisiológico.
- c) Experiencias con intervención de glutatión y cistina.

### Resultados

- a) *Experiencias con solución fundamental sola.*

El cuadro número 1 corresponde a las experiencias realizadas con solución fondo a diversas sensibilidades y comprobación de la influencia de éstas. En él observamos que operando con igual dilución, igual goteo y sensibilidades distintas, las alturas de los

polarogramas, como se ve en las curvas A, B y C de la serie 1 son diferentes a consecuencia de haberse operado con sensibilidades distintas. Por la misma causa hay diferencia de altura entre las curvas A y B de la serie 2 y las curvas A y B de la serie 3.

De estos resultados deducimos: que la relación de sensibilidades dadas por el micropolarógrafo es buena y las condiciones operatorias también. Cuando se opera a distintas concentraciones de la solución fundamental y son constantes la velocidad de goteo y la sensibilidad del galvanómetro la altura del salto del cobalto es tanto mayor cuanto más alta sea la concentración como se observa en las curvas A, B, C, D, E y F de la serie 4.

CUADRO N.º 1

|         | Diagrama | Dilución | Goteo | Sensibilidad | Altura |
|---------|----------|----------|-------|--------------|--------|
| Serie 1 | A        | 25 ‰     | 26    | 1/30         | 12     |
|         | B        | 25 ‰     | 26    | 1/20         | 20     |
|         | C        | 25 ‰     | 26    | 1/50         | 7,5    |
|         | D        | 50 ‰     | 26    | 1/30         | 76     |
|         | E        | 50 ‰     | 26    | 1/50         | 43,5   |
|         | F        | 100 ‰    | 26    | 1/100        | 59     |
| Serie 2 | A        | 100 ‰    | 28    | 1/100        | 68     |
|         | B        | 100 ‰    | 28    | 2/300        | 42     |
|         | C        | 90,9 ‰   | 28    | 1/100        | 48     |
| Serie 3 | A        | 100 ‰    | 21    | 1/100        | 60     |
|         | B        | 100 ‰    | 21    | 2/300        | 38     |
|         | C        | 90,9 ‰   | 21    | 1/100        | 48     |
|         | D        | 90,9 ‰   | 21    | 2/300        | 32     |
| Serie 4 | A        | 100 ‰    | 24    | 1/70         | 70     |
|         | B        | 90 ‰     | 24    | 1/70         | 65,5   |
|         | C        | 83,3 ‰   | 24    | 1/70         | 48     |
|         | D        | 76,9 ‰   | 24    | 1/70         | 44     |
|         | E        | 70,1 ‰   | 24    | 1/70         | 41     |
|         | F        | 69 ‰     | 24    | 1/70         | 40     |

b) *Experiencias con solución fundamental y suero fisiológico.*

En el cuadro número 2 observamos que a menores diluciones con solución Tyrode, el máximo del cobalto se rebaja y que para concentraciones desde 30 % de dicho líquido, la altura tiene escaso amortiguamiento.

Del análisis de los polarogramas correspondientes a estos experimentos, series 5 y 6, se deduce que el máximo de la cobaltihexamina sigue teniendo la forma característica puntiaguda como si estuviera solo.

Se puede apreciar además, comparando entre sí los resultados consignados en la serie 6 que el aumento de la concentración de la solución de Tyrode tiene también como efecto un mayor amor-

tiguamiento del máximo, aunque su forma no varía como se observa en las curvas correspondientes.

Por lo tanto, se puede decir que el único efecto que tienen las sales minerales, y la glucosa de la solución Tyrode, es que amortiguan ligeramente el salto de la cobaltihexamina conservando su aspecto puntiagudo.

