



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

RELACION DEL COBRE SERICO Y LA CERULOPLASMINA

312

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :
EPIFANIA RUIZ COSTES

MEXICO, D. F.

1974



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CLAS Tesi
AÑO 1977
FECHA Hic 288

PRESIDENTE Prof.: GUADALUPE VELEZ PRATT
VOCAL " : DEA CORONADO PERDOMO
JURADO SECRETARIO " : MA. ELENA BUSTAMANTE CALVILLO
1er. SUPLENTE" : ELVIRA BETANCOURT JIMENEZ
2do. SUPLENTE" : GPE. LETICIA CARRASCO RIVERA

Sitio donde se desarrolló el tema: HOSPITAL DEL NIÑO I.M.A.N.

Nombre del Sustentante: EPIFANIA RUIZ COSTES

Nombre del Asesor del tema: Q.F.B. DEA CORONADO PERDOMO

C O N T E N I D O

	Pág.
CAPITULO 1.- INTRODUCCION.....	1
CAPITULO 2.- GENERALIDADES.....	3
CAPITULO 3.- MATERIAL Y METODOS.....	20
CAPITULO 4.- RESULTADOS.....	39
CAPITULO 5.- DISCUSION.....	68
CAPITULO 6.- RESUMEN.....	73
CAPITULO 7.- CONCLUSIONES.....	76
CAPITULO 8.- BIBLIOGRAFIA.....	78

I N T R O **D** U C C I O N

A MIS PADRES:

Sr. MANUEL RUIZ SEYMOUR.

SRA. BLANCA COSTES DE RUIZ.

Con veneración, respeto y gratitud.

A MI HIJO:

Con todo mi amor.

A PABLO:

Con Amor.

A MIS HERMANOS:

César, Rolando y Manuel.

Con Cariño.

A MI ASESOR:

Q.F.B. Dea Coronado Perdomo

Con agradecimiento y aprecio, por
la gran ayuda que me brindó y sus
valiosos consejos.

AL DR. Carlos Ortíz y Méndez
Jefe del Laboratorio de Bio-
química del Hospital del Ni-
ño I.M.A.N., por su valiosa
colaboración en el desarrollo
de esta Tesis.

AL HOSPITAL DEL NIÑO I.M.A.N., por haberme permitido
la realización de este trabajo.

AL HONORABLE JURADO EXAMINADOR

Recientemente, se ha establecido (1) que el - cobre juega un papel importante en la Bioquímica de la materia viva, ya que es uno de los constituyentes principales de muchas enzimas, como es el caso de la ceruloplasmina, que contiene el 98 % del cobre sérico en el humano, -- Del contenido total de cobre en el organismo humano, casi toda está incorporada en proteínas y una pequeñísima parte está asociado al RNA del hígado. La principal función del cobre, es actuar como un agente catalítico en el metabolismo. Los factores que afectan su concentración en los tejidos (6) son: la dieta, la edad, las hormonas, el embarazo y algunas alteraciones patológicas.

La ceruloplasmina es una proteína con una movilidad electroforética de alfa 2 globulina. Contiene 8-átomos de cobre por molécula ó 032 mg % y tiene un peso -- molecular de 151,000. El contenido de esta enzima, es -- constante en un individuo sano (2), y en el caso de una deficiencia de cobre existe decremento de ella.

Holmberg y Laurell (3), han encontrado que la ceruloplasmina, es de gran importancia en el almacenamiento y transporte de cobre en el caso de animales superiores. A esta proteína corresponde el 3 % de la totalidad del cobre del organismo (3).

Debido a la importancia dada en la actualidad, tanto al cobre como a la ceruloplasmina como anotamos en - párrafos anteriores y siendo poco estudiados, nuestro estudio tiene como objetivos principales:

- a).- Establecer la correlación existente en - tre el cobre sérico y la ceruloplasmina, por los métodos de Batocuproinato para -

cobre y de para-fenilendiamina (PPD) para ceruloplasmina.

- b).- Establecer los parámetros de sensibilidad, recuperación, desviación estándar, confiabilidad y reproducibilidad del método de Batocuproinato para la determinación de cobre y del (PPD) para ceruloplasmina.
- c).- Estudiar una población de la Ciudad de México, para determinar el rango de valores normales de cobre y ceruloplasmina.
- d).- Determinar la relación y alteración de estas pruebas en: hipoproteïnemia y hepatitis.

GENERALIDADES

C O B R E

El cobre se identificó hace 140 años y fué -- considerado como un contaminante; sus sales fueron empleadas en la antigüedad en la terapia de enfermedades de los ojos (3). El cobre inactiva algunas enzimas al reaccionar con sus grupos sulfhidrilo, por lo cual, es tóxico en exceso.

Este pertenece a la familia de elementos llamada " SERIE DE TRANSICION " (3) y existe en 3 estados: - libre, átomo neutro y como ión cuproso ó cúprico (3). Además tiene 3 características químicas, que son muy importantes para los procesos metabólicos: en primer lugar, los iones de cobre reaccionan con aminoácidos o proteínas, más fuertemente que otros iones metálicos y por lo tanto forma quelatos de mayor estabilidad. En segundo lugar, el cobre es un agente catalítico excepcionalmente activo y tercero, la flexibilidad de sus estados de ionización (3).

Los compuestos que contienen cobre iónico, adquieren una gran capacidad de oxidación-reducción, actuando como catalizadores de este tipo de reacciones.

La citocromo-oxidasa es una cuproproteína que se encuentra en las mitocondrias, donde tiene un papel central en la cadena del transporte de electrones (3). La tirosinasa, otra cuproproteína, es la que controla la pigmentación de la piel del hombre; se localiza en los melanosomas citoplásmicos o gránulos pigmentados del melanocito (3). La única porfirina de cobre, es un pigmento rojo brillante llamado turacina, que se ha descubierto en las alas del touraco (pájaro africano). Caracoles y pulpos (moluscos), cangrejos y escorpiones (artrópodos), son los únicos

animales con sangre azul, debido a que tienen una cuproproteína en la sangre, que es la transportadora de oxígeno, - llamada hemocianina (2).

Los requerimientos de cobre en el humano adulto, son de 2mg/día y en el niño de 0.05 mg/Kg de peso/día. La concentración de cobre de todo el cuerpo en un recién - nacido, es tres veces mayor que la de los adultos (7), pero el cobre sérico, es más bajo en aquél que en los adultos, debido al bajo contenido de ceruloplasmina en el plasma.

En las mujeres embarazadas y en los fetos, se ha encontrado hipercupremia e hipocupremia respectivamente, causadas por un aumento o disminución de la ceruloplasmina en el suero (12).

La distribución de cobre (7) en el humano -- adulto, es de un total de 100- 150 mg; se encuentra en mayor proporción en el hígado, decreciendo en riñón, corazón, cerebro, páncreas, tracto intestinal, pulmón, bazo, músculo, piel, glándulas adrenales, hueso y sangre.

