

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica  
Departamento de Bioquímica. — Madrid  
(Director: Prof. A. Santos-Ruiz)

## **Estudios metabólicos con Cinc-65**

### **II. Influencia de la gestación sobre la distribución de este isótopo en conejas inyectadas por vía intramuscular y en su descendencia(\*)**

por

**B. Ribas, Isabel Pire, Carmen García del Amo y A. Santos Ruiz**

---

(Recibido para publicar el 21 de mayo de 1963)

En 1921 BERTRAND y VLADESCO (5) sugirieron que el cinc podía estar relacionado con las funciones de reproducción, encontrando un nivel elevado en los tejidos genitales y particularmente en la próstata.

Desde entonces y con ayuda del Zn-65, son numerosos los trabajos aparecidos sobre órganos reproductores. MILLAR y sus colaboradores (15), provocando deficiencias de cinc en ratas, comprobaron un marcado retardo en el desarrollo de los órganos genitales y glándulas hipofisarias. GUNN y GOULD (9), entre otros, demostraron la selectividad de la próstata para el cinc y muy recientemente (12) señalaron una acción protectora de este oligoelemento contra lesiones producidas por otras causas. Estos mismos autores, en experimentos en conejos (11) inoculados con una dosis elevada de Zn-65, consiguieron detectar este isótopo en los órganos genitales de las hembras después del coito, lo que parece evidenciar su significación en la copulación.

En los órganos reproductores de las hembras, no se han ob-

---

(\*) Trabajo subvencionado por el Grant SG-SP-113 concedido por el «Agricultural Research Service» del United States Department of Agriculture.

servado niveles tan elevados (10) y (14), si bien es verdad que han sido poco estudiados, no llegando hasta ahora a conclusiones definitivas, pues mientras BALLOU (4), ocupándose de la gestación en ratas, informa que el Zn-65 se acumula en los órganos maternos pero en mayor proporción en los fetos y en la camada, McKENNEY (13) en el carnero, da cifras mucho más bajas en los órganos del hijo que en los de la madre, encontrando que los niveles más altos en ésta son: hígado, riñones y tejidos de las mamas.

BALLOU, en otro trabajo (3), relaciona la edad con la capacidad para asimilar el Zn-65, informando que hay una mayor retención en los animales jóvenes, cuando se les somete a una administración crónica del isótopo.

FEASTER (8) administrando Zn-65 por vía oral a ratas en estado de gestación, encuentra que sólo retienen un 5 % de la dosis a las 24 horas. Dicha retención no parece depender de la etapa de gestación, pero sí del tiempo transcurrido desde la inoculación. Inyectada la madre después del parto el Zn-65 pasa a las crías a través de la leche.

TERRY y colaboradores (18), inyectaron el isótopo a conejas gestantes por vía intravenosa y estudiaron las variaciones, con el tiempo de gestación, en las estructuras placentarias y fetos, pero no en los órganos de la madre ni en las crías.

Conocidos estos antecedentes nos pareció interesante intentar aclarar ciertos aspectos de distribución, en relación con la gestación y en las crías, ya que la presencia del Zn-65 en la biosfera es cada día más general, puesto que se trata de un producto de fisión del uranio y plutonio, lo que justifica el que se encuentre en los ríos que recogen las aguas que fluyen de los reactores. Tal es el caso, ya estudiado en la región regada por las aguas del río Columbia, próximo al reactor de HANFORD (17). Las tierras, plantas (6) y animales (2) que de estas aguas dependen, contienen Zn-65 en proporción apreciable y es interesante estudiar qué dosis pueden ser admisibles en los alimentos, derivados de estos productos (19), que pueden ser una fuente potencial de contaminación.

También se forma este isótopo en las explosiones nucleares y los polvos radiactivos lo contienen en proporción apreciable. En dosis masivas se ha señalado en la población de las islas Marshall como consecuencia de las pruebas nucleares de 1954 en Bikini (7).

La vida media del Zn-65 (245 d, según las nuevas medidas), es lo suficientemente larga para que su vida media biológica, en los organismos, pueda tener un interés manifiesto, ya que se han encontrado niveles de este isótopo más elevados que de

otros elementos tenidos hasta ahora como importantes y peligrosos (20).

