

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

Estudios metabólicos con Cinc-65

IV. Datos sobre captación de este isótopo por los elementos sanguíneos del perro (*)

por

O. Puratic Solic, A. M. Galarza Basanta, C. García del Amo
y A. Santos-Ruiz

(Recibido para publicar el 3 de julio de 1963)

En nuestra serie de trabajos sobre metabolismo del Zn-65 en organismos vivos, nos pareció interesante estudiar el paso de este isótopo a la sangre y la forma de ser captado por los distintos componentes de la misma.

Como debe conservarse vivo el animal durante largo período de tiempo y con el fin de orientarnos sobre las localizaciones del Zn-65, hicimos medidas sobre la piel, que son como proyecciones de las concentraciones en los distintos órganos. Las medidas «in vivo» a lo largo de estudios sistemáticos se han hecho en varios trabajos; unos utilizan contadores para el cuerpo total (2) y otros para localizaciones específicas (4), que sirven de pruebas complementarias y si los resultados no son concluyentes, cooperan al conocimiento de la captación.

Se eligió el perro como animal de experimentación porque vive, se desenvuelve y alimenta, en un ambiente análogo al del hombre, condición importante para conocer la cantidad de Zn-65

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

que pueda llegar a éste, a través de los alimentos (8) y aguas de bebida (7) y (1), puesto que este isótopo, con una vida media suficientemente larga (245 d), puede representar un peligro potencial. Se forma en numerosos procesos nucleares, y al ser el cinc un oligoelemento indispensable para la mayor parte de los seres vivos, entra este isótopo a formar parte integrante de los mismos, por lo que conviene estudiar en qué forma y en qué tiempo pasa a la sangre y cuáles son las zonas en que existe una mayor acumulación (1).

Material y métodos

Animales de experimentación:

Se utilizaron perros de ambos sexos de edad comprendida entre los 6 meses y 5 años y de peso entre 6 y 20 kg.

Antes de comenzar las pruebas se sometieron durante 30 días a determinadas condiciones de vida para su aclimatación y se contrastó mediante análisis clínico su normalidad.

Se colocaron en jaulas metabólicas de material exento de cinc y las tolvas, para la retirada de excreciones, fueron forradas de material plástico.

Solución radiactiva:

Utilizamos una solución isotónica y estéril de $\text{Cl}_2\text{Zn-65}$ que contenía $50 \mu\text{c}/\text{cm}^3$ inoculando a razón de $10 \mu\text{c}/\text{kg}/\text{día}$ durante distintos períodos de tiempo, hasta alcanzar la dosis total deseada.

- a) durante 10 días; dosis total $100 \mu\text{c}/\text{kg}$.
- b) durante 20 días; dosis total $200 \mu\text{c}/\text{kg}$.
- c) durante 35 días; dosis total $350 \mu\text{c}/\text{kg}$.
- d) durante 45 días; dosis total $450 \mu\text{c}/\text{kg}$.

Considerando las necesidades de cinc/día/kg, se han inoculado dosis que no produjeran efectos de hipercincismo que falsearan los resultados.

Muestras:

Las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena safena externa. Se emplearon agujas de grueso calibre y jeringas con un diámetro de luz en el conducto de salida de 2 mm para evitar la hemolisis por presión sobre las paredes.

Sangre total: Fue obtenida usando mezcla de Wintrobe como anticoagulante.

Plasma: Una fracción de la sangre total se centrifugó a 200 r.p.m. durante 5 minutos, aumentando después la velocidad a 1000 r.p.m. durante 30 minutos. Con una pipeta Pasteur se separó el plasma del sobrenadante.

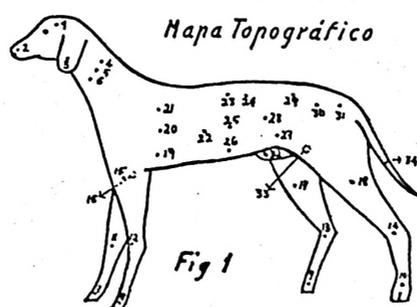
Suero: Se obtuvo por centrifugación en tubos de vidrio neutro inmediatamente después de su extracción. Se centrifugaron los tubos a 200 r.p.m. durante 10 minutos y después a 1000 r.p.m. durante 30 minutos. Se extrajo el suero mediante una pipeta Pasteur.

