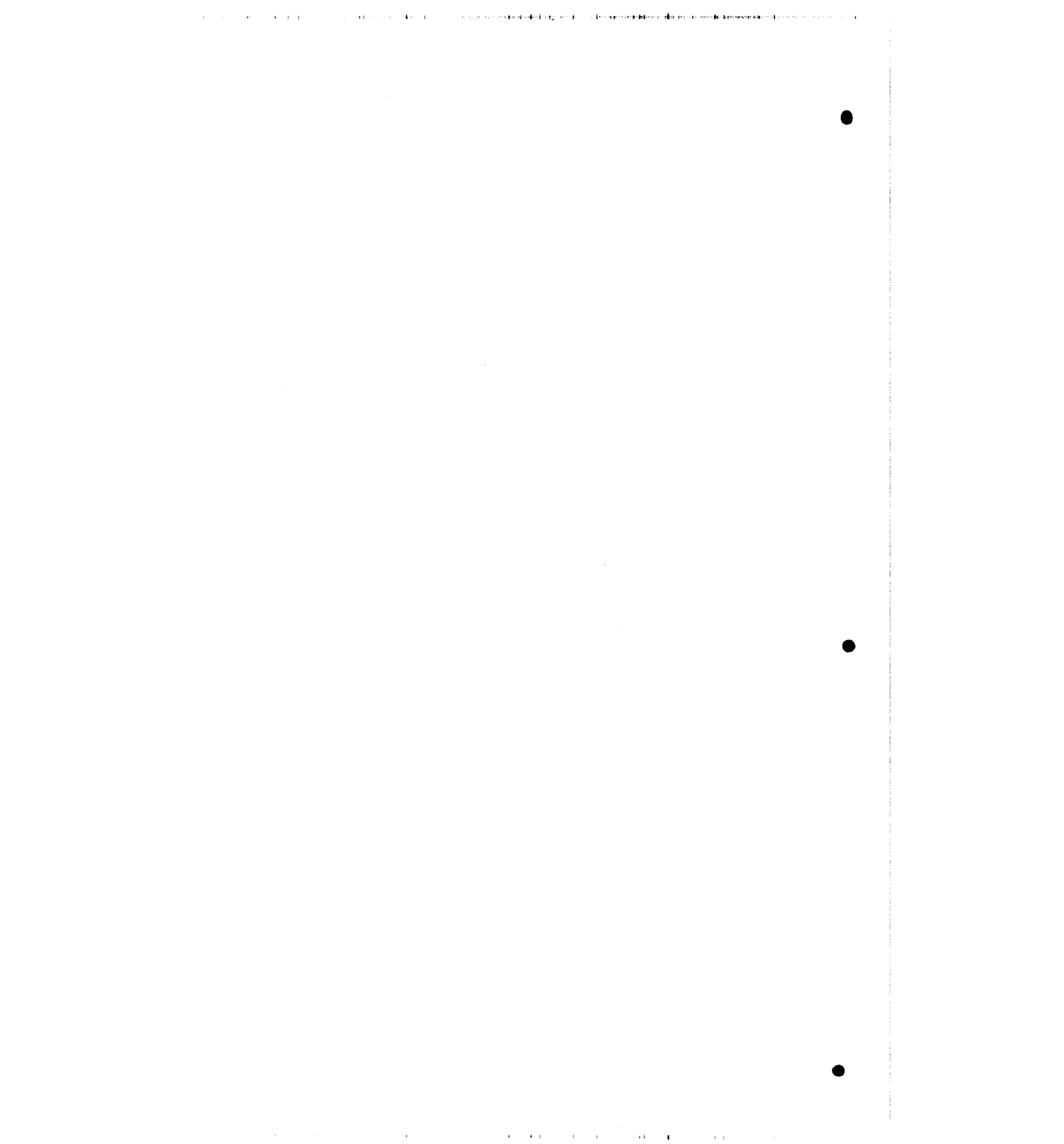


NIVELES SÉRICOS DE CÉRULOPLASMINA EN ADULTOS
NORMALES EN NUESTRO MEDIO

— **Dr. Hernán Ferreira V.**

Docente en la Catedra de Medicina I y III
de la Universidad del Zulia.



