

# ESTUDIO DE LA CERULOPLASMINA EN SUJETOS DE NUESTRO MEDIO\*

PERCY A. CARPIO MELÉNDEZ

## INTRODUCCION

El rol fisiológico de la ceruloplasmina, así como la patogenia de sus alteraciones metabólicas unida a la del cobre, todavía se desconoce.

La enfermedad de Wilson es la única enfermedad en el hombre debida a un trastorno en el metabolismo del cobre cuya naturaleza íntima no está aún aclarada. La usual explicación del fenómeno (11) observado en la enfermedad es que el paciente es incapaz de sintetizar ceruloplasmina cuando el gen anormal se presenta en la forma homocigótica. El incremento de la absorción de cobre a través del intestino y el depósito en los tejidos a niveles tóxicos se dice ser secundario a la deficiente síntesis de ceruloplasmina. Esta explicación no es consistente, porque algunos pacientes con enfermedad de Wilson tienen niveles de ceruloplasmina normales o aproximadamente normales.

Neil A. Holtzman, establece una nueva idea, que el metal (cobre) puede estimular la síntesis de una proteína (ceruloplasmina).

Estos hechos han despertado en nosotros el interés por indagar sobre este tema, dosando dicha "enzima" en el suero de 51 sujetos sanos de un grupo homogéneo, pretendiendo alcanzar un promedio de valores normales.

## MATERIAL Y METODOS

El dosaje bioquímico de cifras normales en unidades enzimáticas de ceruloplasmina se efectuó utilizando el suero de estudiantes del VI Año de Medicina de la Facultad de San Fernando, todos ellos Internos del

---

\* Tesis presentada para optar el grado de Bachiller en Medicina, U.N.M.S. M. en Mayo de 1967.

Hospital Central del Empleado, que representaban el 70% del total de casos estudiados. El resto incluyó a obreros de la Clínica Anglo-Americana.

Las edades del grupo, en general, fluctúan entre los 17 y 30 años, correspondiendo el mayor porcentaje (64%) a las edades comprendidas entre los 25 y 28 años.

La ejecución del trabajo tuvo lugar en el Centro de Investigación de la Clínica Anglo-Americana, bajo la supervisión del Dr. J. Nckashima O.

El dosaje fue por duplicado y triplicado en algunos casos con el fin de estudiar la estabilidad de la enzima y la fidelidad del método bioquímico.

Los sueros una vez obtenidos fueron mantenidos a congelación.

Las determinaciones repetidas a intervalos de tiempo variables se exponen en el cuadro número 2.

#### *Instrumental y material de laboratorio.*

El equipo utilizado, en lo principal, incluye lo siguiente:

1. Espectrofotómetro "Coleman" Junior, modelo 6D.
2. Balanza de precisión "Mettler", modelo B6.
3. Baño María a 37 grados centígrados.
4. Papel indicador de pH "Phydrion" Vivid, escala 3 a 9.
5. Tubos de lectura calibrados 10 x 75 mm.
6. Pipetas de unidades Lambda (Una unidad Lambda = 0.001 ml.).

#### *Reactivos.*

1. Acetato-Buffer, 0.1 M, pH 6.0.

Añadir 10 ml. de ácido acético 0.1 M (0.57 ml. de ácido acético glacial para 100 ml. de agua destilada) a 200 ml. de acetato de sodio (1.36 g. de  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  por 100 ml. de agua destilada). El pH debe ser 5.95-6.0.

2. "Sodium azide" ( $\text{N}_3\text{Na}$ ) Matheson Coleman and Bell.

Preparar una solución 0.1 g.% en acetato buffer 0.1 M. El pH debe ser 5.95-6.0. Se conserva a refrigeración. Esta sal es sumamente tóxica.

3. p-Fenilenediamina 2HCl Matheson Coleman and Bell.

La purificación de los cristales siguió la presente técnica (13):

Preparar una solución saturada en agua hirviendo y añadir carbón vegetal (Darco Charcoal) para decolorar. Filtrar la solución caliente

y secar los cristales incoloros en campana de vidrio sobre  $\text{CaCl}_2$  anhidro. Guardar en frasco de color para proteger de la luz. El reactivo se prepara a 0.25%, disolviendo 12.5 mg. en 3.0 ml. de acetato buffer ajustando el pH a 6.0 por adición de NaOH 1N, gota a gota con pipeta serológica de 0.2 ml. Se añade luego acetato buffer para completar el volumen de 5 ml. Este reactivo puede durar 2 horas después de su preparación si se conserva en la oscuridad.