Células sanguíneas: Se centrifugó sangre como en la técnica para la obtención de plasma midiendo exactamente el volumen de sangre total para poder hacer las referencias en los cálculos. Después de separar el plasma, se lavaron las células con solución salina fisiológica, 4 veces consecutivas, separando los líquidos de lavado por centrifugación. Previamente se hizo un ensayo de resistencia globular para determinar la concentración adecuada de la solución salina a emplear.

Equipo de contaje: Se empleó un equipo formado por un contador de pozo, modelo DS-5 de la Nuclear Chicago Corporation, unido a una escala Tracelab, modelo SC-33A-NT, de gran eficacia.

Acumulación del Zinc-65 en el perro (medida indirectamente por la proyección de los órganos sobre la piel):

Se empleó un contador portátil de la Nuclear Chicago Corporation modelo 2612, y forrando el tubo detector con una funda de plomo en que se abrió una ventana de 1 cm², se verificaron prospecciones sobre la piel del perro. Las medidas son referidas a los 34 puntos indicados en el mapa topográfico adjunto que corresponden aproximadamente a:



1, Cerebro; 2, Morro; 3, Oreja; 4 y 5, Paquetes nervioso y vascular del cuello; 6, Tiroides y paratiroides, tráquea, laringe, esófago; 7 y 8, Carpos; 9 y 10, Tarsos; 11 y 12, Articulación húmero-cubital; 13 y 14, Articulación fémur-tibial; 15 y

16, Articulación escapulo-humeral ; 17 y 18, Articulación coxal ; 19, Corazón ; 20 y 21, Pulmones ; 22, Hígado ; 23 y 24, Riñones y glándulas suprarrenales ; 25, Estómago ; 26 y 27, Intestino delgado ; 28, Ciego ; 29, Colon ; 30, Recto ; 31, Ano ; 32, Organos genitales externos ; 33, Organos genitales internos ; 34, Cola.

Resultados

En las tablas I, II y III se dan los valores encontrados, en μc , para 100 ml de sangre total (primera columna); para las células recogidas de 100 ml de sangre (segunda columna); para 100 ml de plasma (tercera columna); y para 100 ml de suero (cuarta columna) correspondientes a tres dosis diferentes de isótopo recibido por distintos perros.

TABLA I

CAPTACION DEL CINC POR LOS ELEMENTOS DE LA SANGRE
(Dosis a)

Tiempo	SANGRE TOTAL	CELULAS	PLASMA	SUERO
	$\mu\text{c}/100$ ml sangre t.	$\mu\text{c}/\text{cel}$ 100 ml	$\mu\text{c}/100$ ml plasma	$\mu\text{c}/100$ ml suero
15 m.	0,240	0,016	0,493	0,434
1 d.	0,545	0,416	0,296	0,273
4 d.	1,422	1,152	0,301	0,293
5 d.	1,422	0,090	0,303	0,331
6 d.	1,614	1,333	0,492	0,504
10 d.	2,044	1,692	0,721	0,704
CESAN LAS INOCULACIONES				
22 d.	1,497	1,370	0,262	0,253
35 d.	0,825	0,957	0,144	0,139
55 d.	0,796	0,728	0,074	0,079
78 d.	0,324	0,288	0,060	0,062
84 d.	0,267	0,251	0,050	0,055
94 d.	0,212	0,182	0,038	0,030
113 d.	0,206	0,181	0,035	0,023
180 d.	0,090	0,053	0,024	0,018

TABLA II
CAPTACION DEL CINC POR LOS ELEMENTOS DE LA SANGRE
(Dosis c)