I — CONSIDERACIONES GENERALES

Casi todo el cobre plasmático está ligado a una simple proteína. Holmberg y Laurell (1) aislaron una cuproproteína de plasma humano y porcino, y debido a su color azul la llamaron céruloplasmina.

Tiene un peso molecular de 151.000 y contiene 0,34% de cobre, lo cual corresponde a 8 átomos de cobre por molécula. Semejante a otras cuproproteínas, la céruloplasmina es una enzima, con la propiedad de tener actividad oxidativa. Sin embargo, su substrato fisiológico, si lo tiene, es desconocido.

En el método de preparación de Holmberg y Laurell (2) la céruloplasmina es precipitada del suero con la fracción globulínica, por el sulfato de axonio; y luego disuelto en agua y dializada. Algunas impurezas son precipitadas a un PH de 6.2 y 5.5; y otras impurezas, por dos tratamientos con 50% de alcoholcloroformo a temperatura ambiental. La céruloplasmina es luego extraída con solución de cloruro de sodio, del precipitado resultante; el cual es en su mayor parte una proteína desnaturada.

Los procedimientos químicos utilizados para la determinación de céruloplasmina sérica, están basadas en la propiedad que tiene la céruloplasmina de oxidar ciertas substancias, en especial el dihidrocloruro de parafenilendiamina (P.P.D.).

Trabajo llevado a cabo por Holmberg y Laurell (3) demostró que la actividad oxidativa de la céruloplasmina sobre el P.P.D., es proporcional al contenido en cobre del suero. Afirmando que la céruloplasmina es la principal enzima oxidativa del P.P.D. del plasma humano.

Scheinberg y Morrell (4) usaron céruloplasmina preparada de la fracción IV de Cohn, por fraccionamiento con metanol-cloroformo.

Hay pocas publicaciones sobre la estructura y propiedades de la céruloplasmina; principalmente debido a la dificultad de preparar material purificado, en cantidad suficiente.

El reciente interés despertado por el estudio de la céruloplasmina, ha sido relacionado con sus alteraciones en la degeneración hepato-lenticular (5, 6, 7), en el síndrome nefrótico, en las infecciones, y en algunos estados psicóticos.

ENFERMEDAD DE WILSON Y CÉRULOPLASMINA

En la enfermedad de Wilson, la deficiencia o ausencia de la céruloplasmina, es probablemente la consecuencia de una incapacidad hereditaria específica para sintetizarla en cantidad normal. Varios grupos de Investigadores piensan que la anomalía primaria en la enfermedad de Wilson, es una deficiencia de céruloplasmina; lo cual conduce, por un mecanismo desconocido, a una excesiva absorción del cobre de la dieta. La introducción del cobre radioactivo ha clarificado varios eslabones básicos en el error del metabolismo en la enfermedad. Los pacientes con esta enfermedad, absorben cobre del tubo gastrointestinal en mayor cantidad que lo normal. Luego es transportado a la sangre, adherido a la albúmina; pero no es transferido en cantidad normal a la alfa 2 globulina con la cual debería unirse para formar la céruloplasmina.

Sea cual fuere el mecanismo responsable del error metabólico, el cobre es concentrado en cantidad mayor de lo normal en el hígado (donde produce cirrosis), núcleo lenticular (manifestaciones extrapiramidales) y en la membrana de Descemet de la córnea (anillo de Kayser-Fleischer). También hay aumento del cobre urinario, aminoaciduria y calciuria.

Aunque una deficiencia de la proteína ligada al cobre del suero es aceptada, generalmente, como básica en la patogenia de la enfermedad de Wilson, esta proteína puede no estar completamente ausente. Existe cierta confusión al hablar sobre la palabra céruloplasmina. Esta es una enzima con capacidad de oxidar polifenoles (polifenol-oxidasas), pero sólo si el cobre está presente en la molécula. Sin embargo, la proteína puede ser demostrable por procedimientos inmunológicos, tenga o no cobre la molécula. Esto probablemente explica, la discrepancia entre los métodos inmunológicos y otras técnicas cuando el mismo espécimen de suero es usado. Una reacción cobre oxidasa negativa, puede representar una ausencia de la céruloplasmina, o simplemente que la proteína es libre de cobre.