Las concentraciones más altas de cobre, están en la carne y luego le siguen las frutas y vegetales. La leche humana, contiene 10-70 ug Cu/100 ml y la de vaca -- 5-400 ug Cu/100 ml (3).

Las dietas animales, ya sean altas o bajas en cobre, causan los correspondientes cambios en su concentración en la sangre y órganos. Los tejidos más sensibles - del hombre a la radiación, son los que tienen menor contenido de cobre: bazo y páncreas (3). Una deficiencia de cobre sérico en animales, hace que se reduzca la síntesis de hemoglobina y aparecen síntomas de anemia. También se ha

reportado, que al fraccionar células de hígado de ratas -- (7), existe una alta concentración de cobre en las mitocondrias y en las proteínas solubles del sobrenadante claro (ribosomal). Existe una concentración menor en la fracción nuclear y microsomal. La mayor parte del cobre, aparece como no dializable. Cuando se inyecta sulfato de cobre, aumenta su contenido en el núcleo y mitocondrias. Después de una hipofisectomía, hay un aumento en la concentración en el núcleo, mitocondrias, microsomas y sobrenadante. Las hormonas del crecimiento, tienden a neutralizar este efecto.

Cuando se inyecta una solución de cobre al humano, se combina primero con la albúmina del suero, en el flujo sanguíneo, y luego es absorbido rápidamente por el hígado, reapareciendo en el suero en forma de ceruloplasmina (3). La principal fuente del cobre urinario, es por la unión albúmina-cobre.

La bilis, es la vía de excreción normal, -- 35-205 ug/100ml. En orina se excretan de 4-30 ug/día y en el flujo menstrual 20ug/día. Además, se ha comprobado que el cobre se absorbe en la parte más alta del tracto alimenticio, y, que los complejos neutros o aniónicos orgánicos, se absorben más rápidamente que los de tipo iónico, dados como sulfatos (3).

En la enfermedad de Wilson (5), los niveles séricos de ceruloplasmina están muy por abajo de lo normal, por lo que el cobre se acumula dentro de los tejidos. Se ha usado como droga a la penicilamina, para atrapar al cobre de los tejidos. El padecimiento, generalmente empieza durante la adolescencia y se hereda de una manera recesiva autosomal. También hay desorganización de la región

lenticular del cerebro, signos de cirrosis hepática y aparece un anillo café o gris verdoso en el borde de la córnea, debido a los acúmulos de cobre, depositados en estos órganos. Existe también en esta enfermedad, aminoaciduria, glucosuria, uricosuria, fosfaturia, polipeptiduria, - cuprouria elevada, proteinemia, fosfatemia, hipouricemia, e hipocupremia.

Un número de métodos histoquímicos, no han -- funcionado, para encontrar cobre en tejidos normales, pero el método del ácido rubeánico, ha sido aplicado al cerebro, hígado y córnea en la enfermedad de Wilson. En el cerebro, el cobre se localiza en las células nerviosas; en el hígado en las células parenquimatosas y en la córnea está en la sustancia propia, lo mismo que en la membrana de Descemet.

En la figura No. 1, se muestran los principales pasos metabólicos del cobre, relacionados con la ceruloplasmina, y que son controlados por el sistema neuroendócrino. Casi cerca del 25 % el cobre ingerido, se absorbe a través de la parte más alta del intestino delgado, el cual, primero aparece en el plasma como ión cúprico, excretándose unido a la albúmina. Dentro de las dos primeras horas de su ingestión, el aumento inicial del cobre total en el plasma, es seguido por una caída violenta y luego un aumento secundario, el cual continúa por 3 días; el movimiento posterior, es debido a la presencia del cobre en la ceruloplasmina. Durante el aumento inicial y la caída en el plasma, hay una continua incorporación de cobre por las células del hígado, donde se piensa, se llega a unir a una cuproproteína (L-6D), que se encuentra en la fracción del sobrenadante de células de hígado centrifugadas, y así más tarde, utilizarlo principalmente en la síntesis de cerulo-

LOS PROBABLES PRINCIPALES PASOS METABOLICOS DE COBRE EN RELACION A LA CERULOPLASMINA

RELACIONES DE CERULOPLASMINA CON EL METABOLISMO DEL COBRE

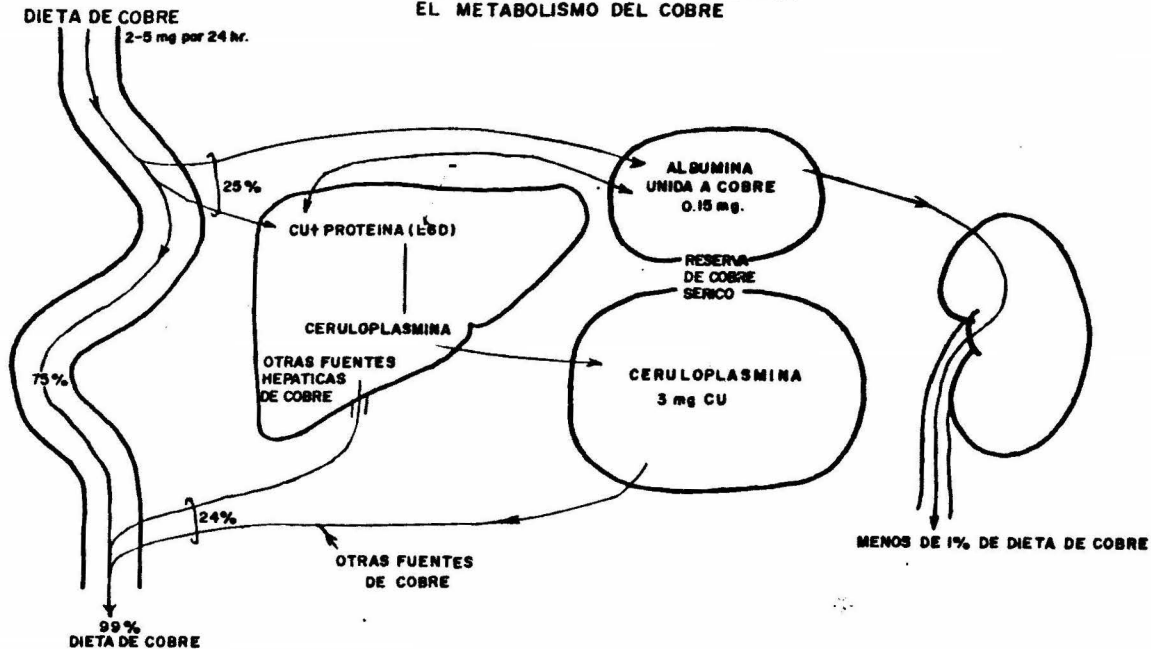


FIG. 1

plasmina en las microsomas, y ser descargado a una velocidad uniforme dentro de la circulación; el cobre, entra a la molécula de ceruloplasmina, solamente al tiempo de la síntesis y permanece incorporado hasta la destrucción metabólica de la molécula.