En el presente trabajo, el reactivo se preparó pesando 62.5 mg. de PPD para un volumen final de 25 ml. y utilizando NaOH 2.5 N para llevar el pH a 6.0. Aproximadamente se requiere 5 gotas utilizando un gotero corriente.

Señalamos que es muy importante el cuidado que debe observarse en la preparación del sustrato, y sobre todo en lo que respecta a la purificación de los cristales y el control del pH.

Para un mejor conocimiento del sustrato, señalamos algunas de sus principales características físico-químicas (12):

p-Fenilenediamina, sinónimos:

1, 4-benzenodiamina.

1, 4-diaminobenceno.

Fórmula,  $\text{C}_6\text{H}_4(\text{NH}_2)_2$

Peso molecular, 108.14.

Cristalización incolora, monoclinica.

Punto de fusión, 139.7 grados centígrados (139-41).

Punto de ebullición, 207 grados centígrados.

Solubilidad en agua, 3.8 g. % a 24 grados centígrados; 669 g. % a 107 grados centígrados.

Soluble en alcohol, éter, etc.

4. Standard artificial, preparar Pontacyl violeta 6R (Matheson Coleman and Bell) 15.9 mg. por litro de una solución de ácido acético al 0.5%. La lectura del standard equivale a 400 unidades.

La determinación de la ceruloplasmina sérica se hizo por el método de R. H. Henry Chiamori, Jacobs y Segalove (2).

La concentración de ceruloplasmina se determina a partir de la oxidación de p-fenilenediamina a 37 grados centígrados y a un pH de 6.0. El producto de oxidación (azul púrpura) se mide espectrofotométricamente o fotométricamente. La oxidación catalizada por el cobre y el hierro presentes, se corrige utilizando en la lectura un suero Blank en el cual la ceruloplasmina es inhibida por "sodium azide" ( $\text{NaN}_3$ ).

La unidad de actividad enzimática se define en forma arbitraria como el incremento de 0.001 de absorbancia a 530 milimicras, bajo las

condiciones del test. El dosaje puede también realizarse empleando un fotómetro Klett con filtro 54. En el presente trabajo se utilizó el mismo método, pero adaptado al espectrofotómetro Coleman Junior, modelo 6D, y a 540 milimicras. Las lecturas efectuadas corresponden a la escala de Densidad Óptica.

#### *Procedimiento.*

1. Disponer de 2 tubos marcados, añadiendo en la siguiente forma: Blank, 2.0 ml. de buffer, más 2.0 ml. de reactivo "azide", más 200 lambdas de suero (1 unidad lambda equivale a 0.001 ml.).

Test, 4.0 ml. de buffer, más 200 lambdas de suero.

2. Incubar, protegidos de la luz, en tubos Blank y Test y el substrato PPD en Baño María a 37 grados centígrados por 5 minutos.

3. Añadir 2.0 ml. del substrato PPD a cada tubo Blank y Test y mezclar siempre protegidos de la luz.

4. Leer el test con el Blank a los 10 minutos y nuevamente a los 40 minutos, a 540 milimicras en la oscuridad y en el tiempo más corto posible.

#### *Cálculo.*

$$\text{Unidades de ceruloplasmina} = \frac{\text{Lectura a los 40 minutos} - \text{Lectura a los 10 minutos}}{\text{Lectura del Standard artificial con agua}} \times 400$$

#### *Resumen.*

	Acetato buffer	Reactivo "azide"	Suero Lambdas	Baño María 37°C - 5 minutos	PPD ml.
Blank	2.0	2.0	200	"	2.0
Test	4.0	—	200	"	2.0

1 unidad Lambda equivale a 0.001 ml.