Los niveles séricos de cobre por si solo, ofrecen poca ayuda, ya que ello puede representar el cobre ligado a la globulina (céruloplasmina), el cobre ligado a la albúmina, o ambos.

Resultado de la administración intravenosa de cobre 64.

Estudios llevados a cabo en la Clínica Mayo, (8), con cobre radioactivo (cobre 64) en pacientes con enfermedad de Wilson, hemocromatosis, cirrosis de Laennec y en normales, han permitido clarificar ciertos aspectos de la patogenia de la enfermedad de Wilson. Dichos estudios consisten, en la administración intravenosa de una dosis de cobre 64, seguida por análisis periódicos de la radioactividad en sangre, orina, heces, etc.

Una de las formas más exactas de distinción entre pacientes con enfermedad de Wilson, otros defectos hepáticos e individuos normales, es el patrón de radioactividad plasmática.

Inmediatamente después de la inyección intravenosa, el cobre del plasma descendió en una forma estable. Tanto las personas normales, como los pacientes con cirrosis o hemocromatosis, exhibieron una rápi-

da caída de la radioactividad, seguida luego de una elevación substancial. Así a las 48 horas, mientras todos los pacientes con enfermedad de Wilson tuvieron una concentración plasmática de cobre 64 de menos de 1, 1% de la dosis por litro de plasma (0. 16 a 1, 10%), todas las condiciones diferentes a la enfermedad de Wilson, tuvieron niveles por encima de los citados.

Como primeramente fue explicado por Bearn y Kunkel (9) los pacientes con enfermedad de Wilson, presentan una incapacidad de combinar cobre 64 con la proteína, para formar la céruloplasmina; lo que ha sido demostrado en la Clínica Mayo por técnicas de electroforesis.

Tres días después de la inyección intravenosa del cobre 64 , menos del 1% de la dosis aparece en la orina de controles y pacientes sin enfermedad de Wilson; 48 horas después, cuando la dosis contuvo menos de 0,5 microgramos de cobre 64 , los controles excretaron menos de 1 microgramo de dicha dosis y los pacientes con enfermedad de Wilson excretaron 8 y hasta 31 microgramos. Lo que evidencia un aumento en la excreción de cobre urinario en los pacientes con enfermedad de Wilson.

Aunque el cobre 64 ha permitido reconocer varias anormalidades en los pacientes con enfermedad de Wilson, existen varias teorías para explicar el defecto básico. Tres parecen ser las más especuladas:

1—Hay una superabsorción del cobre por el tracto intestinal, lo que ha sido demostrado con el cobre 64 . Esta teoría presume al lado de una excreción urinaria elevada, un balance positivo que conduce al depósito de cobre en el hígado, cerebro y córnea. A ésto se le podría agregar como propone Glazebrook (10), que el hígado en la enfermedad de Wilson no puede excretar el exceso de cobre.

2—Usman (11) y asociados proponen que las proteínas en la enfermedad de Wilson tienen una avidez no usual hacia el cobre; lo que origina, en el hígado, cirrosis; en los ojos, cambios patológicos siguiendo al depósito de cobre; y en el riñón, el cobre no puede ser reabsorbido porque es intercambiado por oligopéptidos.

3—Existe una deficiencia de la céruloplasmina sérica; lo que puede ser demostrado por métodos enzimáticos, inmunológicos, o por colorimetría directa. La céruloplasmina, al menos en su forma libre de cobre, es demostrable en el suero de la mayoría de los pacientes con enfermedad de Wilson, en poca cantidad. La reacción cobre-oxidasa puede ocasionalmente ser positiva.