La excreción de cobre y sus productos de destrucción metabólica, son a través del tracto biliar y gastrointestinal, por lo que aparentemente esta enzima, no funciona como un mecanismo de transporte del cobre, excepto quizás para conducirlo del hígado a algún sitio para que salga, ya sea hacia la bilis o al tracto gastrointestinal (18).

La vida media biológica, relativamente corta de esta proteína (valores de 100-130 hrs. y 8-10 días), y el hecho de que una cantidad de cobre casi igual al ingerido, aparece en las heces, (se absorbe cerca del 25 %) hace que se sostenga la acción transportadora de la ceruloplasmina (18).

CERULOPLASMINA

Esta enzima, fué aislada por primera vez en 1948, por Holmberg y Laurell (9).. Es una proteína azul (el cobre o los átomos de éste en el estado cúprico, proporcionan este color) (12). Una molécula contiene 8 átomos de cobre, unidos irreversiblemente in vivo (18); su proteína total es del 0.03% y se forma en el hígado (9). Una pequeña cantidad está en el hígado y riñón, lo demás en el plasma. El sistema nervioso central, bazo, bilis y homatíes no la contienen (12). El cobre de la ceruloplasmina, normalmente no se filtra a través del riñón (18), pero la enzima es excretada en la orina después de un esfuerzo físico.

Se han aislado 2 principales componentes de la ceruloplasmina, una fracción "C", que comprende el 80 %, con peso molecular de 148,000 y una fracción "D", que comprende el 20 %, con peso molecular de 125,000 ésta última, está compuesta al menos de 3 sub-fracciones (18). Estas fracciones, contienen diferentes cantidades de cobre y hexosa. Han sido demostradas 4 especies moleculares, por separación cromatográfica y electroforética; dos de ellas, difieren por un residuo de aminoácidos (18). La apoceruloplasmina contribuye del 10-20 % de la ceruloplasmina.

La ceruloplasmina muestra actividad oxidásica in vitro hacia muchas aminas incluyendo epinefrina, 5-hidroxi triptamina y dihidroxi fenilalanina (10). Esta actividad oxidásica, está asociada con un cambio de valencia--cíclica entre el estado cúprico y el cuproso, en la mitad de los 4 átomos de cobre en la molécula (10). Los restantes 4 átomos, se cree que permanecen en estado cuproso (estos, parece que juegan un papel en la unión con el sustrato). Cuando la enzima está en el estado cuproso, los 4 átomos de cobre que están intercambiando sus valencias, están muy juntos. Los átomos de cobre se encuentran en una fisura de la proteína. Esta es débilmente activa con sus stratos biológicos en concentraciones fisiológicas, y no se le han demostrado funciones oxidativas in vivo (18).

Se ha demostrado recientemente, que la ceruloplasmina no sólo sirve como reservorio de cobre, sino que también actúa como catalizador en la oxidación de histamina, adrenalina, noradrenalina, serotonina, ácido ascórbico y glutatión. Curzón (17), reportó, que esta proteína, -- puede catalizar la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} (forma oxidante), y shigemasa y colaboradores lo confirmaron, por lo cual se le ha llamado también, con el nombre de Ferroxidasa. Estos mismos científicos, encontraron, que sin la -- ayuda de ella, los animales no sintetizan la transferrina lo suficientemente rápido, para suplir al fierro requerido para la formación de hemoglobina y otras proteínas, conte-

niendo fierro (3). También se ha demostrado que no atraviesa la placenta, y que su concentración en suero, está relacionada a la habilidad del hígado para sintetizar la proteína. Como la albúmina, se piensa también, que esta proteína se sintetiza en el hígado, lo cuál supondría una relación entre albúmina y ceruloplasmina, pero no se ha encontrado (14). Esta proteína en el suero del cordón umbilical, es la mitad del valor encontrado en sujetos humanos normales, y aproximadamente, sólo un tercio del valor en la mujer al final del embarazo (12). Los niños, tienen disminuída la capacidad para sintetizar esta enzima o para liberar la proteína sintetizada dentro de la sangre (8); pero al primer año de vida, alcanzan el nivel de los adultos (7).

Shimizu y colaboradores (3), han reportado -- que la inyección de ceruloplasmina, es efectiva, en el tratamiento de ciertos tipos de anemias.

Los estrógenos y andrógenos, aumentan su concentración, también la de cobre.

LA CERULOPLASMINA Y COBRE EN DIFERENTES ESTADOS PATOLOGICOS

En las enfermedades de Wilson y Kwashiorkor, los niveles de ceruloplasmina y cobre sérico están bajos (8). En las disproteinemias de la infancia y síndrome nefrótico (7), la ceruloplasmina además de estar disminuída, se excreta en concentraciones altas por la orina (único caso). En el infarto del miocardio y artritis, la ceruloplasmina y cobre sérico están elevados. En la cirrosis -

niendo fierro (3). También se ha demostrado que no atraviesa la placenta, y que su concentración en suero, está relacionada a la habilidad del hígado para sintetizar la proteína. Como la albúmina, se piensa también, que esta proteína se sintetiza en el hígado, lo cuál supondría una relación entre albúmina y ceruloplasmina, pero no se ha encontrado (14). Esta proteína en el suero del cordón umbilical, es la mitad del valor encontrado en sujetos humanos normales, y aproximadamente, sólo un tercio del valor en la mujer al final del embarazo (12). Los niños, tienen disminuída la capacidad para sintetizar esta enzima o para liberar la proteína sintetizada dentro de la sangre (8); pero al primer año de vida, alcanzan el nivel de los adultos (7).

Shimizu y colaboradores (3), han reportado -- que la inyección de ceruloplasmina, es efectiva, en el tratamiento de ciertos tipos de anemias.

Los estrógenos y andrógenos, aumentan su concentración, también la de cobre.

LA CERULOPLASMINA Y COBRE EN DIFERENTES ESTADOS PATOLOGICOS

En las enfermedades de Wilson y Kwashiorkor, los niveles de ceruloplasmina y cobre sérico están bajos (8). En las disproteinemias de la infancia y síndrome nefrótico (7), la ceruloplasmina además de estar disminuída, se excreta en concentraciones altas por la orina (único caso). En el infarto del miocardio y artritis, la ceruloplasmina y cobre sérico están elevados. En la cirrosis -

portal, sucede lo anterior pero a nivel hepático (5). En la glomerulonefritis, anemia, embarazo, tirotoxicosis y -- por administración de triyodotironina (en enfermedades mentales), el cobre sérico está elevado.

Los fármacos antitiroideos, bajan la concen-- tración de cobre en la sangre, por lo que la tiróxina apre-- sura el proceso para volver a la normalidad; ésto sugiere-- que el nivel de hormonas tiroideas, regulan la concentra-- ción sanguínea en algún grado (3).

En hepatitis viral, los niveles séricos de ce-- ruloplasmina, a veces aparecen bajos y regresan a la normali-- dad cuando el cuadro clínico también lo hace; los reportes de esta proteína en hepatitis viral, son escasos y contra-- dictorios.