Tiempo	SANGRE TOTAL	CELULAS	PLASMA	SUERO
	$\mu\text{c}/100\text{ ml}$ sangre t.	$\mu\text{c}/\text{cel } 100\text{ ml}$	$\mu\text{c}/100\text{ ml}$ plasma	$\mu\text{c}/100\text{ ml}$ suero
15 m.	0,157	0,029	0,429	0,457
1 d.	0,491	0,318	0,256	0,231
2 d.	0,783	0,234	0,275	0,247
7 d.	2,275	—	0,612	0,644
8 d.	3,261	1,993	—	—
18 d.	—	—	1,276	1,288
20 d.	—	—	1,341	1,348
22 d.	7,223	—	—	—
28 d.	—	—	1,584	1,530
32 d.	—	—	1,817	1,909
33 d.	—	6,768	—	—
34 d.	9,138	—	—	—
CESAN LAS INOCULACIONES				
44 d.	4,126	—	0,670	1,530
46 d.	—	2,765	—	—
63 d.	2,417	—	0,365	0,393
64 d.	2,187	—	—	0,344
66 d.	—	2,049	—	—
134 d.	0,932	0,770	0,122	0,130

Las figuras 2, 3 y 4 nos dan las variaciones de las cifras de Zn-65 en sangre total, células sanguíneas, suero y plasma.

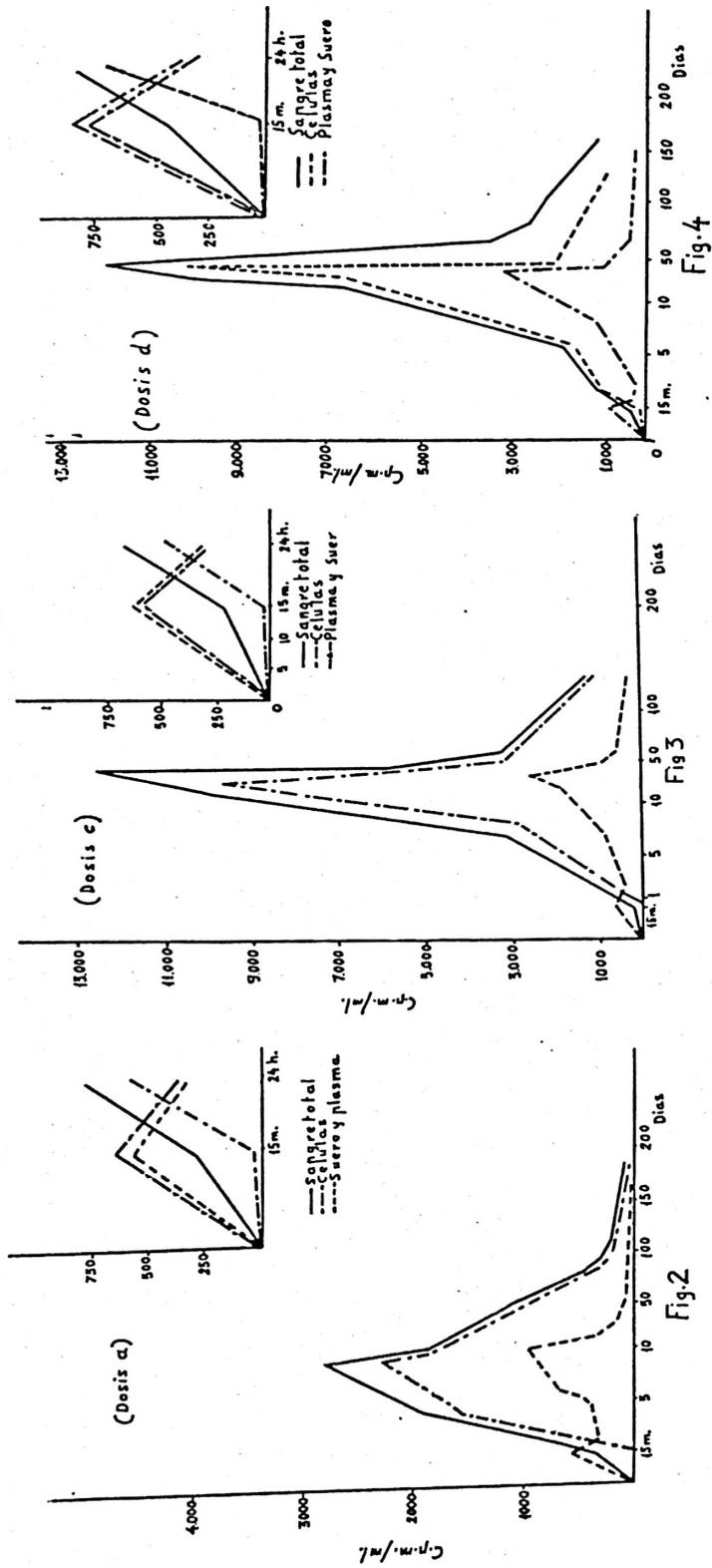
Los valores se dan en c.p.m./ml.