La administración de céruloplasmina o grandes transfusiones de plasma, no ha sido efectiva en modificar el metabolismo anormal del cobre en dichos pacientes. Podría considerarse que dichos experimentos fueron realizados durante un tiempo demasiado breve, que no permitió lograr resultados, o que la céruloplasmina suministrada fué saturada por el cobre. Es más, si el defecto fundamental fuese simplemente una falta de céruloplasmina, deberíamos esperar una conversión del cobre 64 a la forma globulínica, o bien una temporaria reducción en la excreción urinaria del cobre; lo que no se ha conseguido.

No coincidimos con este criterio. Pensamos nosotros que podría ocurrir que, al principio, no solamente no hubiera una disminución del cobre urinario, sino que el aporte de céruloplasmina pudiera determinar una movilización de cobre, con aumento en la orina. Sería el suministro de la enzima por un período suficientemente largo, lo que determina la reducción de los depósitos de cobre y su disminución en la orina.

Otra teoría ha sido postulada por Bearn (12) y mantenida por las observaciones de Sass-Kartsak (13) y asociados. Argumentan que el cobre 64 fue transferido imperfectamente a céruloplasmina, en dos pacientes con enfermedad de Wilson, que aparecieron con niveles normales de céruloplasmina sérica.

En realidad no parece cierto que la enfermedad de Wilson se deba a un exceso de cobre, ya que dicha enfermedad no puede ser simulada por la intoxicación con cobre.

Podría considerarse la posibilidad de que una forma anormal de céruloplasmina sea sintetizada por el hígado, en pacientes con enfermedad de Wilson, ya que por lo menos cuatro variedades de céruloplasmina humana han sido identificadas. Sin embargo, Uriel (14) y colaboradores no fueron capaces de distinguir entre la céruloplasmina de la enfermedad de Wilson y la céruloplasmina de personas normales, usando procedimientos de inmunoelectroforesis.

Apartando los aspectos teóricos, el diagnóstico de la enfermedad de Wilson está basado en la combinación de los siguientes datos: anillo de Kayser-Fleischer, cambios neurológicos asociados con enfermedad extra-piramidal, cirrosis hepática, altas concentraciones de cobre en hígado, descenso de la céruloplasmina sérica, descenso del cobre combinado sérico, descenso del ácido úrico sérico, hipercupremia, hiperaminoaciduria e hipercalciuria.

Los pacientes asintomáticos pueden ser reconocidos por: a) céruloplasmina sérica: menos de 15 miligramos % (la cifra mínima normal en los pacientes masculinos de nuestro estudio, fue de 11.1 mg %); b) excreción urinaria de cobre de más de 100 microgramos por vía; c) un nivel de cobre sérico (no en forma de céruloplasmina) de más de 30 microgramos % (normal: alrededor de 5); d) un valor de cobre hepático de más de 150 microgramos por gr. de peso seco (normal 25).

ESQUIZOFRENIA Y CÉRULOPLASMINA

Como le oímos decir a Kety en una conferencia, se ha tratado de atribuir a un trastorno en la actividad de la céruloplasmina, la responsabilidad del cuadro de la esquizofrenia. De allí que actualmente se esté investigando activamente la posibilidad de una base metabólica como causa de esa enfermedad.

En 1956, Akerfeld (15) reportó que la monoamino-oxidasa sérica está elevada en pacientes adultos con esquizofrenia, y consideró una actividad enzimática aumentada de la céruloplasmina, como responsable de esta reacción alterada. Reportó además, que la céruloplasmina sérica está aumentada en un 80% de los pacientes con esquizofrenia, y sólo en un 3% de las personas normales.

Desde entonces muchos investigadores se han dedicado al estudio de la actividad de la céruloplasmina sérica en dichos pacientes, con resultados diferentes. Recientes estudios realizados por Ruth Morris Backwin (16), en niños con esquizofrenia, niños hospitalizados no esquizofrénicos, y niños normales, han dado como resultado el conocimiento de que la actividad de la céruloplasmina en el suero de niños con esquizofrenia, no difiere de la de los niños control; lo que está de acuerdo con observaciones recientes realizadas por otros en adultos. Sin embargo, se ha conseguido una concentración de cobre sérico persistentemente elevado, en niños esquizofrénicos. Recientes estudios han demostrado que en adultos con esquizofrenia, la concentración de cobre sérico es normal.