HEPATITIS VIRAL EN SU FORMA PURA.- Es de - poco valor diagnóstico la determinación de ceruloplasmina. Los valores más altos, ocurren durante la primera semana-- después del comienzo de la ictericia; en las siguientes -- dos semanas, se presenta un decremento gradual en los valo-- res de ella; a la cuarta semana, retornan a la normalidad. Durante la primera, segunda y tercera semanas de ictericia, el aumento en la ceruloplasmina es estadísticamente signi-- ficativo, si se compara con los valores de individuos sa-- nos. Los valores de ceruloplasmina, aumentan conjuntamen-- te con la T.G.O.; los valores elevados, indican una reac-- ción del organismo a la inflamación, necrosis o tumores ma-- lignos. En coma hepático decrece esta proteína, debido a-- la hepatitis epidémica.

La diferencia entre niveles de cobre y cerulo

plasmina, es significativa, con excepción de los valores - observados durante la primera y quinta semanas de ictericia, parece ser, que el cobre sérico no corre paralelamente con ésta enzima, durante todo el tiempo de la enfermedad (10).

HEPATITIS VIRAL CON COMPLICACIONES.- Los niveles de ceruloplasmina son muy altos, y permanecen así -- por un largo período en complicaciones como diabetes, tuberculosis y embarazo. En hepatitis complicada con tuberculosis, los valores son parecidos a los encontrados en la hepatitis en su forma pura. (10).

Las enfermedades hepáticas severas, ya sean-- agudas o crónicas, pueden estar asociadas, con una caída, - en el nivel de la concentración de ceruloplasmina, con el rango encontrado en la enfermedad de Wilson (por abajo de 15 mg/100ml); debiéndose quizás, a las fallas de las funciones de síntesis del hígado. Parece como que la habilidad del hígado, para sintetizar proteínas, fuera severamente afectada, antes que la de ceruloplasmina (15).

Una carencia de aminoácidos para la síntesis de proteínas, parece influenciar el nivel de ceruloplasmina como en el Kwashiorkor; en estados de malabsorción, por la baja absorción del cobre, siendo la causa principal, de la reducción de los valores de ceruloplasmina, y retorna a la normalidad, cuando se inyecta Cu_{64} intravenosamente (18).

Aparte de la capacidad del hígado para sintetizar proteínas, es obvio que intervienen otros factores, - en la regulación, de los niveles de ceruloplasmina. Esto, se ilustra con el hecho, de que pacientes con cirrosis severa, pueden presentar valores normales o anormales (altos o bajos) (18).

En la ausencia de embarazo o estímulo estrogénico, la elevación de niveles de esta proteína (65mg/100ml), usualmente indica una enfermedad hepática. En el caso, - de no existir padecimiento hepático marcado, y en individuos que son heterocigotos para el gene de la enfermedad - de Wilson, la enzima está disminuida (18).

ICTERICIA OBSTRUCTIVA.- La ceruloplasmina-- muestra un aumento (0.68 ± 0.19), bastante significativo, en comparación con personas sanas (13).

Existe una correlación estadísticamente significativa, entre los valores de cobre y los de ceruloplasmina (P mayor de 0.001). Hay niveles más altos de cobre y ceruloplasmina, en ictericia obstructiva, que en hepatitis viral (13). Estos, dependen del estado de la severidad de la hepatitis, y son de utilidad, para diferenciar estos procesos patológicos. No podemos distinguir entre hepatitis viral e ictericia obstructiva, exclusivamente por los niveles de ceruloplasmina.

Hay un aumento de la enzima, en cirrosis biliar primaria y secundaria y así como en obstrucción de conductos biliares, lo cuál puede considerarse como una reacción general del organismo a una inflamación o tumor (18).

RECIENTE NACIDO.- Los valores encontrados de esta proteína en el recién nacido, no muestran dependencia del peso, ni de la estatura del niño, ni de la duración de su vida fetal (12). El valor bajo en la sangre fetal, parece ser el resultado de una capacidad disminuida, o de un hígado funcional y morfológicamente inmaduro para sintetizar el apófermento de la enzima. (12).

Los niveles de cobre y ceruloplasmina del niño, nacido de madre desnutrida, son menores que en el recién nacido de madre bien alimentada. El hígado de niños de poco peso, al nacimiento tienen reducida la capacidad de síntesis de proteínas (14).

En niños con estados avanzados de desnutrición, las actividades de ceruloplasmina y alfa 2 globulinas, están disminuídas. Esta proteína junto con otras globulinas, aumentan durante el embarazo al igual que el cobre. El aumento asociado con el embarazo, no se modifica por el estado nutricional de la madre. La baja actividad, observada en infantes de madres desnutridas, debe ser un reflejo de la baja capacidad del hígado fetal, para sintetizar ceruloplasmina, y ésto refleja también, que el estado funcional del hígado, está sostenido por el alto grado de correlación entre la actividad ceruloplasmínica y los niveles de albúmina (14).

METODOLOGIA

CERULOPLASMINA:

En general, los métodos que utilizan la para-fenilendiamina (PPD), para medir la ceruloplasmina, son -- más sensibles que el usado por el cambio de absorbancia a 610 nm., antes y después de decolorar con ácido ascórbico o cianuro, y más precisos que midiendo la enzima por inmunodifusión o por oxidación enzimática de fierro. Los diferentes métodos que utilizan PPD, difieren considerablemente en las condiciones de reacción (10).

La reacción de PPD-oxidasas, está sujeta a una fase LAG (crecimiento), debido a la oxidación del ácido ascórbico del suero; para evitar esta fuente de error, el tiempo de la reacción es retrasado hasta después de la fase LAG, que dura más o menos un minuto (10).

La longitud de onda óptima, es de 530 nm. El pH óptimo es de 5.45 en humanos y de 5.2, para ceruloplasmina en ratas (10). A pH 5.4, la ceruloplasmina cataliza la oxidación de PPD, para dar un producto colorido, el -- cuál, se cree corresponde a la Base de Bandrowski o a Wuerster's red. La velocidad de formación del producto colorido de oxidación, es proporcional, a la concentración de la ceruloplasmina (10).

Los fosfatos, a concentraciones de 0.1 mol/l, inhiben ligeramente a la ceruloplasmina humana, en cambio a la de rata, la inhiben totalmente (10). La azida de so dio, inhibe la oxidación enzimática del PPD y es el inhibi dor más fuerte de ésta enzima (ceruloplasmina humana); en esta inhibición, existe reversibilidad (Curzon 1966). El

ión cloruro del PPD, causa inhibición de la reacción de PPD-oxidasa (10).

El oxígeno atmosférico, no afecta la oxidación enzimática del PPD.

El radical libre colorido DPD^+ , es el que oxida la ceruloplasmina. La penicilamina, destruye este radical y el dietilcarbamato lo decolora rápidamente (17).

