

Departamento de Bioquímica
Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
y
Sección de Espectroquímica
Instituto Gregorio Rocasolano
Madrid

Determinación espectrográfica de cinc en material biológico

por

F. Fernández-Sánchez, J. M. López-Azcona y A. Santos-Ruiz

(Recibido para publicar el 10 de enero de 1958)

Introducción

En 1940 KEILIN y MANN dijeron que habían demostrado por vez primera la función fisiológica del cinc en el organismo (10). Mostraron que es la parte activa en la molécula de la anhídrida carbónica. Posteriores investigadores han mostrado que su trabajo fué en realidad únicamente la primera guía a las diversas actividades de este elemento tan ampliamente distribuido. La ingestión media humana de cinc es de 10-15 mg por día (12). Una cantidad similar se elimina por las heces. La eliminación por la orina es prácticamente insignificante de manera relativa a la salud. Algunos enfermos con albuminuria han mostrado que pierden mayor cantidad por la orina y que tienen un balance negativo del cinc (12). Las ratas machos jóvenes alimentadas con una dieta sin cinc presentaron un crecimiento retardado, pérdida de piel (22) y fracaso del desarrollo genital (7), pero no se ha reconocido ningún síndrome de deficiencia en el hombre. Estos cambios pueden ser todos secundarios a la hipoplasia pituitaria. Los cerdos tienen una necesidad relativamente alta de cinc y si no se les administra sales de dicho elemento presentan dermatitis (23).

La mayor parte de los seres humanos contienen de 40 a

200 mg de este metal por gramo de peso seco (6). Se ha visto que la próstata normal contiene unos 700 μg y los espermatozoos 2.000 μg por gramo aproximadamente (11).

Se ha visto que el cinc existe no sólo en la anhidrasa carbónica, sino también en la uricasa (9) y en la fosfatasa alcalina (3). En años recientes VALLEE y sus colaboradores en Harvard han mostrado que es un componente de cierto número de deshidrogenasas. Por medio de datos estadísticos relacionan sus resultados con algunas importantes enfermedades clínicas. Señalan (24) que el nivel de cinc en el suero se reduce en los enfermos con cirrosis hepática del tipo Laennec y que esta reducción está cuantitativamente relacionada con la gravedad de la enfermedad. En dos enfermos que mejoraron clínicamente bajo tratamiento, los niveles de suero del cinc volvieron a la esfera normal. Ocho enfermos con hepatitis infecciosa tuvieron niveles normales de cinc en el suero. La deshidrogenasa alcohólica hepática y la deshidrogenasa glutámica, que cataliza la liberación de amoníaco a partir del ácido glutámico, son ambas enzimas de cinc. La mayor parte de estos enfermos eran alcohólicos y la acumulación de amoníaco se consideró que está relacionada con el coma hepático (20). Consecuentemente, sus resultados produjeron algunas especulaciones interesantes. En otros trabajos (26) los escritores de Harvard demuestran que los niveles de cinc en el suero descienden y que la actividad de la deshidrogenasa láctica y málica aumenta después de la infarcción del miocardio. Algunos enfermos con signo de enfermedad en la arteria coronaria, pero sin ninguno de infarto, presentaron una actividad normal de la deshidrogenasa láctica en el suero. La deshidrogenasa láctica de manera cierta, y la deshidrogenasa málica de manera probable, contienen cinc y ambas están relacionadas con las deshidrogenasas hepáticas. Se necesita más trabajo para ver si estos cambios se presentan en condiciones clínicas similares.

El cinc presenta un particular interés desde que fué encontrado en los neoplasmas (4). En los tumores de estructura predominantemente celular, se encontró un contenido en cinc bastante apreciable mientras que en los tejidos normales es muy pequeño el contenido en este elemento, ya que sólo se detectaron vestigios. El análisis de tumores humanos y animales confirmó el aumento de cinc (13, 16), y se pensó que este aumento sería similar al del tejido embrionario. Así ROFFO en 1925 puso en evidencia el alto contenido en cinc de los tumores paralelo al de lecitina y pensó que dicho aumento estaba posiblemente en relación con la energía proliferativa del tejido neoplásico.