Como casi todo el cobre del suero está normalmente ligado a la céruloplasmina, hallazgos de Rackwin presentan interesantes posibilidades: 1) La céruloplasmina de niños esquizofrénicos podría ser menos activa enzimáticamente. 2) En niños esquizofrénicos la mayor parte del cobre sérico podría no estar ligado a la proteínas. 3) El suero de niños esquizofrénicos podría contener un inhibidor de la actividad oxidativa del suero. 4) Niños normales o esquizofrénicos, podrían tener más alto nivel de cobre sérico que el adulto.

SÍNDROME NEFRÓTICO Y CÉRULOPLASMINA

Varios autores han encontrado cifras bajas de céruloplasmina sérica en pacientes con síndrome nefrótico. Se cree que se trata de un déficit de la enzima, consecutivo a la gran pérdida de proteínas que ocurre en este síndrome, más bien que a una alteración relacionable propiamente con la céruloplasmina.

II — TRABAJO

En el presente trabajo nos proponemos determinar los niveles séricos de céruloplasmina, en adultos normales en nuestro medio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se hizo determinación de céruloplasmina en el suero de 115 personas, de las cuales 76 fueron hombres y 39 mujeres; todos considerados en condiciones normales.

Los 76 hombres fueron donantes del Banco de Sangre del Hospital Universitario de Maracaibo, mientras que las mujeres fueron alumnas de la Escuela de Medicina y Enfermería de Maracaibo.

Se excluyeron todos los factores capaces de modificar los niveles de céruloplasmina sérica.

El método utilizado fué el de O. B. Rouchin.

Principio:

La céruloplasmina oxida el substrato, dihidrocloruro de pfenilendiamina, transformándolo de su estado reducido incoloro, a la forma oxidada de color violeta. Después de incubación del suero con el substrato,

bajo condiciones controladas, la actividad enzimática es inhibida con ázida de sodio (Na. N3). Debido a que el dihidrocloruro de pfenilendiamina (P.P.D.) sufre autooxidación espontánea; la prueba siempre debe ser acompañada de un reactivo blanco y un suero control.

Reactivos:

1—Buffer de acetato (fuerza iónica de 1.2, Ph 5.2 ± 0.05). 20 cc. de ácido acético glacial más 163 gr. de acetato de sodio (Na C 2 N3 O2. 3H2O) diluido hasta un litro, con agua desionizada.

2—0.1 % de PPD. Preparar diariamente disolviendo 10 mg de PPD en 10 c.c. de buffer de acetato.

3—0.02 % de ázida de sodio. Preparar diariamente disolviendo 10 mg. de ázida de sodio en 50 c.c. de agua desionizada.

Procedimiento:

1—Colocar un c.c. de PPD al 0.1 %, recién preparada, en un tubo para el reactivo blanco, otro c.c. en un tubo para el suero control, y otro c.c. en un tubo para la prueba. Marcando los tubos: RB — C — P.

2—Colocar 0.1 c.c. de agua en el tubo RB.

3—Colocar 0.1 c.c. de suero en cada uno de los tubos restantes.

4—Inmediatamente se le agregan 5 c.c. de ázida de sodio en el tubo control "C", y se mezcla por inversión.

5—Luego se incuban los tubos en baño de María a 37° C, por 15 minutos.

6—Inmediatamente después de la incubación se le agregan 5 c.c. de ázida de sodio en el tubo de la prueba.

7—Luego se hace la lectura de la densidad óptica, utilizando una longitud de onda de 524 milimicras en un espectrofotómetro Beckman D.U.