En 1956, fué reportado un método colorimétrico para ceruloplasmina, basado en la oxidación enzimática del PPD, como una prueba práctica en el diagnóstico temprano de la Degeneración Hepatolenticular, en la cuál, una profunda deficiencia de esta metaloproteína es altamente específica. Esta prueba, no fué lo suficientemente precisa, para permitir la aplicación de observaciones seridas, de alteraciones menos marcadas en la actividad ceruloplasmínica (2).

Se ha descrito otro método que usa N,N' dimetil PPD o bencidina, en conjunto con concentraciones mayores de suero en la reacción. La bencidina, no es muy sensible como sustrato para ceruloplasmina, ya que requiere de 12-24 hrs. de incubación, para que pueda leerse espectrofotométricamente.

La introducción de sustratos endógenos como ácido ascórbico (en el suero), interfiere, ya que compete con la oxidación del PPD (2).

Se ha notado, que el suero de varios animales, presentan fuertes reacciones con el anticuerpo del conejo contra la ceruloplasmina humana (16).

La ceruloplasmina del Rhesus, aparentemente, posee la mayoría de los determinantes antigénicos de la proteína humana (14).

La reacción cruzada de Ouchterlony, indica -- que el conejo ha formado cuatro diferentes anticuerpos a la ceruloplasmina humana. Esta es antigénicamente compleja (14).

La apoceruloplasmina, forma dos diferentes -- bandas de precipitación y la proteína nativa, forma sólo una. Uno de los precipitógenos de la apoproteína, es inmunológicamente similar, al componente formado de la ceruloplasmina, en el tratamiento con ascorbato y mercaptanos- (16).

COBRE:

En 1940, Eden y Green, introdujeron un método para la determinación de cobre, utilizando el dietilcarbamatato. Es un método, de carbonización húmeda del material problema (5).

En 1956, Gran introdujo la oxalildihidrazida como un reactivo sensible para la microdeterminación espectrofotométrica de cobre en papel, y Stark y Dawson, la -- aplicaron a la determinación, en preparaciones purificadas de oxidasa del cobre (ceruloplasmina) (6). Más tarde, en 1960, Eugen Rice, comparó los métodos de Batocuproinato y Oxalildihidrazida para determinación del cobre (4), y reportó que el segundo método, sólo sirve para determinaciones de cobre sérico, en cambio el de Batocuproinato, puede utilizar suero, plasma, orina y sangre total y es además, --

micrométodo más preciso, confiable, fácil de realizar y ba rato.

Después de lo expuesto anteriormente, se ve que las determinaciones de cobre y ceruloplasmina, son de utilidad clínica, ya que sus niveles y la relación entre ellos, sirven de guía en el diagnóstico de diversas enfermedades, aunque hasta ahora, sólo se han utilizado como -- diagnóstico en la enfermedad de Wilson.

MATERIAL Y METODOS

El material biológico obtenido en nuestro trabajo, fué suero sanguíneo, tomado en condiciones basales - de 287 niños, pertenecientes al Hospital del Niño I.M.A.N.

El suero estuvo libre de hemólisis y precesado a los 60 minutos después de haber sido obtenido.

Se dividió el trabajo en seis puntos:

- 1.- Obtener el análisis de sensibilidad reproducibilidad, desviación estándar, recuperación, espectro de absorción y confiabilidad del método de Batocuproinato para la determinación del cobre, utilizando -- una solución patrón y un suero tomado al azar.
- 2.- Se estudiaron las características cinéticas del método de dihidrocloruro de para-fenilendiamina (PPD) para ceruloplasmina; pH óptimo, concentración óptima de sustrato, concentración óptima de azida, tiempo óptimo de incubación y concentración óptima de suero. Al mismo tiempo, se determinaron la reproducibilidad, recuperación, espectro de absorción y desviación estándar.
- 3.- Estudio de 287 muestras, en las que se determinaron cobre y ceruloplasmina para -- ver la correlación entre ellos.
- 4.- Estudio de 90 muestras de niños "clínicamente sanos", para establecer valores normales.

- 5.- Estudio comparativo de 60 casos, de los métodos, del PPD e inmunológico para ceruloplasmina, para determinar la confiabilidad de los métodos.
- 6.- Se estudiaron 23 sueros de niños con hepatitis y 70 sueros de niños con hipoproteí_nemia, con objeto de ver las variaciones de cobre y ceruloplasmina existente en estos padecimientos.

D E T E R M I N A C I O N D E C O B R E

B. Zack y J. W Landers.

(Método de Batocuproinato)

I.- FUNDAMENTO:

El cobre en el suero se separa de la cerulo--
plasmina y otras proteínas por hidrólisis ácida; ya despro
teinizado, es reducido con ácido ascórbico y determinado -
fotométricamente como un complejo colorido amarillo-café -
de Disulfonato de Batocuproína.

II.- MATERIAL BIOLÓGICO:

a) Suero humano.

III.- MATERIAL Y EQUIPO:

a) Tubos de vidrio de 8 x 75 mm.

b) Micropipetas Eppendorf de 10, 50, 100 y 200 ul.

c) Agitador mecánico.

d) Centrífuga.

e) Celdillas.

f) Espectrofotómetro: nosotros utilizamos el CARL ZEISS pM
4.

IV.- REACTIVOS:

- a) HCl 1.0 N.
- b) Acido tricloroacético 3 M.: Disolver 49g. y aforar a -- 100 ml con agua bidestilada.
- c) Solución de ácido ascórbico al 10 %
- d) Reactivo de color:- Disolver 30 mg. de disulfonato de - batocuproína disódica en 100 ml de solución de acetato- de sodio 3.3 M.
- e) Solución patrón de cobre.: Diluir al patrón comercial - de cobre con agua bidestilada a tener una concentración de 250 ug/100 ml.

V.- PROCEDIMIENTO:

- 1.- Pipetear 200 ul de suero y 200 ul de HCl en un tubo - para microprueba.
- 2.- Mezclar con vibrador y dejar reposar 30 minutos a temperatura ambiente.
- 3.- Añadir 50 ul de ácido tricloroacético.
- 4.- Mezclar, dejar reposar unos minutos y centrifugar.
- 5.- Pipetear en otro tubo de microprueba 200 ul del sobrenadante y 10 ul de ácido ascórbico.
- 6.- Mezclar y dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
- 7.- Añadir 100 ul del reactivo de color. Mezclar y leer en absorbancia después de 5 minutos o más a 420-440 nm, contra agua.

BLANCO.- 200 ul de agua bidestilada.