CUADRO N.º 2

|         | Diagrama | Concentración de cobaltihexamina | Concentración de Tyrode | Goteo | Sensibilidad | Altura |
|---------|----------|----------------------------------|-------------------------|-------|--------------|--------|
| Serie 5 | A        | 90,9                             | 9,1                     | 27    | 1/70         | 45     |
|         | B        | 90,9                             | 9,1                     | 27    | 1/30         | 71     |
|         | C        | 83,8                             | 16,7                    | 27    | 1/50         | 57     |
|         | D        | 76,9                             | 23,1                    | 27    | 1/50         | 50     |
|         | E        | 70,1                             | 29,9                    | 27    | 1/50         | 41     |
| Serie 6 | A        | 90,9                             | 29,1                    | 27    | 1/50         | 70     |
|         | B        | 83,3                             | 16,7                    | 27    | 1/50         | 125    |
|         | C        | 76,9                             | 23,1                    | 27    | 1/50         | 75'5   |
|         | D        | 70,1                             | 29,9                    | 27    | 1/50         | 66     |
|         | E        | 66,7                             | 33,3                    | 27    | 1/50         | 59     |
|         | F        | 62,5                             | 37,5                    | 27    | 1/50         | 49     |

c) *Experiencias con intervención del glutatión y cistina.*

Las experiencias con glutatión se han realizado por dilución de una cantidad de éste en proporción variable con la de su concentración normal en sangre total que hemos fijado en 0,24 mgr. por 100 c.c. aproximadamente, ya que las consideradas cifras normales por diversos autores son bastantes dispares. La cistina se ha empleado disolviendo un mgr. en 1.000 c.c. de agua desti-

CUADRO N.º 3

|          | Diagrama | Concentración glutat. | Cistina   | Agua      | Tyrode    | Goteo | Sensibilidad | Altura |
|----------|----------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-------|--------------|--------|
| Serie 7  | A        | 0                     | 0         | 0,4 c. c. |           | 28    | 1/50         | 43,5   |
|          | B        |                       | 0,6 c. c. | 0,4 »     |           | 28    | 1/50         | 19     |
|          | C        |                       | 0,6 »     | 0,4 »     |           | 28    | 1/70         | 14     |
| Serie 8  | A        | 6×S                   |           | 0,4 »     |           | 28    | 1/50         | 13,5   |
|          | B        | 6×S                   |           | 0,4 »     |           | 28    | 1/40         | 18,0   |
|          | C        | 6×S                   |           | 0,4 »     |           | 28    | 1/40         | 18     |
|          | D        | 6×S                   |           | 0,4 »     |           | 28    | 1/30         | 20     |
| Serie 9  | A        | 0                     |           |           | 0,6 c. c. | ?     | 1/30         | 20     |
|          | B        |                       | 0,6 c. c. |           | 0,6 »     | ?     | 1/70         | 11,5   |
| Serie 10 | A        | 6×S                   |           |           | 0,6 »     | 20    | 1/40         | 25     |
|          | B        | 12×S                  |           |           | 0,6 »     | 20    | 1/40         | 23     |
|          | C        | 18×S                  |           |           | 0,6 »     | 20    | 1/40         | 18     |
|          | D        | 18×S                  |           |           | 0,6 »     | 20    | 1/40         | 18     |

lada y de esta solución se emplea 0.6 c.c. Una u otra solución se han mezclado con la fundamental para la polarografía. En el cuadro número 3 están representados los resultados conseguidos así como las condiciones en que se han realizado.

En las experiencias con glutatión y agua (polarogramas A-B-C-D de la serie 8), se observa:

1.º. Que el glutatión no modifica el espacio entre el máximo típico de las soluciones de cobalto tamponados y el salto de los alcalinos, como fué demostrado por Brdicka para las sales cobálticas.

2.º. Que el máximo del cobalto se amortigua y redondea. Por lo tanto, estas modificaciones del máximo se deben a la presencia del glutatión.

De los experimentos de glutatión con Tyrode A, B, C y D de la serie 10 se desprende:

1.º. Que el amortiguamiento del máximo es menos intenso para iguales concentraciones de glutatión que en los experimentos anteriores y en los polarogramas correspondientes se aprecia que la forma del máximo no es igual, sino que permite un máximo puntiagudo. Esto pudiera explicarse por una inhibición del efecto del glutatión en la interfase catódica ya que aquellos grupos no inhibidores del máximo, como anteriormente vimos, también interfieren en el cátodo a la vez que el tripéptido.