Cálculos:

La concentración de céruloplasmina es expresada en mg % usando la siguiente fórmula: $Y = A + BX$.

y = céruloplasmina en mg. % c.c.

x = densidad óptica determinada

a = - 1.7

b = 150

R E S U L T A D O S

Los coeficientes estadísticos para ambos grupos son los siguientes:

Para hombres:

Media	Desviación Standard	Coefficiente de Variación	Cifras Extremas
25.5	7.2	28.2 %	12.0 — 46.3

Para mujeres:

29.9 6.5 21.6% 16.3 — 44.8

Aplicando a los valores hallados el grado de variación que nos da la Desviación Standard tendremos los parámetros que encierran las cifras normales, que son las siguientes:

Para hombres: de 11.1 a 39.9 Mgrs. %

Para mujeres: de 16.9 a 42.9 Mgrs. %

C O M E N T A R I O S

En el análisis de los resultados anteriormente expuestos observamos una diferencia entre las cifras halladas para ambos sexos, más significativa en el límite mínimo que en el máximo, siendo los niveles más bajos para los hombres.

Vemos también que nuestros valores no concuerdan, aunque sin una notable diferencia, con los hallados por algunos autores en otros países. Comparándolos con los dados por Houchin (cuyo procedimiento es el seguido por nosotros en este trabajo) en los EE. UU. es de 15 a 35 mg. % con una media de 25, encontramos para el grupo de mujeres valores ligeramente superiores; 26 de los 39 casos, o sea el 66,6%, tienen una cifra por encima de dicho promedio.

Para el grupo de hombres observamos una elevada variedad, que a pesar de permitir una media casi igual de 25.5 hace bajar la cifra límite inferior al mismo tiempo que sube la superior.

Cartwright y col. (6) reportan cifras entre 23 y 44 mg. %. Los gráficos 1 y 2 muestran la distribución de frecuencia, notando que aun cuando es normal para ambos grupos, el de mujeres sigue casi una perfecta curva de Gaus, en la cual el 98.6% de las determinaciones están dentro de 2 Desviaciones Standard de la media aritmética. En los hombres, el porcentaje dentro de los parámetros de normalidad de la curva, es de 94.1%. El gráfico No. 3 muestra la distribución de los casos por edades, observándose que la cifra promedio de céruoplasmina fue de 22,4 mgs. % entre los 15 y 20 años; 24.9 mgs. % entre los 20 y 30 años; 27.1 mgs. % entre los 30 y 40 años; 22.6 mgs. % entre los 40 y 50 años; y 28.6 mgs. % entre los 50 y 60 años.