## RESULTADOS

A continuación exponemos el trabajo en detalle, especificando los resultados obtenidos. Están anotadas en el cuadro número 1 las cifras promedio resultantes de las dos determinaciones practicadas en cada uno de los casos y el promedio general del total de casos, con el análisis estadístico respectivo. Por otro lado, se comparan las cifras correspondientes a determinaciones hechas en fechas diferentes (Cuadro número 2) y que responden al estudio de la estabilidad de la ceruloplasmina en relación al tiempo y la evaluación del método frente a la reproducción de los resultados, a intervalos de tiempo variable.

**Cuadro N° 1. Ceruloplasmina Sérica. Promedios Parciales.**

Caso N°	Unidades Ceruloplasmina	Caso N°	Unidades Ceruloplasmina
1	333.2	16	226.4
2	320.0	17	246.6
3	366.6	18	320.0
4	266.4	19	219.7
5	353.2	20	393.2
6	293.2	21	393.2
7	233.2	22	333.2
8	426.6	23	386.4
9	313.2	24	333.2
10	273.2	25	426.4
11	133.2	26	413.2
12	106.4	27	346.4
13	353.2	28	379.8
14	346.4	29	306.4
15	246.2	30	373.2
31	440.0	42	413.2
32	346.4	43	400.0
33	480.0	44	360.0
34	373.2	45	293.2
35	386.4	46	386.4
36	386.4	47	380.0
37	360.0	48	319.8
38	400.0	49	360.0
39	440.0	50	419.8
40	266.4	51	453.2
41	386.4		

*Análisis estadístico.*

N = 51

Media	Desv. St.	Coef. de Var. %	Valores extremos
344.4 ± 10.7	76.2 ± 7.62	22.1	106.4 — 480.0

Al observar la totalidad de los resultados, se aprecia que dos casos se distinguen por presentar las cifras más bajas. Prescindiendo de esos valores que representan el 3.9% del total, el cuadro de valores estadísticos correspondiente al 96.1% de los casos (n = 49) se modifica como sigue:

N = 49

Media	Desv. St.	Coef. de Var. %	Valores extremos
354.4 ± 8.8	62.1 ± 6.3	17.5	219.7 — 480

**Cuadro N° 2. Estudios de la estabilidad de la enzima en el suero congelado. Porcentajes de reproducción de los resultados.**

Caso N°	1er. dosaje	2do. dosaje	Intervalo días	Reproducción %
4	266.4	266.4	8	100
6	293.2	306.4	7	104.5
3	366.6	346.4	10	94.4
31	440.0	406.6	34	92.4
27	346.4	333.2	38	96.1

Límite: 97.4%

## DISCUSION

*Material clínico.*

Para el dosaje de ceruloplasmina en sangre se empleó el suero de un grupo homogéneo de sujetos adultos sanos, cuyas edades en su mayor porcentaje fluctúan entre los 25 y 28 años. El 70% está representado por estudiantes del VI Año de Medicina. Así hemos querido ga-

rantizar la validez de los resultados, escogiendo, de la población en general, el grupo más representativo.

#### Método.

El fundamento bioquímico del método empleado que corresponde a R. J. Henry, Chiamori, Jacobs y Segalove (2), deriva de una serie de observaciones fundamentales, producto de la investigación sucesiva de varios autores.

Holmberg y Laurell, en 1948, fueron los primeros en aislar el cobre proteico del suero y los que propusieron el nombre de ceruloplasmina. Observaron que su contenido en cobre es alrededor de 0.32%, con un peso molecular de aproximadamente 151,000 y conteniendo 8 átomos de cobre. En 1951, estos mismos autores, determinaron la actividad oxidativa midiendo el consumo de oxígeno con el aparato de Warburg y utilizando *p*-fenilenediamina como sustrato. Posteriormente se establece un procedimiento más práctico, midiendo espectrofotométricamente el color producido por la oxidación de la benzidina, *p*-fenilenediamina (PPD), *O* N, N-dimetil-*p*-fenilenediamina (PPD) (1).

Akerfeldt, en 1957 (21), propone un test simple, en el cual el suero se une a un sustrato (PPD) sin buffer, para medir el tiempo de aparición del color.