CRISTOL (4) observó que en los tejidos normales es muy pequeño el contenido de cinc. En tejidos fibromatosos refiere que

la cantidad de cinc aumentaba. Más tarde, al analizar un útero en estado canceroso avanzado se vió que la cifra obtenida era muy superior a la hallada para los úteros fibromatosos. También se cita que en la sangre leucémica el contenido en cinc es mucho mayor que en la sangre normal.

También VALLEE y ALTSCHULE encuentran que las células neoplásicas tienen una distribución de cinc diferente de las normales (25).

HEATH y sus colaboradores han estudiado la distribución de cinc en los tejidos neoplásicos (8). Dicho autor efectuó sus estudios mediante análisis polarográficos y dedujo que este elemento se halla en mayor proporción en los tejidos cancerosos.

ADDINK encuentra que en las personas afectadas de cáncer aumenta el contenido en cinc en la sangre y en el hígado (1). Estas determinaciones se efectuaron mediante análisis espectrográfico. Dicho autor observó que el cinc aumenta algo en estados patológicos no cancerosos, pero es una elevación pequeña en comparación con la que se produce en el organismo afectado de neoplasia.

Otros autores encontraron un aumento moderado de este elemento en el suero y en la orina de pacientes cancerosos, pero no se consideró específico, ya que es similar al que se produce en los procesos inflamatorios (14, 21).

En hepatomas experimentales en ratas provocados con p-dimetil-amino-azobenceno (15), se ha observado que el cinc disminuye durante el período inicial y luego aumenta y llega al máximo cuando el crecimiento de la neoplasia es evidente.

En un trabajo posterior (2) se determinó el cinc en el hígado de pacientes con diversos tipos de cáncer y en todos se notó un marcado aumento sobre todo en un caso de leucemia linfóide.

Según SCHOTTEN, el cinc juega un papel importante en el desarrollo de los tumores sobre todo al estado de lactato (19).

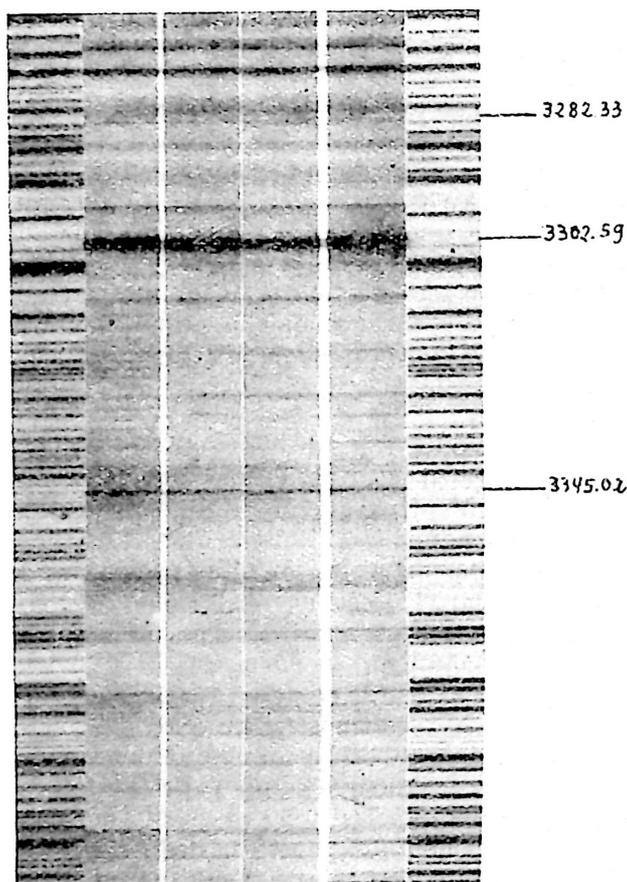
De todo lo anteriormente expuesto se deduce la gran importancia que en la actualidad se asigna al cinc. Teniendo en cuenta que, por diversas razones, este elemento nunca se determinó espectrográficamente en nuestra patria en materiales biológicos nos pareció atrayente la idea de intentar analizarlo en tejidos animales y particularmente en tejidos neoplásicos de origen humano.

Material y métodos

Como material biológico hemos utilizado muestras de carcinomas de cuello de útero, de miomas y de tejido normal de útero. La gran mayoría de las muestras nos fueron suministradas en el Hospital de San Carlos de la Facultad de Medicina

de Madrid en las clínicas ginecológicas de los Profesores GARCÍA ORCOYEN y BOTELLA LLUSIÁ. Todo el material era procedente de enfermas no radiadas con anterioridad.