Por tanto el problema del paso del  $Zn^{65}$  de la madre a los hijos, nos parece que presenta un interés suficiente para tratar de sistematizar estos estudios en distintos animales.

En el presente trabajo damos cuenta de los resultados obtenidos por nosotros en las variaciones de distribución del  $Zn^{65}$  en conejos normales y gestantes, en distintas épocas de gestación, inoculadas por vía intramuscular y en hijos nacidos de madres que recibieron el isótopo después del parto, así como las cifras de  $Zn^{65}$  eliminadas por la leche.

### Material y métodos

*Animales de experimentación.* — Se utilizaron lotes de 5 a 6 conejas hembras de unos 2 años de edad, de raza común doméstica y de una misma procedencia con peso medio de 2 a 4 kg. Fueron fecundadas todas por el mismo macho. Para la marcha del trabajo se precisa conocer la época de gestación por lo que se ha tenido que vigilar el momento de la cubrición. En las conejas es segura en el momento del celo. En algunos casos se provocó la ovulación con una inyección de hormona gonadotropia coriónica (\*\*).

El período de gestación dura 30 días aproximadamente, por lo que se eligieron 9, 14, 19, 24 y 27 días para las edades de gestación a estudiar. Un lote se mantuvo de control sin fecundar y el último no se sacrificó hasta después de parir, con el fin de estudiar el paso a las crías a través de la leche de la madre.

Todas las conejas sometidas a los ensayos se hallaban aparentemente sanas, pues se rechazaron las que presentaban alguna anormalidad. Colocadas en jaulas metabólicas adecuadas, se mantuvieron en una habitación atemperada.

*Isótopo.* — El  $Zn^{65}$  utilizado nos fue suministrado por la J.E.N. en forma de solución concentrada de  $Cl_2Zn$  con actividad específica de 0,5 mc/mg, procedente de Amersham (Inglaterra).

Se inocularon los animales por vía intramuscular con solución isotónica y estéril que contenía 100  $\mu c/cc$  de  $Zn^{65}$  en el momento del experimento administrándoles 100  $\mu c/kg$  de peso del animal.

*Muestra:* a) ORGANOS: a las 24 horas de la inoculación se sacrificaron los animales por punción cardíaca, previa anestesia con éter. Se procedió a abrir el abdomen y tórax aislándose

---

(\*\*) Alterolan de Alter, S. A.

cuidadosamente los distintos órganos. Sólo el último lote, que se inoculó nada más parir, se mantuvo en contacto con la camada y se sacrificó a los 5 días. Todos los órganos seleccionados fueron lavados, troceados, si fuera necesario, y mantenidos en suero fisiológico durante 10 minutos, para eliminar restos de sangre que pueden falsear los resultados. Se desecaron entre los 105-110° hasta peso constante y se tomó el total o una parte alícuota homogeneizada del órgano. Se dirigieron en tubos de vidrio resistentes a baño maría con 2 cc. de  $\text{NO}_3\text{H}$  concentrado hasta obtener un líquido claro. La grasa se disolvió por la técnica de BAHNER (1) y se llevaron a volumen conveniente para ser contados.

b) LECHE: Las muestras se obtuvieron a diario de la madre simplemente por ordeño de las mamas, siendo suficiente 2 cc. Tuvieron que diluirse al décimo, por la elevada radiactividad que presentaban.

*Técnicas de conteo:* Se utilizaron las mismas que en nuestro trabajo anterior de esta serie (16).

Para las muestras de baja actividad hemos utilizado un nuevo equipo formado por un contador de Centelleo de pozo modelo D S-5 de la NUCLEAR CHICAGO CORPORATION cuya eficacia es unas 100 veces mayor que el equipo primitivo y las muestras de menor volumen (óptimo 2 cc.).

## Resultados

De las cuentas por minuto, obtenidas en las medidas de muestras de los órganos más importantes, se hallaron los  $\mu\text{c}/\text{gr}$  de sustancia seca y se calcularon los tantos por ciento de la dosis total inoculada. La Tabla I es resumen de las medias, de los valores encontrados en 36 experiencias, correspondientes a otras tantas conejas normales y en distintas fases de gestación, con diferentes pesos y número variable de fetos.

En la figura 1 vemos, gráficamente, las variaciones en tanto por ciento de la dosis total recibida, encontradas en algunos órganos de conejos normales y la variación con la edad de gestación.