En la Tabla IV recogemos las medidas, efectuadas sobre la piel de los perros, de acuerdo con el mapa topográfico dado.

Discusión

a) Sangre total.

A los 15 minutos de la inoculación por vía intraperitoneal, el cinc-65 ha pasado ya el torrente sanguíneo. Comienza una línea ascendente a medida que siguen las inoculaciones. En el momento en que éstas cesan, hay un descenso rápido durante unos 20 días. Después, la pendiente de la curva es menos pronunciada, y a los 180 días de la administración de una dosis (a), la sangre total todavía contiene cinc-65.



FIGS. 2, 3 y 4. Captación del Zn-65 por los elementos de la sangre. En el ángulo superior derecho, detalle del comienzo de la gráfica, en que se representa por separado suero (— · —) y plasma (---) y sangre (—). Escala de tiempo (abscisas) no proporcional.

TABLA III
CAPTACION DEL CINCO POR LOS ELEMENTOS DE LA SANGRE
(Dosis d)

Tiempo	SANGRE TOTAL	CELULAS	PLASMA	SUERO
	$\mu\text{c}/100\text{ ml}$ sangre t.	$\mu\text{c}/\text{cel } 100\text{ ml}$	$\mu\text{c}/100\text{ ml}$ plasma	$\mu\text{c}/100\text{ ml}$ suero
15 m.	0,323	0,022	0,587	0,630
1 d.	0,594	0,486	0,217	0,254
2 d.	0,851	0,727	0,249	0,223
6 d.	1,385	1,221	0,541	0,570
26 d.	4,929	4,478	1,237	—
27 d.	5,101	—	1,393	1,303
28 d.	6,602	5,762	1,731	1,594
43 d.	1,555	7,647	2,136	2,077
CESAN LAS INOCULACIONES				
46 d.	10,014	10,565	1,544	1,442
50 d.	—	—	0,726	0,731
54 d.	5,261	—	—	—
55 d.	4,346	—	—	—
56 d.	3,458	3,319	0,569	0,550
64 d.	2,620	—	—	—
66 d.	—	—	0,362	0,386
76 d.	—	1,900	—	—
84 d.	1,946	—	—	—
86 d.	—	—	0,262	—
154 d.	0,851	0,777	—	—
156 d.	—	—	0,194	0,246

b) **Células sanguíneas.**

A los 15 minutos de la inoculación, las células sanguíneas contienen muy poco cinc-65. Las radiaciones emitidas por ellas quedan dentro de la zona de error de conteo, aunque siempre por encima del fondo. Después la trayectoria de la curva guarda una relación muy estrecha y es casi paralela a la de la sangre total. Aumentan los valores progresivamente durante el período en que duran las inoculaciones. Luego se observa una caída brusca seguida de un descenso más suave. A los 180 días de la administración de una dosis (a), las células aún contienen cinc-65.

c) **Suero.**

A los 15 minutos de la inoculación casi todo el cinc-65, presente en la sangre, se halla en el suero. A las 24 horas, ha decrecido el cinc sérico; pero después de nuevas administraciones,