Respecto al procedimiento seguido para la incineración de



las muestras se empleó una marcha análoga a la de los trabajos efectuados anteriormente (5, 17, 18).

En lo que se refiere a la técnica analítica utilizamos el mismo modelo de espectrógrafo que en los trabajos a que hacemos referencia o sea el de Hilger tipo Litrow. También empleamos excitación por arco. Ahora bien, nosotros variamos una de las condiciones de trabajo pues en vez de emplear corriente continua a 220 voltios, la usamos a 110 voltios con una intensidad de 7 amperios. Para el resto de la técnica pueden verse las publicaciones aludidas.

Núm.	Humedad %,	Cenizas m. seca %	Zn.	Núm.	Humedad %,	Cenizas m. seca %	Zn.
1	79,83	4,34	>10 ⁻³	51	71,62	5,03	10 ⁻²
2	80,02	4,43	>10 ⁻³	52	76,43	4,81	10 ⁻²
3	72,52	4,01	>10 ⁻³	53	78,50	4,22	10 ⁻²
4	78,56	4,32	>10 ⁻²	54	76,26	4,72	10 ⁻³
5	81,07	4,31	>10 ⁻³	55	77,10	4,35	10 ⁻³
6	79,67	4,44	>10 ⁻³	56	75,27	3,81	10 ⁻³
7	82,86	4,52	>10 ⁻³	57	76,01	4,32	10 ⁻³
8	75,73	3,91	>10 ⁻³	58	68,24	3,38	10 ⁻³
9	81,31	4,72	>10 ⁻³	59	73,46	4,19	10 ⁻³
10	78,41	4,37	>10 ⁻³	60	78,26	3,95	10 ⁻³
11	77,77	4,61	>10 ⁻³	61	75,23	3,71	10 ⁻³
12	81,02	4,63	>10 ⁻²	62	77,11	3,85	10 ⁻³
13	79,62	4,31	>10 ⁻²	63	80,27	4,03	10 ⁻³
14	73,52	3,97	>10 ⁻²	64	78,29	4,01	>10 ⁻³
15	76,62	4,09	>10 ⁻³	65	77,44	3,97	10 ⁻³
16	80,08	4,32	>10 ⁻³	66	78,52	4,04	>10 ⁻³
17	79,01	4,23	>10 ⁻²	67	74,76	3,82	>10 ⁻³
18	81,42	4,46	>10 ⁻³	68	76,29	3,75	>10 ⁻³
19	76,34	4,33	>10 ⁻³	69	78,44	4,02	10 ⁻³
20	79,62	4,03	>10 ⁻³	70	79,03	3,97	10 ⁻³
21	75,42	3,97	>10 ⁻³	71	72,56	3,79	10 ⁻³
22	76,52	4,05	>10 ⁻³	72	75,42	3,99	10 ⁻³
23	78,51	4,03	>10 ⁻³	73	79,03	4,21	10 ⁻³
24	80,02	4,56	>10 ⁻³	74	71,02	3,60	>10 ⁻³
25	75,04	3,79	>10 ⁻³	75	74,00	3,72	10 ⁻³
26	79,42	4,24	>10 ⁻³	76	76,45	4,01	10 ⁻³
27	78,56	4,03	>10 ⁻²	77	80,32	4,25	10 ⁻³
28	77,27	4,32	>10 ⁻³	78	77,76	3,98	10 ⁻³
29	80,12	4,46	>10 ⁻³	79	72,22	3,67	10 ⁻³
30	77,22	4,07	>10 ⁻²	80	74,04	3,89	<10 ⁻³
31	78,32	4,09	>10 ⁻³	81	78,75	4,03	10 ⁻³
32	80,18	4,28	>10 ⁻³	82	77,92	4,01	10 ⁻³
33	76,97	3,99	>10 ⁻²	83	74,42	3,89	10 ⁻³
34	74,22	3,87	>10 ⁻³	84	78,62	4,22	10 ⁻³
35	79,94	4,01	>10 ⁻³	85	79,55	4,28	10 ⁻³
36	75,59	3,88	>10 ⁻³	86	77,07	3,99	10 ⁻³
37	82,43	4,36	>10 ⁻²	87	73,42	3,70	10 ⁻³
38	76,53	4,51	>10 ⁻²	88	76,61	3,91	<10 ⁻³
39	76,71	4,04	>10 ⁻²	89	81,03	4,35	<10 ⁻³
40	81,09	3,86	>10 ⁻²	90	74,98	4,03	<10 ⁻³
41	78,04	4,13	>10 ⁻²	91	83,19	4,52	10 ⁻³
42	76,01	3,98	>10 ⁻²	92	78,50	4,22	—
43	77,53	4,01	>10 ⁻²	93	81,26	4,63	—
44	74,42	4,13	>10 ⁻³	94	76,25	4,02	<10 ⁻³
45	78,04	4,27	>10 ⁻³	95	78,18	4,32	<10 ⁻³
46	79,03	3,99	>10 ⁻³	96	79,07	4,13	<10 ⁻³
47	76,99	4,12	>10 ⁻³	97	78,74	4,37	<10 ⁻³
48	74,42	4,52	>10 ⁻³	98	80,02	4,45	10 ⁻³
49	72,07	4,22	>10 ⁻³	99	78,32	3,97	<10 ⁻³
50	77,36	4,09	>10 ⁻²	100	80,24	4,13	<10 ⁻³