En la Tabla II comparamos valores medios, en tanto por ciento de la dosis recibida por la madre después de parir, encontrados en ésta a los 5 días del parto y en los hijos, sacrificados sucesivamente, en los 5 días que duró la permanencia en la camada.

La figura 2 nos muestra las curvas representativas de las variaciones de las cifras de acumulación en  $\mu\text{c}/\text{gr}$ , de algunos tejidos de recién nacidos alimentados con la leche de la madre que

recibió el  $Zn-65$  después de parir y se mantuvo con la camada durante 5 días.

TABLA I

Valores medios de la distribución de  $Zn-65$  en órganos de conejas normales y en gestación, a distintas etapas de la misma.

Los valores se expresan en tanto por ciento de la dosis total administrada.

| Órgano      | Tiempo |        |         |         |         |         |
|-------------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|
|             | 0 días | 9 días | 14 días | 19 días | 24 días | 27 días |
| Riñón       | 0,783  | 0,798  | 0,872   | 0,821   | 1,002   | 1,013   |
| Hígado      | 1,030  | 0,812  | 0,752   | 0,682   | 0,774   | 0,656   |
| Páncreas    | 1,467  | 0,573  | 0,571   | 0,424   | 0,320   | 0,386   |
| Bazo        | 0,756  | 0,660  | 0,574   | 0,500   | 0,507   | 0,425   |
| Duodeno     | 0,723  | 0,521  | 0,511   | 0,656   | 0,525   | 0,509   |
| Yeyuno      | 1,159  | 0,906  | 0,681   | 0,533   | 0,609   | 0,538   |
| Grueso      | 0,622  | 0,634  | 0,555   | 0,430   | 0,408   | 0,428   |
| Recto       | 0,610  | 0,395  | 0,382   | 0,336   | 0,339   | 0,334   |
| Pulmones    | 0,600  | 0,519  | 0,530   | 0,436   | 0,420   | 0,378   |
| Corazón     | 0,471  | 0,315  | 0,395   | 0,343   | 0,347   | 0,316   |
| Estómago    | 0,369  | 0,273  | 0,254   | 0,238   | 0,244   | 0,186   |
| C. suprarr. | 0,280  | 0,232  | 0,248   | 0,239   | 0,321   | 0,325   |
| Músculo     | 0,134  | 0,110  | 0,102   | 0,102   | 0,119   | 0,134   |
| Cerebro     | 0,038  | 0,033  | 0,039   | 0,037   | 0,046   | 0,059   |
| Hueso       | 0,015  | 0,009  | 0,012   | 0,013   | 0,012   | 0,011   |
| Ovarios     | 0,367  | 0,295  | 0,282   | 0,303   | 0,301   | 0,325   |
| Trompas     | 0,500  | 0,329  | 0,336   | 0,301   | 0,207   | 0,387   |
| Saco uter.  | 0,619  | 0,579  | 0,526   | 0,574   | 0,564   | 0,632   |
| Utero       | 0,538  | 0,480  | 0,486   | 0,432   | 0,505   | 0,593   |
| Ojos        | 0,056  | 0,039  | 0,039   | 0,161   | 0,031   | 0,046   |
| Medula      | 0,099  | 0,122  | 0,083   | —       | 0,091   | 0,063   |

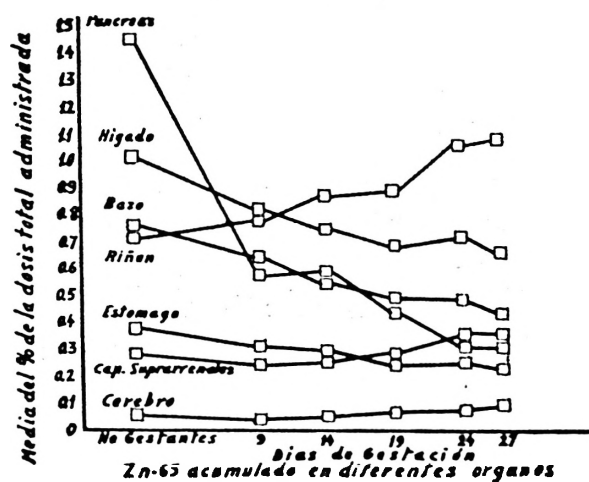


FIG. 1.