Los investigadores demuestran que el ácido ascórbico en el suero prolonga el tiempo de oxidación del sustrato, siendo su duración proporcional a la concentración de dicho ácido. La ingestión de una considerable cantidad de jugo de naranja incrementa significativamente esta fase larga. Por consiguiente, las técnicas de dosaje empleadas deben calcular la oxidación del sustrato tomando en cuenta este período para evitar el error.

También se conoce que la oxidación de la benzidina, PPD o DPP, por el suero, es catalizada no solamente por la ceruloplasmina, sino por el cobre y el hierro contenidos en el suero como también en los reactivos utilizados en el test. Ahora bien, para determinar la oxidación producida por la ceruloplasmina, solamente es necesario efectuar la corrección o inhibir la oxidación catalítica producida por los metales. Ravin (7) (19) usó un suero blank en el cual la ceruloplasmina es inhibida por "sodium azide" ( $\text{NaN}_3$ ). En el método de Humoller (6) y Broman (3), la oxidación catalítica de los metales es inhibida por EDTA. Pero esto es discutible porque Henry (2) observó que el EDTA produce una inhibición de la actividad oxidativa por encima del 20%. Después Humoller demostró que el EDTA es capaz de remover 4 de los 8 átomos

de la molécula de ceruloplasmina, concomitantemente, reducción hasta en un 50% de la actividad oxidativa. La inhibición no es competitiva.

La ceruloplasmina ha sido ubicado electroforéticamente en la globulina alfa 2 o fracción IV de Cohn (20).

Broman y Paulik señalaron la existencia de más de una forma de ceruloplasmina y Cartwright estableció la relación ecuacional de cobre y ceruloplasmina en individuos normales con la siguiente fórmula:

$$\text{mg. de ceruloplasmina/100 ml.} = \frac{\text{Microgramos de cobre/100 ml.} \times 0.94}{3.2}$$

El método de R. J. Henry (1), contemplando todos estos factores, determina la ceruloplasmina a través de la oxidación de PPD (substrato) a 37 grados centígrados y a un pH de 6.0 midiendo el producto azul púrpura espectrofotométricamente o fotométricamente. La influencia del cobre y el hierro presentes se elimina utilizando un suero blank, en el cual, la ceruloplasmina es inhibida por "sodium azide" ( $\text{NaN}_3$ ), de tal manera que al final la medida de la oxidación del substrato sólo corresponde a la ceruloplasmina.

Es preciso señalar, la importancia que tiene el cuidado de la temperatura exacta y constante, así como el pH de los reactivos y el substrato, y, además, la influencia de la luz sobre el PPD, pues incrementa su oxidación. La protección de la luz es necesaria e imprescindible.

#### *Cobre y ceruloplasmina.*

El cobre ingerido, al pasar al torrente circulatorio es captado por la albúmina y al cabo de pocas horas se une a una alfa 2 globulina, que es la proteína específica del cobre denominada ceruloplasmina. La globulina del hierro, siderofilina, puede también combinarse con el cobre, pero su competición por el hierro no ha sido demostrada.

El plasma contiene dos fracciones del cobre; una que reacciona directamente con dietilditiocarbamato, denominada "fracción de reacción directa", no es dializable y contiene de 0 a 5% del cobre plasmático total. La otra forma del cobre llamada "fracción de reacción indirecta", representa un promedio de 96%. Reacciona con dietilditiocarbamato, previo tratamiento con ácido. Es el cobre contenido en la ceruloplasmina (1).

R. J. Henry señala que tal vez haya una tercera forma libre no combinada de cobre normalmente presente en el suero y en pequeña cantidad.

Se ha reportado que los niveles altos de ceruloplasmina están en relación a padecimientos hepáticos entre los que se menciona la cirrosis biliar, colangiocolitis y neoplasia maligna. Los estudios de Miki H. (14) relacionan, también, las cifras elevadas con las leucemias, tumores cerebrales y anemias aplásicas. Con las enfermedades infecciosas, nefritis agudas, enfermedades del sistema nervioso central y asma bronquial.

Holtzman, estudiando un caso de intoxicación por cobre (11), interpreta sus hallazgos estableciendo que las cifras elevadas de ceruloplasmina constituirían una respuesta al daño hepático primario ocasionado por el cobre.