GRAFICO N° 1

HOMBRES

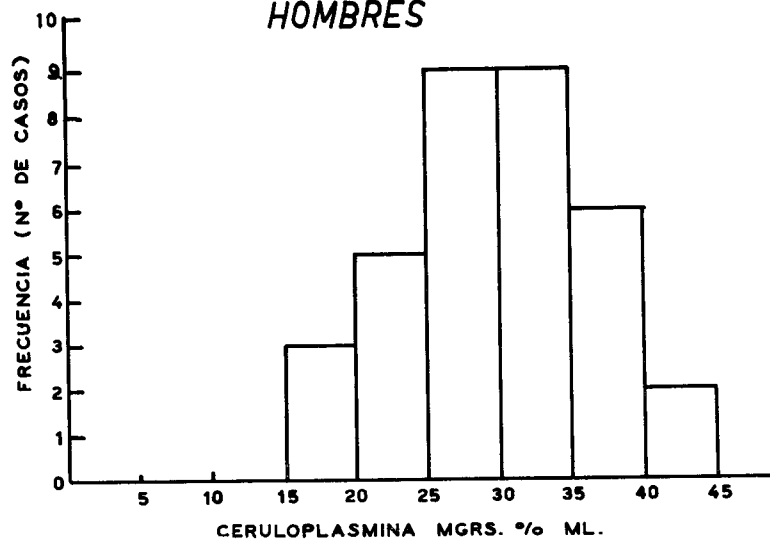
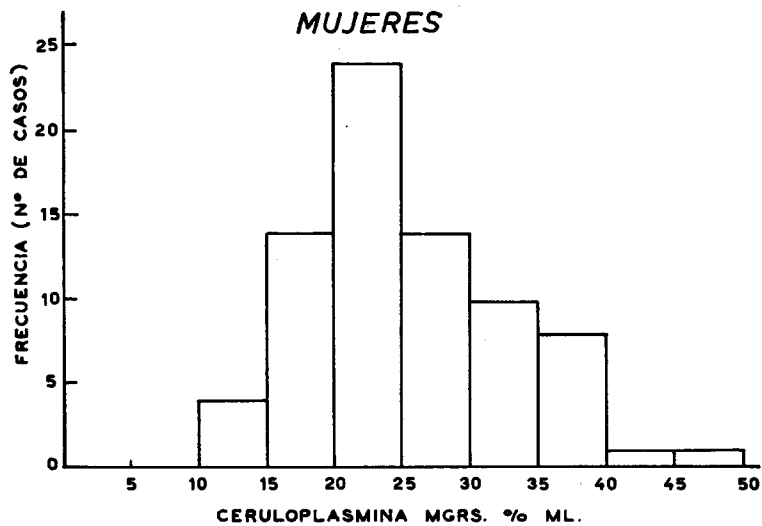
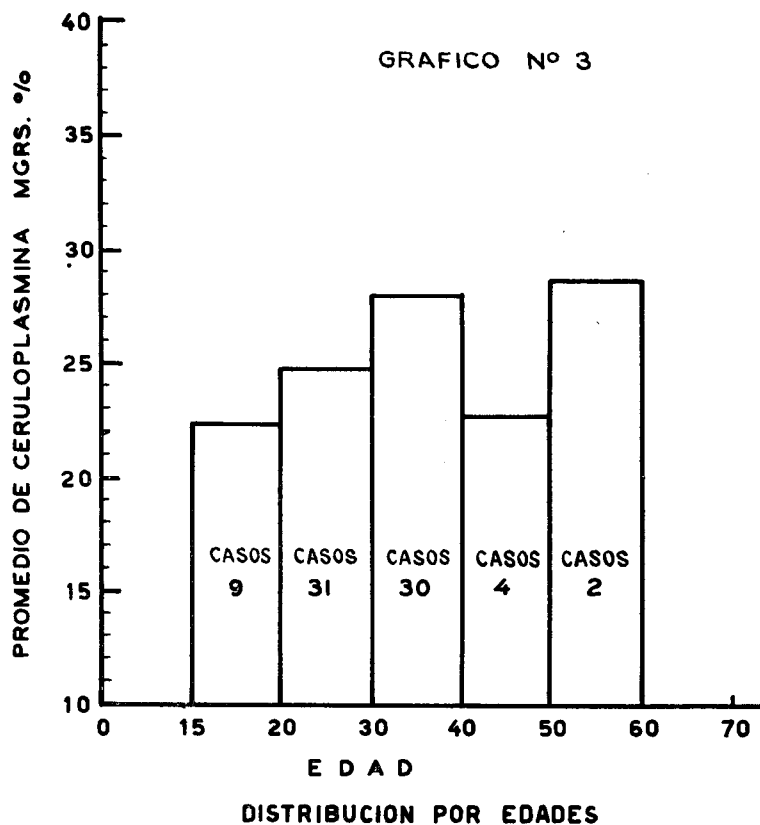


GRAFICO N° 2

MUJERES





CONCLUSIONES

1. Las cifras de céruloplasmina sérica, en adultos en nuestro medio, pueden ser consideradas normales si están entre 11.1 y 42.9 mgrs. %.
2. En las zonas límites de la normalidad, puede tener cierta importancia la diferencia de sexo. Cifras ligeramente inferiores a la mínima normal, serán más patológicas para una mujer que para un hombre. Cifras ligeramente superiores a la máxima normal, serán más patológicas para un hombre que para una mujer.

RESUMEN

- 1—Se hacen consideraciones sobre la céruloplasmina y su relación con diferentes enfermedades: Enfermedad de Wilson, Esquizofrenia, Síndrome Nefrótico.
- 2—Se determinó la cifra de céruloplasmina sérica en 115 adultos normales (76 hombres y 39 mujeres).
- 3—En nuestros casos femeninos, tanto la cifra límite inferior nor-

mal como la superior, son más elevadas que las referidas por otros autores.