En los experimentos con cistina y agua, diagramas B y C de la serie 7 y en la prueba con cistina y Tyrode, diagrama B de la serie 9, se observa también que el máximo del cobalto se amortigua y redondea.

En otras experiencias se procedió a emplear la técnica utilizada por Brdicka para el estudio de los sueros sanguíneos desproteinizados, o sea tratando la dilución de glutatión en agua o solución Tyrode con KOH y ácido sulfosalicílico, y tienen por objeto estudiar en medio artificial semejante al sanguíneo las modificaciones polarográficas que se observaron.

CUADRO N.º 4

|          | Diagrama | Concentración glutatión | Agua | Goteo | Sensibilidad | Altura |
|----------|----------|-------------------------|------|-------|--------------|--------|
| Serie 11 | A        | S                       | 0,4  | 28    | 1/40         | 31,5   |
|          | B        | 3 × S                   | 0,4  | 28    | 1/40         | 14,5   |
|          | C        | 2 × S                   | 0,4  | 28    | 1/40         | 15     |
|          | D        | 4 × S                   | 0,4  | 28    | 1/40         | 12     |

En el cuadro número 4, se representan los resultados obtenidos y en él apreciamos:

1.º Que en todas las experiencias realizadas no existe modificación en el espacio del prenatrium.

2.º Que ni la potasa, ni el ácido sulfosalicílico tienen efecto, pues dejan la curva sin alteraciones sensibles en relación con las conseguidas en los anteriores experimentos.

En los experimentos en que se oxidó el glutatión la técnica para oxigenación consistía en preparar una solución de 10 c.c. de glutatión con 0,1 de  $H_2O_2$  a 10 volúmenes. El barboteo de oxígeno se hizo sencillamente partiendo de una botella a presión previo paso por cal sodada.

De esta forma se obtuvieron los resultados que se exponen en el cuadro número 5:

CUADRO N.º 5

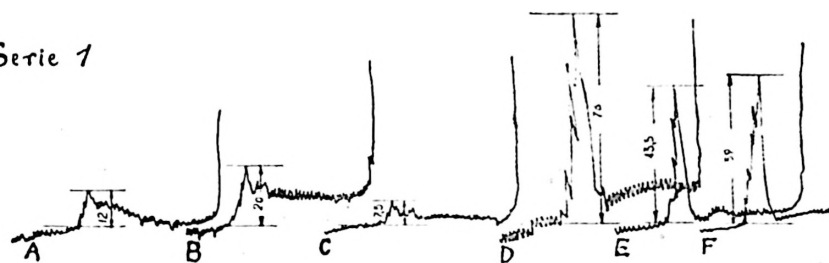
| Oxidante                             |          | Pol. n.º | Concen-tración glut. | $H_2O_2$ | $H_2O$ | Sensibi-lidad | Altura |
|--------------------------------------|----------|----------|----------------------|----------|--------|---------------|--------|
| $H_2O_2$<br><br>Corriente de oxígeno | Serie 12 | A        |                      | 1 gota   | 0,4    | 1/50          | 84     |
|                                      |          | B        | 12 X S               |          | 0,4    | 1/40          | 16     |
|                                      |          | C        | 12 X S               |          | 0,4    | 1/50          | 15     |
|                                      |          | D        | 12 X S               |          | 0,4    | 1/30          | 17,5   |
|                                      | Serie 13 | A        | 28 X S               |          | 0,4    | 1/40          | 20     |
|                                      |          | B        | 28 X S               |          | 0,4    | 1/40          | 22     |
|                                      | Serie 14 | A        | 28 X S               |          | 0,4    | 1/40          | 16     |
|                                      |          | B        | 28 X S               |          | 0,4    | 1/40          | 13     |

En el ensayo en blanco, diagrama A de la serie 12, aparece que el agua oxigenada no modifica la forma de la curva típica de la solución fundamental, en tanto que en las pruebas B, C y D utilizando glutatión, doce veces la cifra normal, oxidado con  $H_2O_2$  resulta el típico amortiguamiento del máximo en la forma ya expuesta, y permanece inalterada la forma del prenatrium.