En la página anterior damos una fotografía correspondiente a una de las placas impresionadas en la que aparece con toda claridad dicho elemento.

Se observa que la línea que corresponde a 3345.02 amstrong se percibe perfectamente; en tono menor por ser menos sensible se señala la de 3282.33 amstrong. La que existe en 3302.59 amstrong no puede determinarse porque se encuentra tapada por las pertenecientes al sodio en 3302.32 y 3302.99 amstrong, respectivamente. Por consiguiente la que nosotros hemos utilizado como línea analítica ha sido la de 3345.02 amstrong.

Resultados

A continuación damos los resultados hallados. De la muestra número 1 a la 52 inclusive corresponden a carcinomas; la número 53 a un fibrosarcoma; del número 54 al 86 a miomas y del 87 al 100 a tejidos normales.

Discusión

Se ha conseguido determinar el cinc en el 98 por 100 de las muestras analizadas. La media general del contenido en Zn la podemos considerar de $>10^{-3}$. Si tomamos como media la cifra de cenizas 4,2 por 100 y para la humedad el 75 por 100 esto viene a significar que el elemento que nos ocupa se halla en general en una proporción superior a 42 mg por kg de substancia seca, lo que representa 10,5 mg por kg de substancia fresca.

Hemos comprobado que este interesante metal es constante en carcinomas y miomas y que aparece en mayor cantidad en los tejidos neoplásicos que en los miomatosos y normales alcanzando en los tejidos tumorales cifras bastante superiores a 420 mg por kg de substancia seca ($>10^{-2}$ en las cenizas).

Estos resultados y los obtenidos por otros autores como CRISTOL (4), HEATH (8), ADDINK (1) y VALLEE y ALTSCHULIE (25) permiten afirmar de una manera general que el cinc aumenta en los tejidos cancerosos.

En lo que se refiere a los tejidos miomatosos hemos observado que a su vez contienen más cinc que los tejidos normales que es en donde aparece en menor cantidad.

Resumen

Se ha determinado espectrográficamente el contenido en cinc en cien muestras de carcinomas, miomas y tejidos normales de útero. Se ha em-

pleado excitación por arco con corriente continua a 110 voltios. La línea analítica ha sido la de 3345.02 amstrong. Se ha comprobado que el cinc es constante en carcinomas y miomas, pero no en los tejidos normales. También se ha observado que este elemento aparece en mayor cantidad en los carcinomas que en los miomas y en éstos, a su vez, el contenido es superior al de los tejidos normales.

Summary

Spectrographic determination of zinc on biologic material

The contents of zinc on different specimens of carcinomas, myomas and normal uterus tissue has been determined by spectrographic procedure.

In the preparation of the specimens and incineration of the ashes we have followed the pattern set on previous works by SANTOS RUIZ and collaborators.