Gitlin y Janeway demostraron que las inyecciones prolongadas de cobre en el ratón provocan incremento de los niveles de ceruloplasmina. Se ha observado, a su vez, que en pacientes con síndrome de mala absorción se consiguió elevar las cifras de ceruloplasmina administrando cobre endovenoso.

Si el aumento de la concentración de ceruloplasmina representa una respuesta a la elevación del cobre sérico, podría esta respuesta ser defectuosa en la enfermedad de Wilson cuyo cobre hepático se halla también incrementado (11).

Aunque el rol fisiológico de la ceruloplasmina todavía se desconoce, se concibe que su mayor función es captar el cobre accesible para la excreción. Cuando la ceruloplasmina es deficiente, el cobre no puede ser rápidamente excretado, pudiendo alcanzar niveles tóxicos.

#### *Resultados obtenidos.*

El dosaje de ceruloplasmina, practicado en el suero de 51 sujetos adultos sanos, de nuestro medio, arroja una cifra media de  $344.4 \pm 10.7$  unidades, con un coeficiente de variación de 22.1% y valores extremos entre 106.4 y 480.0 unidades; pero, al observar la totalidad de los 51 casos, llama la atención dos valores sumamente bajos y que son el caso número 11 con 133.2 unidades y el caso número 12 con 106.4 unidades. Prescindiendo de ellos, que representan el 3.9% del total, sometemos al análisis estadístico al 96.1% restante, tratando de alcanzar así, valores más representativos. La media de los 49 casos es de  $354.4 \pm 8.8$ , el coeficiente de variación 17.5% y los valores extremos son 219.7 y 480.0 unidades. Creemos dar más crédito a estos valores.

R. J. Henry (2), investigando la ceruloplasmina en 40 sujetos adultos sanos (20 hombres y 20 mujeres) conjuncia sus resultados y señala el promedio de 425 unidades con variaciones límites de 280 y 570

unidades, que comparando con nuestros valores representa un 16.7% mayor.

Aunque el mismo autor señala no haber encontrado en su serie diferencia en relación al sexo, admite que la mitad de las mujeres pueden presentar cifras más altas que los hombres, ya que su cobre sérico es también más elevado. En nuestro medio se ha encontrado dicha diferencia en relación al cobre (10).

Es preciso señalar que, no obstante de tenerse en cuenta el mismo fundamento bioquímico para el dosaje enzimático, las diferencias en cuanto al procedimiento mismo implica, naturalmente, diversificación de los valores finales. Henry utilizó el espectrofotómetro Beckman DU equipado con "Thermospacers" en cuyo procedimiento prescindió del standard artificial; en cambio nuestras lecturas se efectuaron empleando el espectrofotómetro "Coleman Junior modelo 6D, siendo los sueros incubados en Baño María a 37 grados centígrados y comparados con el standard artificial.

Los dosajes se efectuaron con material calibrado y las determinaciones fueron chequeadas por duplicado y triplicado inclusive.

Puede finalmente argüirse la posibilidad de establecer diferencias bioquímicas en relación a factores raciales o nutricionales de los grupos estudiados y que no están todavía consignadas en la literatura.

El cuadro número 2 demuestra que la conservación del suero a baja temperatura (congelación), preserva la estabilidad de la enzima (ceruloplasmina) aún más allá de las 5 semanas. La reproducción de los resultados alcanza el límite de 97.4% según el control practicado en 5 sueros de la serie.

## CONCLUSIONES

Se realiza el dosaje bioquímico de cifras normales de ceruloplasmina en unidades enzimáticas "Henry", utilizando el suero de sujetos supuestos sanos, en su mayoría estudiantes del VI Año de Medicina.

De los resultados obtenidos, se derivan las siguientes conclusiones:

1. La cifra media en unidades enzimáticas "Henry" de ceruloplasmina sérica, resultante del dosaje practicado en 49 sujetos adultos sanos, de nuestro medio, es de  $354.4 \pm 8.8$  con una desviación standard de  $62.1 \pm 6.3$ .

2. Los valores de los 49 casos estudiados tienen las cifras límites de 219.7 y 480 unidades.

3. El suero mantenido a congelación preserva en forma notable la estabilidad de la enzima (ceruloplasmina), aún más allá de las 5 semanas.