TABLA II

*Comparación entre las medias de los tantos por ciento de acumulación de la dosis total de Zn-65 recibida por la madre y la encontrada en los recién nacidos y la madre, en los 5 días siguientes a la inoculación.*

| Organos  | Hijos |        |        |        | Madre  |
|----------|-------|--------|--------|--------|--------|
|          | 1 día | 2 días | 3 días | 5 días | 5 días |
| Riñón    | 0,130 | 0,213  | 0,389  | 0,216  | 0,366  |
| Hígado   | 0,774 | 1,168  | 1,232  | 1,192  | 0,288  |
| Pulmones | 0,043 | 0,101  | 0,223  | 0,125  | 0,197  |
| Corazón  | —     | 0,371  | 0,370  | 0,338  | 0,169  |
| Páncreas | —     | —      | —      | —      | 0,193  |
| Duodeno  | 0,250 | 0,419  | 0,148  | 0,179  | 0,152  |
| Yeyuno   |       |        |        |        | 0,315  |
| Grueso   |       |        |        |        | 0,274  |
| Recto    |       |        |        |        | 0,170  |
| Estómago |       |        |        |        | 0,170  |

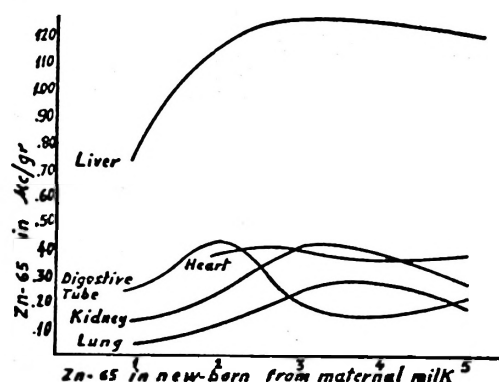


FIG. 2.

La Tabla III nos muestra la secreción del Zn-65 por la leche de 4 conejas en los 5 primeros días después de recibir el isótopo. Damos el valor medio de eliminación por esta vía, durante este período supuesta una secreción láctea de 50 cc por día.

En la figura 3 vemos, gráficamente, la forma de eliminación del Zn-65 por la leche. Los valores están dados en  $\mu\text{c}/\text{cc}$  y la curva, trazados sobre los valores medios.

### Discusión

En las conejas normales (Tabla I), observamos que las ci-

TABLA III

*Cifras de eliminación de  $Zn^{65}$  por la leche de conejas, durante los 5 días posteriores a la inoculación efectuada después de parir. Los valores se expresan en tanto por ciento de las dosis total administrada.*

| Muestras    | Tiempo  |        |        |        |        |
|-------------|---------|--------|--------|--------|--------|
|             | 1 día   | 2 días | 3 días | 4 días | 5 días |
| 1           | 16,15 % | 17,85  | 15,83  | 12,56  | 8,51   |
| 2           | 17,76 % | 19,00  | 17,76  | 13,01  | 8,57   |
| 3           | 15,56 % | 18,65  | 17,06  | 13,05  | 8,92   |
| 4           | 16,30 % | 18,50  | 16,70  | 12,70  | 8,40   |
| Valor medio | 16,44   | 18,49  | 16,83  | 12,83  | 8,60   |

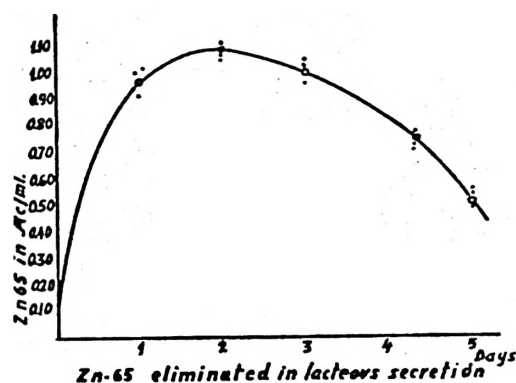


FIG. 3.

fras más altas corresponden al páncreas, yeyuno e hígado, valores que concuerdan en parte con los encontrados por nosotros al inocular por vía intraperitoneal al conejo (16) y con otros autores en otros animales (2). El páncreas, con un nivel más alto y el estómago marcadamente más bajo, difiere sensiblemente de los valores anteriores.