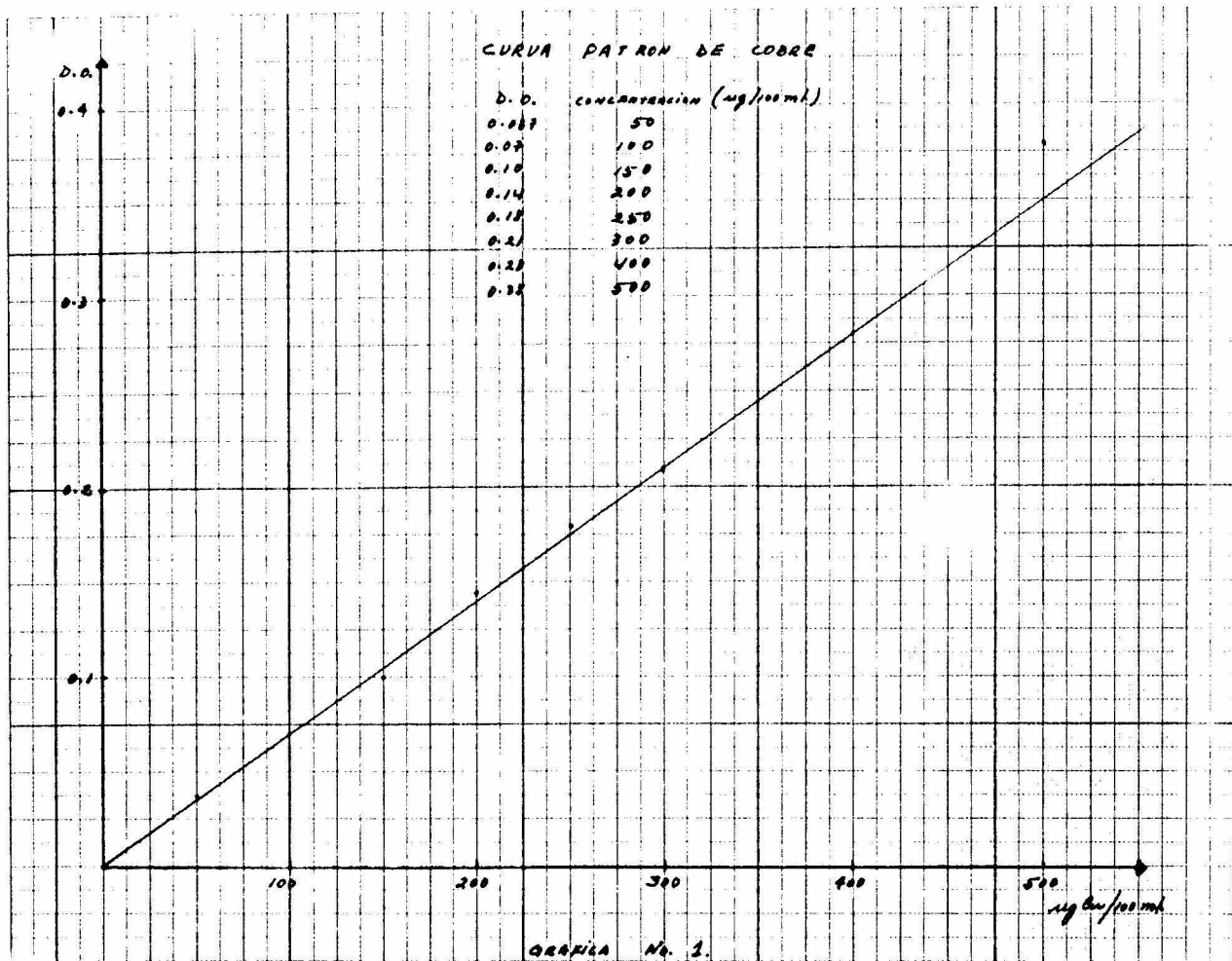
PATRON.- 200 ul de la solución patrón de cobre.

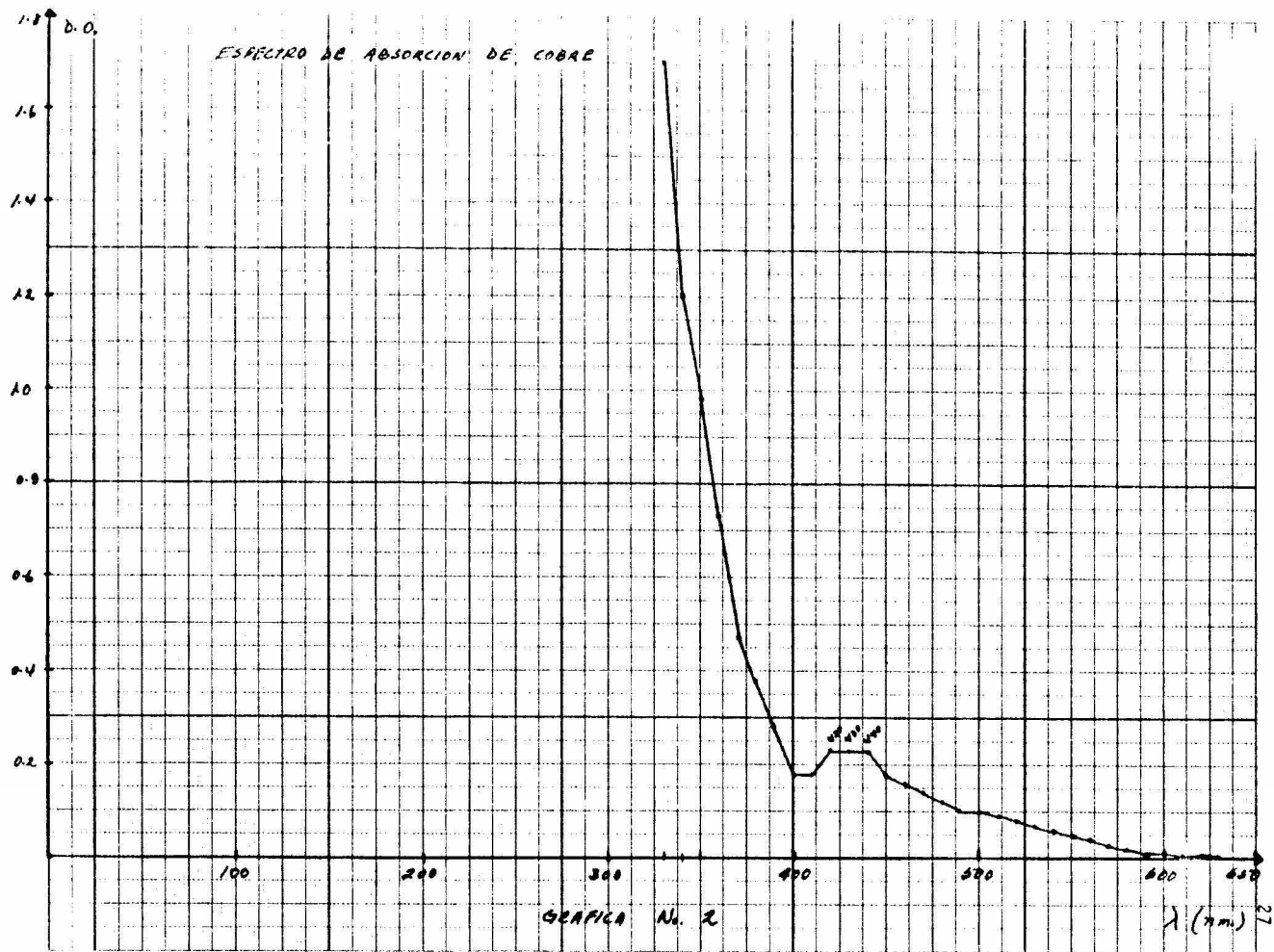
VI.- CALCULOS:

A muestra - A de blanco \times 250 ugCu/100 ml de suero

A patrón - A de blanco

VALORES NORMALES = 90-130ugCu/100 ml de suero.