4. El porcentaje de la reproductibilidad de los resultados en determinaciones sucesivas practicadas a intervalos de tiempo variable, alcanza el límite de 97.4%.

5. La precisión del método de R. J. Henry, guarda relación importante tanto con la exactitud del pH del substrato y los reactivos, como con la temperatura constante (37 grados centígrados) y el dosaje practicado en la obscuridad.

6. El standard artificial (Pontacyl violeta) preparado y conservado a temperatura ambiente, se mantiene constante.

7. Señalamos la importancia del método bioquímico de R. J. Henry como procedimiento fácil y de accesible manejo para el dosaje enzimático de la ceruloplasmina sérica, aplicable en cualquier laboratorio de investigación clínica.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Henry, R. J.: *Clinical Chemistry, Principles and Technics*, 499-503, 1964.
2. Henry, R. J.; Chiamori, N.; Jacobs S. L. and Segalove, M.: Determination of ceruloplasmin oxidase in serum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104: 620, 1960.
3. Broman, L.: Separation and Characterization of two coeruloplasmin from human serum. *Nature* 182: 1655, 1958.
4. Curzon, G.: Effect of Chymotrypsin on coeruloplasmin. *Nature* 181: 115, 1958.
5. Frank, M. M. and Jay Wurtman: R. Some sources of error in the Akerfeldt Test for serum oxidative activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 97: 478, 1958.
6. Humoller, F. L.; Mockler Pat, M.; Molthaus, J. M.: Enzymatic properties of ceruloplasmin. *J. Lab. Clin. Med.* 56: 222, 1960.
7. Ravin, H. A.: An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin. *J. Lab. Clin. Med.* 58: 161, 1961.
8. Wurtman, R. J.; Frank, M. M.; The oxidative activity of blood serum in Schizophrenic and Maniac-Depressive Psychosis. *Arch. Internal Med.* 102: 790, 1958.
9. Gras, J.: *Protenas Plasmáticas, Fisicoquímica, Metabolismo, Fisiopatología y Clínica de las Proteínas Extracelulares*. 2a. Ed., 1961.
10. Carranza, C. R.: "Cupremia en estado normal y patológico". IV Congreso Peruano de Química, Lima, Perú, 1953.

11. Holtzman, N. A.; Elliot, D. A.; Heller, R. H.: Copper Intoxication. *New Eng J. Med.* 275: 347-352, 381-392, 1966.
12. "Handbook of Chemistry and Physics". 41a Ed., 1960.
13. O' Brien Donough: *Laboratory Manual of Pediatrics, Micro and Ultramicro Biochemical Techniques*" 3a Ed., 1962.
14. Miki, H.: Studies on serum ceruloplasmin in children. II. On serum celuloplasmin in various diseases. *Acta Paediat Jap* 68: 829-840, Oct. 1964.
15. Miki, H.: Studies on serum ceruloplasmin in children, I. On serum ceruloplasmin in normal children. *Acta Paediat. Jap.* 68: 820-828, Oct., 1964.
16. Mc Cosker, P. J.: Paraphenylenediamine oxidase activity and copper-levels in Mammalian plasmas. *Nature* 190: 887, 1961.
17. Koch y colaboradores: Enfermedad de Hodgkin, linfadenografía, cupremia y sideremia. *La Prensa Médica Argentina*: 53: 18, 1001-1003, 1966.
18. Cartwright, G. E.: Degeneración Hepatolenticular (Enfermedad de Wilson). *Medicina Interna (Harrison)*, 2a Ed., 1962.
19. Ravin, H. A.: Rapid Test For Hepatolenticular degeneration, *Lancet*, 270: 726, 1956.
20. Adelstein, S. J.; Coobs, T. L. and Valle, B. L.: Metalloenzymes and miccardial infarction. *New Eng. J. Med.* 255: 105, 1956.
21. Akerfeldt, S.: Oxidation of N. N-Dimethyl-p-phenylenediamine by serum from Patients with Mental Disease. *Science* 125: 117, 1957.
22. Sternlieb, I.; Scheinberg, I. H.: The Diagnosis of Disease in asymptomatic Patients. *J.A.M.A.* 183. 747-750, 1963.