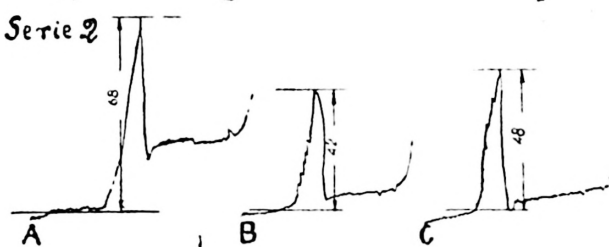
Los polarogramas de la serie 13 (C y D) se consiguieron durante el barboteo del oxígeno, para lo cual utilizamos una vasija electrolítica de tipo especial, a fin de ver si en el transcurso de éste, se podía apreciar algún fenómeno, pero como se ve, los diagramas no son bien mensurables a consecuencia de la agitación del líquido. No obstante, puede apreciarse un comportamiento similar al del  $H_2O_2$ .

Como consecuencia de no poder realizar medidas por el barboteo de oxígeno durante la experiencia, se procedió a hacerlo previamente o sea dejando reposar el líquido. Por este procedimiento, se obtuvieron los polarogramas A y B de las series 13 y 14, el primero a los diez minutos del barboteo y el segundo a las veinticuatro horas. Se aprecia que el oxígeno absorbido origina en el primero unas oscilaciones del galvanómetro más amplias, que vuelven a ser normales a las veinticuatro horas.