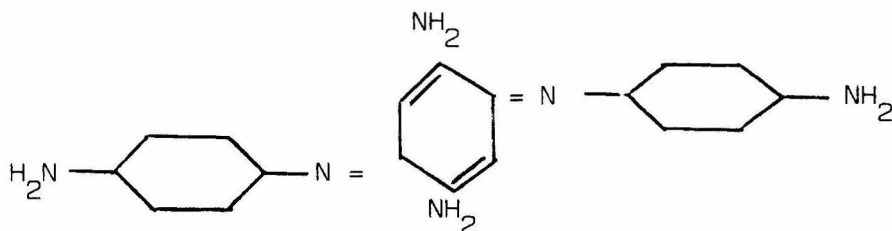
D E T E R M I N A C I O N D E C E R U L O P L A S M I N A

Herbert A. Ravin.

(Método de para-fenilendiamina ppD)

I.- FUNDAMENTO:

En presencia de la ceruloplasmina, el ppD es oxidado a un cromógeno violeta. Se ha demostrado, que el pigmento formado en el procedimiento de determinación del ppD para análisis de la ceruloplasmina, tiene un espectro de absorción idéntico al de la Base de Bandrowski, con un máximo de absorción a 530 nm. Así, la normalización de la actividad ceruloplasmínica en forma de unidades enzimáticas internacionales, es factible gracias al empleo de soluciones patrones de Base de Bandrowski. La Base de Bandrowski, se sintetiza disolviendo 10 g. de ppD (recristalizado en vez de su solución bencénica), en 750 ml. de agua -- que contenga 3ml de NH₄OH y, tratan o la solución con 125-ml de agua oxigenada al 3 %.



BASE DE BANDROWSKI

II.- MATERIAL BIOLÓGICO:

a) Suero humano no hemolizado ni hiperlipémico.

III.- MATERIAL Y EQUIPO:

a) Tubos de polietileno de 10 ml. o de vidrio siliconizados.

b) Pipetas graduadas de 5 y 10 ml.

c) Micropipeta Eppendorf de 50 μ l.

d) Baño María a 37°C con agitación.

e) Baño de hielo.

f) Celdillas.

g) Espectrofotómetro: el utilizado por nosotros fué el CARL ZEISS pM 4.

IV.- REACTIVOS:

a) Amotiguador de acetatos 0.4 M. pH 5.5 Ajustar con ácido acético glacial y guardar a 4°C. Pesar 54.436 g. acetato de sodio trihidratado, y disolver en 800 ml de agua desionizada, ajustar pH y diluir a un litro con agua desionizada.

b) Solución de azida de sodio al 0.5%.

c) Sustrato de dihidrocloruro de para-fenilendiamina (ppD).

Preparar una solución saturada (del reactivo sin recristalizar) en agua hirviendo y, añadir carbón activado para decolorar; filtrar mientras esté caliente y recristalizar del filtrado decolorado; secar los cristales y guardarlos en un desecador sobre sílica gel. Para su uso, preparar una solución fresca al 0.05 % en agua desionizada (modificación nuestra).

V.- PROCEDIMIENTO:

- a) Colocar 4000 ul (4 ml) de la solución amortiguadora, en tubos de polietileno o de vidrio siliconizados, marcado uno como problema y el otro como blanco.
- b). Poner 50 ul de suero en el tubo problema.
- c) Poner los tubos en un baño María a 37°C por 5 minutos - para equilibrar la temperatura.
- d) Añada 1000 ul (1 ml) de la solución de PPD precalentada a 37°C y recientemente hecha, a los 2 tubos. Mezclar e incubar 60 minutos a 37°C con agitación.
- e) Añadir 1000 ul (1 ml) de la solución de azida de sodio y mezclar.
- f) Añadir 50 ul de suero al tubo blanco.
- g) Poner los tubos en un baño de hielo por 30 minutos.
- h) Leer a 530 nm contra agua desionizada.

NOTA:

Los tubos tienen que ser de polietileno o de vidrio-siliconizados.

Debe hacerse un blanco para cada suero. Los tubos deben ponerse en el baño de hielo, inmediatamente -- después de salir del baño María y ya ahí agregarles la azida y el suero.

Los cristales purificados de PPD, son muy --- inestables, por éso se prefiere el PPD dihidrocloruro cristalino que es muy estable.

VI.- CALCULOS:

$A_p - A_b = \text{Unidades de Absorbancia (U.A.)}$

$\text{U.A.} \times 87.5 = \text{mg ceruloplasmina/100 ml de suero.}$

$D.O._{605 \text{ nm}} \times 4.585 \frac{\times 100}{0.32} = \text{mg de Ceruloplasmina/100 -}$
ml. de suero.

4.585 = relación entre concentración de cobre ceruloplasmí nico expresado en ug/100ml de una solución de enzi ma pura y la densidad óptica a 605nm de la enzima- activa, en una cubeta de un cm. de grosor. La -- constante 0.32 es la concentración de cobre en la- ceruloplasmina, expresada en porciento. El valor- medio de este factor de conversión, basado en 6 de terminaciones con 3 diferentes preparaciones de ce- ruloplasmina purificada, es 87.5 (2).

La densidad óptica neta, de la actividad oxidativa del PPD de 0.1 ml de suero en la prueba patrón por 87.5, expresa el resultado en mg%.

mg ceruloplasmina = Factor de conversión de densidad
 D. 0. = óptima en la prueba de PPD-oxidasa, a mg% de ceruloplasmina en suero, en la prueba patrón.
 530nm

ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE CERULOPLASMINA



GRAFICA No 3

λ (nm) 33

D E T E R M I N A C I O N D E C E R U L O P L A S M I N A

(Método Inmunológico de Hyland)

I.- FUNDAMENTO:

Al colocar el antígeno (suero problema), en el pozo de agua, éste contenido el anticuerpo (suero específico anticeruloplasmina humana), difunde dentro del agua y forma un anillo de precipitación.. El diámetro de este halo, está directamente relacionado a la concentración del antígeno que se está determinando (cantidad de ceruloplasmina en el suero problema).

II.- MATERIAL BIOLÓGICO:

- a) Sueros de referencia de 8.5, 23.5 y 54 mg/100 ml de suero.
- b) Suero humano.

III.- MATERIAL Y EQUIPO:

- a) Placas de inmunodifusión, conteniendo gel de agar, mezclado con amortiguador y suero específico anticeruloplasmina humana, la placa contiene 6 pozos).
- b) Pipetas capilares.
- c) Bulbos de hule.
- d) Visor con escala para medir los diámetros de los halos.