RADIACIONES EN mr/h EMITIDAS POR LA PROYECCION DE LOS ORGANOS SOBRE LA PIEL

TABLA IV

ZONAS		DOSIS a		DOSIS b		DOSIS c	
		Tiempo en días		Tiempo en días		Tiempo en días	
		90	110	35	65	60	110
1	Cerebro	0,80	1,10	8,00	5,00	6,00	7,00
2	Morro	0,60	0,65	7,00	2,50	5,00	9,20
3	Oreja	1,00	0,60	7,50	5,00	6,00	4,40
4-5	Paquetes nervioso	1,45	1,77	13,75	10,75	15,00	12,00
6	Tráquea	1,70	1,75	14,50	10,2	15,50	10,00
7-8	Carpos	0,65	0,55	5,75	3,00	3,75	2,65
9-10	Tarsos	0,62	0,52	5,25	3,40	5,00	3,20
11-12	Artic. Húmero cub.	0,90	0,55	7,25	4,00	3,25	3,90
13-14	Art. Fémur-tibial	0,90	0,70	7,25	3,65	5,50	3,50
15-16	Art. Escápulo-H _μ m	1,15	0,75	11,50	6,70	11,25	5,15
17-18	Art. Coxal	1,22	0,87	9,50	7,50	10,50	6,70
19	Corazón	1,80	1,60	12,50	10,70	14,50	12,00
20-21	Pulmones	1,75	1,70	13,25	12,0	11,25	12,35
22	Higado, bazo	1,45	1,50	11,50	8,50	15,00	10,00
23-24	Riñones y glánd.	1,50	1,10	11,70	7,80	13,00	10,00
25	Estómago	1,52	1,33	12,75	8,75	13,75	10,50
26-27	Intes. delgado	1,42	1,40	13,50	9,00	14,00	9,00
28	Ciego	1,60	1,17	14,00	9,00	12,50	11,00
29	Colon	1,70	1,00	15,00	8,50	15,00	11,00
30	Recto	1,50	0,92	11,75	7,85	13,25	10,00
31	Ano	1,30	0,84	8,50	7,20	11,50	9,00
32	Genit. externos	1,50	1,10	14,50	8,00	14,00	9,00
33	Genit. internos	1,30	0,8	13,00	9,00	13,00	12,50
34	Cola	0,60	0,40	4,00	2,00	2,50	5,00

aumenta, aunque los valores están muy por debajo de los de sangre total y células. Al cesar las inoculaciones se observa la misma caída que en sangre total y células sanguíneas.

d) Plasma

La concentración de cinc-65 es en todo momento igual a la del suero. Las curvas de plasma y suero están prácticamente superpuestas.

Por los datos obtenidos en las distintas fracciones de la sangre observamos la rapidez con que el cinc-65 aparece en ella. En las primeras horas todo el cinc-65 de la sangre se encuentra prácticamente en el plasma (Figs. 2, 3 y 4). Como las cifras en plasma y suero son iguales, debe pensarse que el fibrinógeno no contiene cinc en su molécula. Después, el cinc-65 plasmático comienza a decrecer, mientras que aumenta el cinc-65 de las células. (Tablas I al III.)

La captación del cinc-65 por los eritrocitos puede deberse a :

- a) Paso a través de la membrana en la sangre circulante.
- b) Incorporación del cinc a las enzimas intracelulares, en el sistema retículo endotelial.

Si excluyéramos la segunda posibilidad, tendríamos que aceptar que el cinc-65, integrante de la anhidrasa carbónica de los eritrocitos, procedería del cinc plasmático. Pero ensayos realizados *in vitro* (3), han demostrado que no existe intercambio entre el cinc de la enzima y el cinc-65 del medio. Consideramos que debe descartarse también la posibilidad de síntesis de anhidrasa por eritrocitos circulantes, ya que se necesitaría un sistema proteinogénico ribosomático, del cual carecen estas células. Por lo que creemos que el cinc-65 que entra a formar parte de tal enzima se incorpora en el sistema retículo endotelial a las células precursoras de eritrocitos, por ejemplo, hemocitoblastos, en la fase de su formación.

Además del cinc-65 de la anhidrasa carbónica, dentro de los eritrocitos pueden estar formando parte de otras entidades, por ejemplo, de complejos cinc-proteínas, sales, etc. Este cinc sí puede proceder del que ha atravesado la membrana celular en el torrente sanguíneo.

Las mismas consideraciones podríamos hacer sobre el cinc presente en los leucocitos.

En favor de estas hipótesis tenemos el aumento gradual del cinc-65 de las células sanguíneas, a pesar de la corta vida de las mismas y la gran afluencia de células nuevas a la sangre, aumento que se explicaría, si las células destruidas fueran sustituidas por otras nuevas portadoras del isótopo.