- 4—En nuestros casos masculinos, la cifra límite normal inferior es más baja, y la superior más alta, que las referidas por otros autores.

C I T A S B I B L I O G R Á F I C A S

1. Holmberg, C. G.; and Laurell, C. "Investigations in serum copper II Isolation of the copper containing proteins and a description of some of its properties". Act. Chem. Scandinav. (1948). 2.550.
2. Holmberg, C. G.; and Laurell, C. "Oxidase Reaction in Human plasma caused by Ceruloplasmin". Act. Chem. Scandinav. (1950).
3. Holmberg, C. G.; and Laurell, C. Act. Chem. Scandinav. (1949).
4. Scheinberg, I. H.; and Morell, A. G. (1957). J. Clin. Invest. 36. 1193.
5. Cumings, J. N. (1959). "Heavy Metals and the Brain". Oxford: Blackwell Scientific Publications, Ltd.
6. Cartwright, G. E.; Markowitz, H. and Wintrobe, M. "Studies on Copper Metabolism XXIX. A Critical Analysis of serum copper and Ceruloplasmin Concentrations in normal subjects, patients with Wilson's Disease and relatives of patients with Wilson's Disease". Amer. J. Med. 28: 55-563. (1960).
7. Markowitz, H.; Gubler, C. J.; Mahoney, J. P.; Cartwright, G. E.; and Wintrobe, M. "Studies on copper Metabolism XIV. Copper, Ceruloplasmin and Oxidase activity in sera of normal human subjects, pregnant women, and patients with infection, hepatolenticular degeneration and the nephrotic syndrome". J. Clin. Invest., 34: 400. (1954).
8. Maytum, W.; Goldstein, N.; Mc Guckim, W. "Copper Metabolism in Wilson's Disease, Laennec's Cirrhosis and Hemachromatosis: Studies with Radiocopper (Cu 64) Proceeding of the Staff Meeting of the Mayo Clin.". Vol. 36. Vol. 25. (1961).
9. Bearn, A. G.; and Kunkel, H. G. "Localization of Cu 64 in serum fractions following oral administration: An alteration in Wilson's Disease". Proc.: Soc. Exper. Biol. and Med. 85: 44-48 (Jan) 1954.
10. Glazebrook, A. J. "Wilson's Disease". Edinburg, M. J.; 52: 83-87. (Feb) 1945.
11. Uzman, L.; Iber, F.; Chalmers, T. "The Mechanism of Copper deposition in the liver in Hepatolenticular Degeneration (Wilson's Disease)". Amer. J. Med. Sc. 231: 511-518 (May) 1956.
12. Bearn, A. G.; "Genetical Analysis of thirty families with Wilson's Disease". Ann. Human Genet. 24: 33-43 (Apr) 1960.
13. Sass-Kortsak, Andrew. "Observations on Ceruloplasmin in Wilson's Disease". J. Clin. Invest. 38: 1672-1682 (Oct) 1959.
14. Uriel, J.; and Gotz, H. and Grabar, R. "Etude de la céruloplasmine du sérum humain par l'electrophorèse en gélose et l'analyse immuneoléctrophorétique. Microdétection colorimétrique du cuivre lié aux protéines. Schweiz. Med. 87: 431-434 (Apr 7) 1957.

15. Akerfeldt, S. "Blood Test in Mental Illnes, presented at the Annual Mind Scientific Conference of the Brain Research Fundations". Chicago 1957.
 16. Backwin, R. M. "Ceruloplasmin activity and copper levels in serum of children with schisophrenia". J. Amer. Med. Wom. Ass. (July) 1961.
-

PUBLICACIÓN
SUBVENCIONADA
P O R
DISPOSICIÓN
D E L
CONSEJO
UNIVERSITARIO
DE LA
UNIVERSIDAD
D E L
Z U L I A