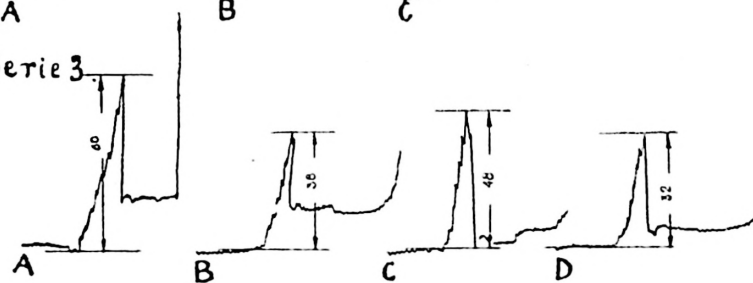
Serie 1



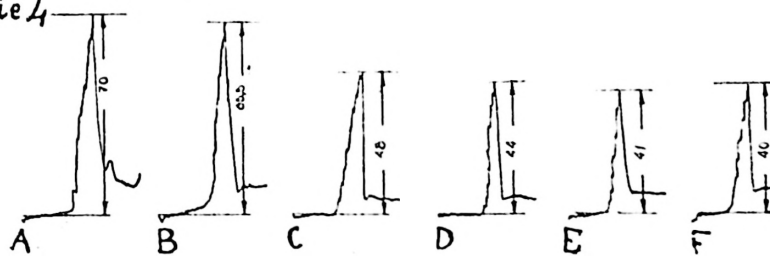
Serie 2

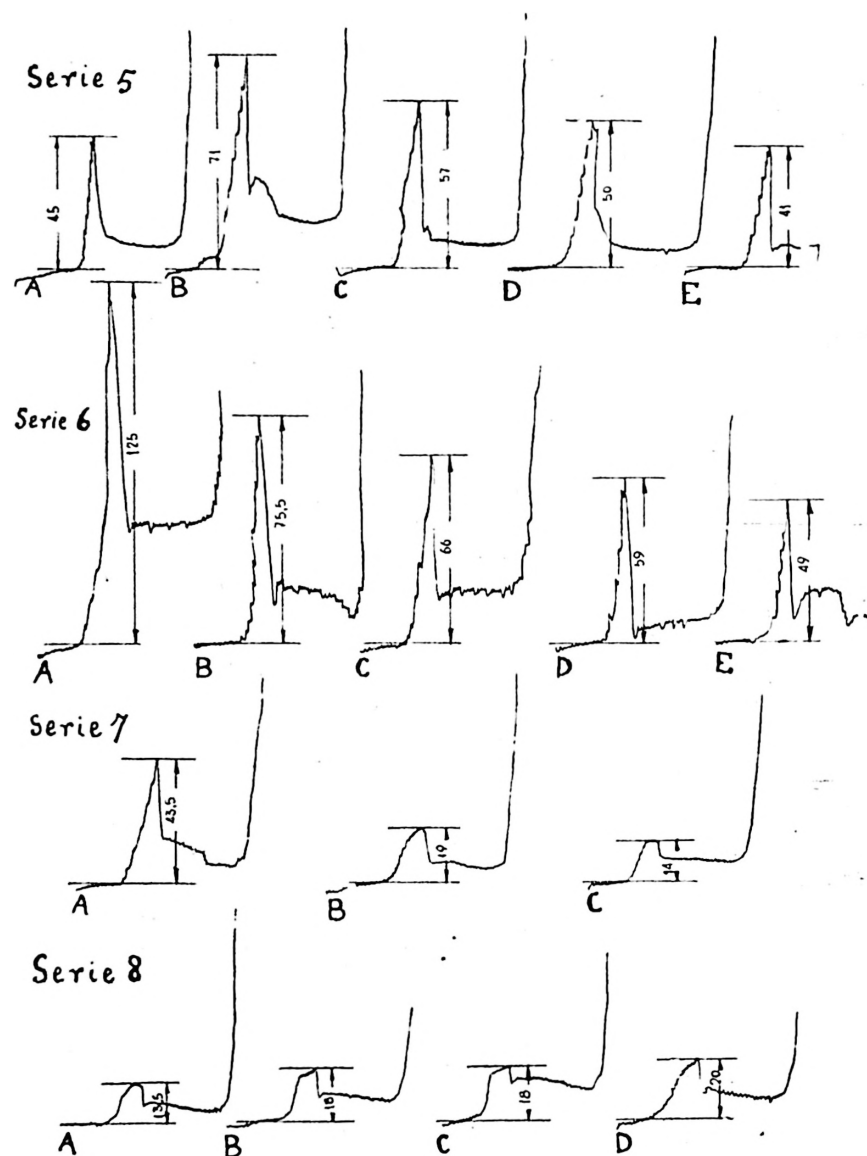


Serie 3

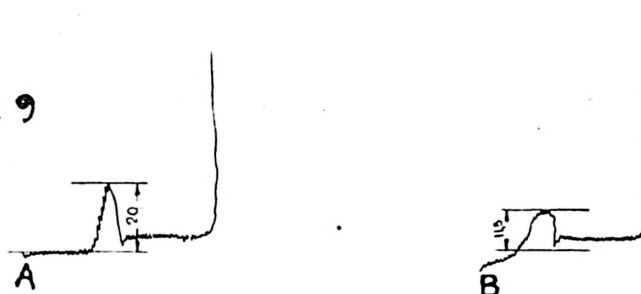


Serie 4

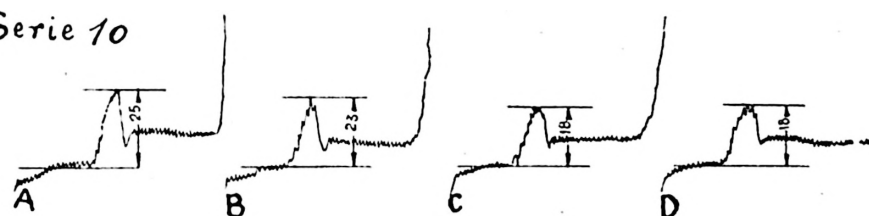




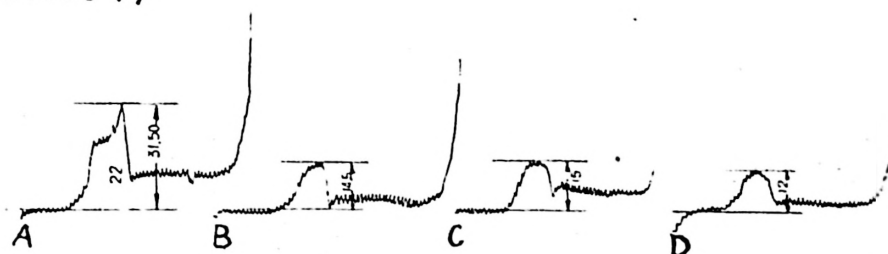
Serie 9

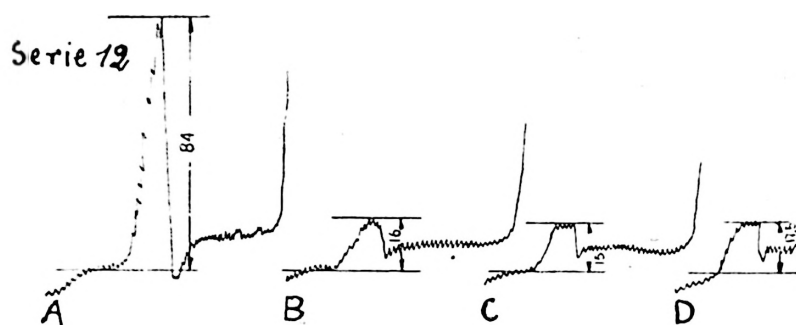


Serie 10

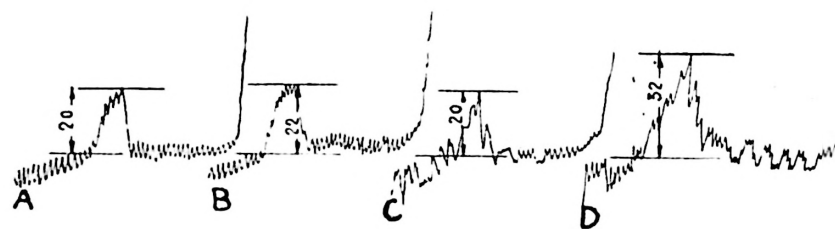


Serie 11

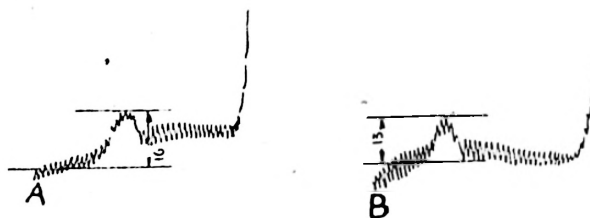




Serie 13



Serie 14



### Discusión

Como consecuencia de lo expuesto en la parte experimental, hemos de tener en cuenta las siguientes observaciones que resaltan más de los resultados obtenidos.

Confirmamos en el transcurso de nuestras experiencias que hay una marcada influencia en la altura de la curva por la sensibilidad, velocidad de goteo, temperatura ambiente y otros factores físicos y atmosféricos por lo que no pueden ser comparados estrictamente diagramas en los que se modifican alguno de éstos. En cuanto al máximo del cobalto correspondiente a la solución fundamental, sola, su altura es función lineal de la concentración en los casos estudiados.

Es de notar que cuando se sustituye el agua de las diversas diluciones de la solución fundamental por el líquido de Tyrode, la altura del máximo disminuye, sin modificar la posición ni la forma, de donde se deduce que los componentes minerales de los sueros artificiales, de composición semejante a los sueros sanguíneos, no tienen acción sobre la curva polarográfica, pero rebajan el máximo del cobalto y lo mismo sucede con la glucosa.