No hemos pretendido realizar un estudio exacto de distribución del Zn-65 en nuestras medidas sobre la piel del perro, sino determinar las acumulaciones posibles de este isótopo y los resultados obtenidos (Tabla IV) nos muestran un paralelismo en todos los casos estudiados, pudiendo admitirse 6 zonas, con distintas dosis de radiación, que de menor a mayor son :

1. — Cola, cara, orejas, extremidades (desde los carpos y tarsos hasta la mitad del húmero y fémur).

2. — Cerebro.

3. — Zona glútea, primera mitad del fémur y húmero, zona dorsal.

4. — Riñones, intestino delgado, recto.

5. — Páncreas, hígado, bazo, pulmones, corazón, órganos genitales, estómago, ciego.

6. — Tráquea, laringe, esófago, tiroides, y paratiroides, paquetes vascular y nervioso del cuello.

Esto nos permite admitir que las funciones relacionadas con

los órganos de los dos últimos grupos serán las más alteradas, como hemos podido comprobar en otros trabajos de esta serie (5) y (6).

Resumen

Se da cuenta de cómo se distribuye el Zn-65 en la sangre, en función de la dosis total inyectada, del modo de fraccionar ésta en el tiempo y del período transcurrido desde que cesa la administración.

Como una orientación, sobre su distribución posterior, se han medido *in vivo* sobre la piel del perro, las radiaciones emitidas por los distintos órganos que pueden dividirse en 6 zonas de distinta intensidad de radiación. Se ha encontrado que los órganos esencialmente hematopoyéticos están incluidos en zonas de intensa radiación, lo que explica las variaciones que pueden presentarse en las constantes hematológicas.

Summary

Metabolic studies with Zinc-65. (IV) Data on the uptake of this isotope by the blood elements of the dog

It is shown the way in which the Zn-65 is taken up by the different components of the blood, when the dog is submitted to weak, continuous inoculations of this isotope. A study is made of the figures attained in total blood, cells, plasma and serum, while the inoculations are going on and when they have finished, up to the end of the 180 days at which this part of the experiment finished, for three different total doses.

It has been found (Figs. 2, 3 and 4) that, during the first minutes, all the Zn-65 in the blood is in the serum, the figures for the cells being very low. After 15 minutes, this latter value ascends, which is then superior to that for the serum at all times.

The curves of serum and plasma are practically coincident, which indicates that the fibrinogen does not contain Zn-65.

As a first guide to the localization of Zn-65 in the dog, while the animal is alive and on the topographical plan of the same, measurements have been made in mr/h of the radiations emitted by the different organs, it being possible to admit 6 zones with different doses of radiation, and the organs which are preeminently haematopoietic (liver, spleen, etc.) are included in one of the zones of greatest intensity of radiation.

Bibliografía

- (1) BALLOU, J. E. : *AEC Research and Develop. Report. Document HW-60062*, 1959.
- (2) CHRISTIAN, J. E., BRECKINRIDGE, C. E., y VACIK, J. P. : *Int. J. App. Rad. Isot.*, **18**, 157, 1962.
- (3) HAM, J. y CURTIS, D. : *Medicine*, **17**, 447, 1938.
- (4) MCKENNEY, R. J., MCCLELLAN, R. O., PERSING, R. L., WEST, R. E., KERR, M. E. y BUSTAD, L. K. : *Hanford Laboratories. Document HW-69500*, 46, 1961.
- (5) PURATIC, O., GALARZA, A., GARCÍA AMO, C., SANTOS RUIZ, A. : Trabajo V de esta Serie. *Rev. esp. Fisiol.* (En prensa.)
- (6) PURATIC, O., GALARZA, A., GARCÍA AMO, C., SANTOS RUIZ, A. : Trabajo VI de esta Serie. *Rev. esp. Fisiol.* (En prensa.)
- (7) SHELINE, G. E., CHAIKOFF, I. L., JONES, H. E., y MONTGOMERY, L. M. : *J. Biol. Chem.* **147**, 409, 1943.
- (8) VAN DILLA, M. A. : *Science*, **131**, 659, 1960.