En las conejas gestantes se observa que el riñón y menos las cápsulas suprarrenales, son los únicos órganos en que hay una elevación en la concentración (figura 1), que aumenta en todo el período gestante.

En los órganos de asimilación rápida, como hígado, páncreas, etc. (16), hay un descenso rápido en la concentración de  $Zn^{65}$ , desde el comienzo de la gestación, pues a los 9 días

los valores encontrados están por debajo de su valor medio normal. En los de acumulación (hueso, cerebro) no hay variación sensible como era lógico esperar, ya que 24 horas, tiempo transcurrido desde la inoculación al sacrificio, no puede influir en ellos y los niveles son bajos y en todos los casos sensiblemente constantes.

En los demás órganos se observa una disminución lenta en la concentración del isótopo a lo largo de los experimentos.

Mantenida la madre con la camada, después de inoculada y separados los hijos sucesivamente, vemos (Tabla II) que en todos los días que duró el experimento se detectaron valores de Zn-65, en los órganos de las crías sacrificadas y que, en general, las cifras van aumentando hasta adquirir cierto nivel, solamente el tubo digestivo, entre el 2.º y 4.º día, presenta un descenso apreciable, explicable por ser ésta la vía de entrada del isótopo, ya que procede de la leche materna.

El hígado presenta un valor muy elevado, que está de acuerdo con los datos encontrados en la bibliografía (4, 18), y, desde luego, mucho más alto que el de la madre en el mismo momento.

Comparando los demás órganos de madre e hijos a los 5 días, vemos que éstos adquieren niveles del mismo orden que los de la madre y en algunos casos superiores, sin que podamos establecer comparaciones, pues no hay datos similares en la bibliografía.

La eliminación por la secreción láctea tiene gran interés y las cifras halladas (Tabla III) no dejan lugar a duda sobre la importancia que este medio de transmisión pueda tener para el futuro. Se ha calculado que se elimina por esta vía, en 5 días, un 70 % de la dosis recibida, suponiendo un volumen de 50 cc diarios por coneja. En la figura 3 vemos en  $\mu\text{c}/\text{cc}$  la cantidad eliminada. Esta cifra es de más valor comparativo, puesto que es difícil contrastar la producción exacta de leche en cada caso.

### Resumen

Se exponen en este trabajo los resultados obtenidos al estudiar la distribución del Zn-65 en conejas normales y gestantes, así como en su descendencia. La vía de inoculación empleada es la intramuscular.

En las conejas normales los valores de acumulación, en los órganos, están sensiblemente de acuerdo con los encontrados por nosotros y por otros autores utilizando distintas vías. En las conejas gestantes se encuentran variaciones de distribución en relación con la marcha de la gestación.

El riñón es el único órgano que presenta un aumento marcado al avanzar la gestación, en todos los demás tienden a disminuir la concentración de



$Zn^{65}$ , pero así como en los órganos de acumulación rápida el decaimiento es brusco (hígado y sobre todo páncreas), en los demás es muy lenta la variación observada y en los llamados de acumulación (huesos, cerebro), prácticamente permanece constante en el período estudiado, por ser corto. Estos valores no los hemos podido comparar por no existir antecedentes en la bibliografía.

Los hijos nacidos de conejas inyectadas después de parir, adquieren niveles muy elevados de  $Zn^{65}$ , sobre todo en el hígado. Este cinc ha pasado a ellos a través de la leche, por la que se elimina hasta un 70 % de la dosis recibida en 5 días.

### Summary

#### **Metabolic studies with $Zn^{65}$ (II). — The influence of gestation on the distribution of this isotope in doe-rabbits after intramuscular injection, and in their offspring**

Since Bertrand and Vladesco, in 1921, suggested that there might be a relation between zinc and the functions of reproduction, work has been carried out in this connection, both on the male reproductive organs, on which there are numerous studies, and on the phenomena of gestation, which has been much less studied.

In the present work we present the results obtained by us in the study of the distribution of  $Zn^{65}$  in «normal» and «gestating» doe-rabbits, injected intramuscularly with isotonic and sterile solutions of  $Cl_2$   $Zn^{65}$  at a rate of  $100 \mu c/Kg$  of weight of the animal and killed at 24 hours after inoculation.