A Hilger spectograph Litrow type has been used. The excitation was by arc with direct current of 110 volts with an intensity of 7 amperes. As analytical line the one that corresponds to 3345.02 amstrong has been used because the 3282.33 amstrong is less sensible and the 3302.59 amstrong could not be observed because it was interfered by the ones belonging to sodium in 3302.32 and 3302.99 amstrong respectively.

We were able to determine zinc in 98 per 100 of the analyzed specimens. The general average can be considered as $>10^{-3}$. If we take as average value for ashes 4.2 per 100 and for humidity 75 per 100, this comes to signify that the element we are studying is found generally in a proportion superior to 42 mg per kilogramme of dry substance, which represent 10.5 mg per kilogramme of fresh substance.

We have verified that this interesting oligoelement is constant in carcinomas and myomas and that it appears in greater quantity in neoplastic tissue than in the myomatous and normal tissues, reaching in tumorous tissue values very superior to 420 mg. per Kg. of dry substance ($>10^{-2}$ in ashes).

These results and the ones presented by other authors as CRISTOL, HEATH, ADDINK and VALLEE and ALTSCHULE, let us state in a general manner that zinc increases in cancerous tissues. As far as myomatous tissues are concerned, we have observed that they in turn contain more of this chemical element than normal tissues, where it appears in the smallest quantity.

Bibliografía

- (1) ADDINK, N. W. H. : *Nature*, **166**, 693, 1950.
- (2) BENGE, C. : *Wien. Klin. Wchenschr.*, **48**, 1075, 1935.
- (3) CLOETENS, R. : *Biochem. Z.*, **310**, 42, 1941.
- (4) CRISTOL, P. : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **5**, 23, 1923.
- (5) DEAN GUELBEZU, M. : *Inf. Quim. Anal.*, **5**, 172, 1951.
- (6) EGGLETON, W. G. : *Biochem. J.*, **34**, 991, 1940.
- (7) ELCOATE, P. V., FISCHER, M. I., MAWSON, C. A. y MILLAR, M. J. : *J. Physiol.*, **129**, 53, 1955.
- (8) HEATH, J. C. : *Nature*, **164**, 1055, 1949.
- (9) HOLMBERG, C. C. : *Biochem. J.*, **33**, 1901, 1939.
- (10) KEILIN, D. y MANN, T. : *Biochem. J.*, **34**, 1163, 1940.
- (11) MAWSON, C. A. y FISCHER, M. I. : *Biochem. J.*, **55**, 596, 1953.
- (12) MCCANCE, R. A. y WIDDOWSON, E. M. : *Biochem. J.*, **36**, 692, 1942.
- (13) OKAJIMA : *C. A.*, **201**, 1932
- (14) ORTEGA, N. : *Univ. Chile, Fac. Quím. y Farm.*, **5**, 217, 1953.
- (15) POLONOVSKI, M. : *Pathologie chimique*. Massons Ed. Paris, 1952.
- (16) ROFFO, A. H. y LASSENE, J. : *Bol. Inst. Med. exper. para el estudio y tratamiento del cáncer*, **1**, 616, 1925.
- (17) SANTOS-RUIZ, A., DEAN GUELBEZU, M. y LÓPEZ AZCONA, J. M. : *Revista española Fisiol.*, **8**, 3, 1952.
- (18) SANTOS-RUIZ, A., LÓPEZ AZCONA, J. M. y SAMPEDRO PIÑEIRO, A. : *Revista española Fisiol.*, **4**, 163, 1948.
- (19) SCHOTTEN, W. : *Pharmazie*, **8**, 327, 1953.
- (20) SHERLOCK, S. y colabs. : *Lancet*, **2**, 453, 1954.
- (21) SUGAL, M. : *Mitt. ad. med. Akad. zu Kioto*, **22**, 387, 1938.
- (22) TODD, W. R. ELVEHJEM, C. A. y HART, E. B. : *Amer. J. Physiol.*, **107**, 146, 1934.
- (23) TUCKER, H. F. y SALMON, W. D. : *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **88**, 613, 1955.
- (24) VALLEE, B. L. y colabs. : *New England J. Med.*, **403**, 255, 1956.
- (25) VALLEE, B. L. y ALTSCHULE, M. D. : *Physiol. Rev.*, **29**, 370, 1949.
- (26) WACKER, W. E. : *New England J. Med.* **449**, 255, 1956.