En cuanto a la intervención del glutathion en su forma oxidada o reducida y de la cistina, nuestros experimentos nos confirman que el máximo del cobalto se influye por tales compuestos azufrados, toda vez que se redondea y amortigua, lo que debe considerarse puesto que como veremos en una nota posterior también sucede de modo idéntico con los sueros sanguíneos naturales. Se sabe, pues, que el glutathion y la cistina intervienen en la reducción característica del máximo que aparece en los sueros naturales. En igual forma deben intervenir también otros oligopéptidos. Los resultados obtenidos nos demuestran que este amortiguamiento no está en función lineal con la concentración y que deja de aumentar a partir de cierta concentración del glutathion.

### Conclusiones

1. El amortiguamiento del máximo es menos intenso para iguales concentraciones de glutathion en los experimentos con Tyrode que en los experimentos con solución de cobaltihexamina sola.
2. Las sales minerales, que componen normalmente los sueros fisiológicos, así como la glucosa, no influyen en la doble onda polarográfica y sólo rebajan escasamente el máximo del cobalto.
3. Ni el glutathion ni la cistina, modifican la forma del pre-natrium en la solución fundamental sola; ahora bien, amortiguan y redondean el máximo del cobalto.

### Resumen

El amortiguamiento del máximo es menos intenso para iguales concentraciones de glutatión en los experimentos Tyrode que en los experimentos con solución de cobaltihexamina sola.

Las sales minerales que componen normalmente el suero sanguíneo, así como la glucosa, no influyen en la doble onda polarográfica y sólo rebajan escasamente el máximo del cobalto.

Ni el glutatión ni la cistina modifican la forma del prenatrium en la solución fundamental sola; ahora bien, amortiguan y redondean el máximo del cobalto.

### Summary

The production of the polarographic wave in physiological solutions and the influence thereon of divers concentrations of glutathione and cystine have been studied. The mineral salts of physiological solutions as well as glucose were found to have no influence on the double polarographic wave and only slightly reduced the maximum of cobalt. Neither glutathione nor cystine modified the form of prenatrium in the simple fundamental solution, but the cobalt maximum was reduced and rounded up by them. For alike glutathione concentrations the reduction of the maximum was less intense in the experiments with Tyrode than in those with cobalt-hexamine alone.

### Bibliografía

- (1) BERGH, F., HENRÍQUEZ, O. M. y WOLFBRANDT, C. G.: *Nature*, **141**, 751, 1938.
- (2) BRDICKA, R.: *Acta Unionis Internationalis contra cancerum*, Lovaina, **3**, 13, 1938.
- (3) BRDICKA (R.): *Nature* **142**, 617, 1938.
- (4) BRDICKA (R.): *Klin. Woch.* **18**, 305, 1939.
- (5) HINSBERG (A.): *Das Geschwulst problem*, S 59, 1942.
- (6) LOHMANN (I.): *Biochem. Z* **245**, 322, 1932.
- (7) MAYER (K.) y WALDSCHMITH-LEITZ: *Hoppe Seyler's Z.* **261**, 1, 1939.
- (8) MEYER-HECK (P.): *Z. Krebsforsch.* **49**, 142, 1939.
- (9) POLAK (L.), NOSEK (A.) y SBORNICK (J.): *Z. Krebsforsch.* **52**, 144, 1941.
- (10) SANTOS RUIZ (A.) y LUCAS GÁLLEGO (J.): *Medicina*, sept. 1943.
- (11) SANTOS RUIZ (A.) y LUCAS GÁLLEGO (J.): *R. esp. Fisiol.* **1**, 203 (1945).
- (12) SANTOS RUIZ (A.), LUCAS GÁLLEGO (J.) y BRIEVA ANDRADE (A.): *Medicina*, marzo 1945.
- (13) WALDSCHMITH-LEITZ (E.): *Naturwiss.* **19**, 964, 1931.
- (14) WALDSCHMITH-LEITZ (E.): *Angew. Che.* **51**, 632, 1938.