The period of gestation lasts approximately 30 days, so that 9, 14, 19, 24 and 27 days were chosen for the tests. One lot were kept for control purposes, and these last were inoculated after throwing their young and were kept in touch with the litter for five days in order to study the passage of the  $Zn^{65}$  to the young through the milk.

The organs, after suitable preparation, were measured with a well counter, Model DS-5, of the Nuclear Chicago Corporation.

The milk was measured directly, after dilution for the high isotope content which it presented.

The figures for  $Zn^{65}$  found in normal does are noticeably in agreement with those found by us on inoculating the rabbit by other methods, and with those found by other authors.

The kidney and, to a lesser degree, the suprarenal capsules (adrenal glands) are the only organs in which the level of  $Zn^{65}$  increases constantly until the end of the experiment. In the organs of rapid accumulation (liver, pancreas, etc.), there

is a rapid decrease in the concentration of the isotope as gestation advances. In the organs of (slow) accumulation (brain, bones, etc.), the levels remain noticeably constant and low, as was logically to be expected, as 24 hours is not very long to have any influence on these figures. In the other organs the levels tend to decrease slowly as gestation advances. We cannot compare these results with any others, as we have found no precedents in the bibliography. Keeping the mother with her litter and killing the offspring successively, we find in the organs of the young analogous values to those of the mother, except in the liver, in which the level is much higher in the young than in the mother. This value is in agreement with data found for other animals in analogous cases. The elimination by lacteous secretion leaves no doubt as to the importance of this means of transmission, for in 5 days up to 70 % of the dose received by the mother is eliminated and passes to her young in this way, being a strong contamination potential, since Zn-65, with a sufficiently long life-average (245 d), is widely distributed in the biosphere, as it is a product of fission of Uranium and Plutonium and is also formed in numerous nuclear processes.

### Bibliografía

- (1) BAHNER, I., ZILVEZNIT, P. and McDONALD, E.: *Science*, **115**, 529, 1952.
- (2) BALLOU, J. E.: *Hanford Biol. Research. H. W.*, **60062**, 1959.
- (3) BALLOU, J. E.: *Hanford Biol. Research. H. W.*, **63047**, 1960.
- (4) BALLOU, J. E.: *Hanford Biol. Research. Annual Report H. W.*, **65600** 99, 1960.
- (5) BERTRAND, G. et VLADESCO, R.: *Compt. rend. Acad. Sci.*, **173**, 176, 1921.
- (6) CLINE, J. F.: *Hanford Biol. Research. Ann. Report. H. W.*, **59500**, 87, 1959.
- (7) CONARD, R. A. and cols.: *U. S. Atomic Energy Com. Report. B.N.L.*, **584**, 135, 1959.
- (8) FEASTER, J. P. and HANSARD, S. L.: *J. Animal Sci.*, **13**, 728, 1954.
- (9) GINORI, S. S. and MORSE, J. G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **88**, 556, 1955.
- (10) GUNN, S. A. and GOULD, T. C.: *J. Endocrinology.*, **16**, 18, 1957.
- (11) GUNN, S. A. and GOULD, T. C.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **100**, 651, 1959.
- (12) GUNN, S. A. and GOULD, T. C.: *Arch. of Pathol.*, **75**, 21, 1963.
- (13) MCKENNEY, J. R., MCCLELLAN, R. O. and PERSING, R. L.: *Hanford Biol. Research. H. W.*, **69500**, 51, 1961.
- (14) MILLAR, M. J., ELCOATH and MAWSON, C. A.: *Rev. Can Biol.*, **3**, 5, 1954.

- (15) MILLAR, M. J., FISCHER, M. I., COAT, B. L. and MAWSON, C. A.: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **36**, 557, 1958.
- (16) MOLINA, G., RIBAS, B., DELSO, J. L., GALARZA, A., G.<sup>a</sup> DEL AMO, C. y SANTOS RUIZ, A.: *R. Esp. Fisiol.*, **17**, 81, 1961.
- (17) PALMER, R. F.: *Hanford Biol. Research*, H. W., 53500, 189, 1959.
- (18) TERRY, C. B., TERRY, B. D. and DAVIES, J.: *Am. J. Physiol.*, **198**, 303, 1960.
- (19) VAN DILLA, M. A.: *Science*, **1931**, 659, 1960.
- (20) WATSON, D. G. and DAVIS, J. J.: *Hanford Biol. Research* H. W., 48523, 11, 1957.