IV.- REACTIVOS:

- a) Gel de agar, mezclado con amortiguador y suero específico, anticerculoplasmina humana.

V.- PROCEDIMIENTO:

- a) Se abre la placa de agar. Si ésta contiene agua de evaporación, se deja destapada a temperatura ambiente de 15 a 20 minutos.
- b) Se llenan los pozos con los diferentes sueros problemas, con las pipetas capilares, tocando con la punta del capilar el fondo del pozo y dejando que el líquido caiga por gravedad a la superficie del agar.
- c) Se debe de correr un suero de referencia por placa.
- d) Se tapa la placa y se incuba a temperatura ambiente -- (20-25°C), de 16 a 18 hrs. en cámara húmeda.
- e) Después de la incubación, quitar la tapa y medir el diámetro de cada halo, poniendo la placa sin tapa bajo el visor. Se coloca el cero de la escala en un extremo, más o menos a mitad del círculo, y se lee hasta donde llegue el otro extremo del halo.
- f) El valor obtenido, se extrapola en la curva patrón. Si este valor se sale de la curva, se diluye el suero con solución salina y se corre nuevamente. Al leer se multiplica por el factor de dilución.

NOTA:

Si los halos no se pueden medir fácilmente, la placa se sumerge en ácido acético al 7.5% por 1-2 minutos, luego se pasa por agua fría y se lee inmediatamente.

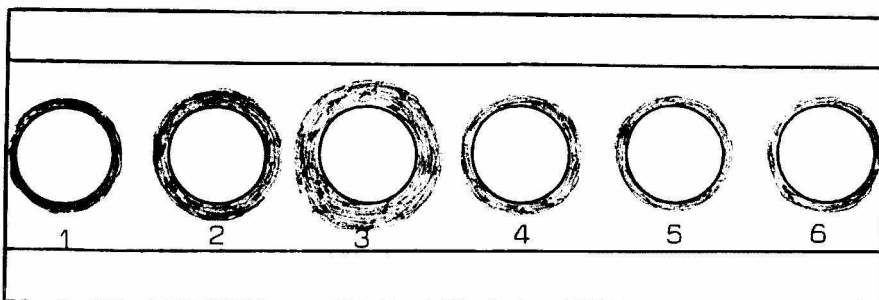
CURVA PATRON DE CERULOPLASMINA .
(Método Inmunológico HYLAND)

Se corren los 3 sueros de referencia en igual forma como los problemas.

Para graficar, se utiliza papel semilogarítmico de 2 ciclos colocando los valores de los diámetros de los halos en las abscisas aritméticas y la concentración de los sueros en las ordenadas (escala logarítmica) y se traza una línea recta.

Las concentraciones de los sueros de referencia son de: 8.5, 23.5 y 54 mg/100 ml de suero.

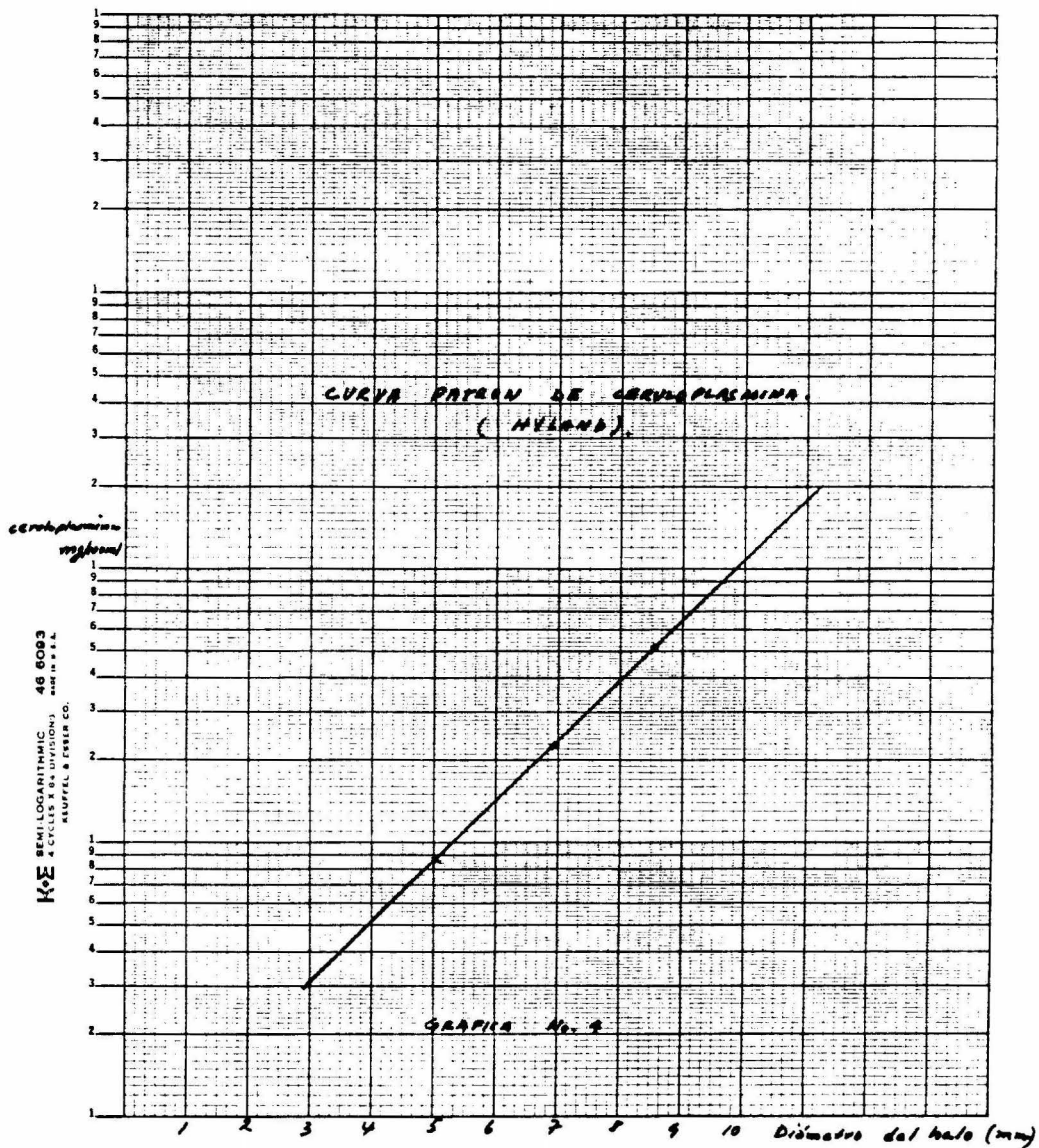
AGAR CON AMORTIGUADOR Y SUERO ANTICERULOPLASMINA HUMANA



1 = 8.5 mg/100 ml.
2 = 23.5 mg/100 ml.

3 = 54 mg/100 ml.

1, 2, 3, Sueros de Referencia
4, 5, 6, Sueros Problemas.

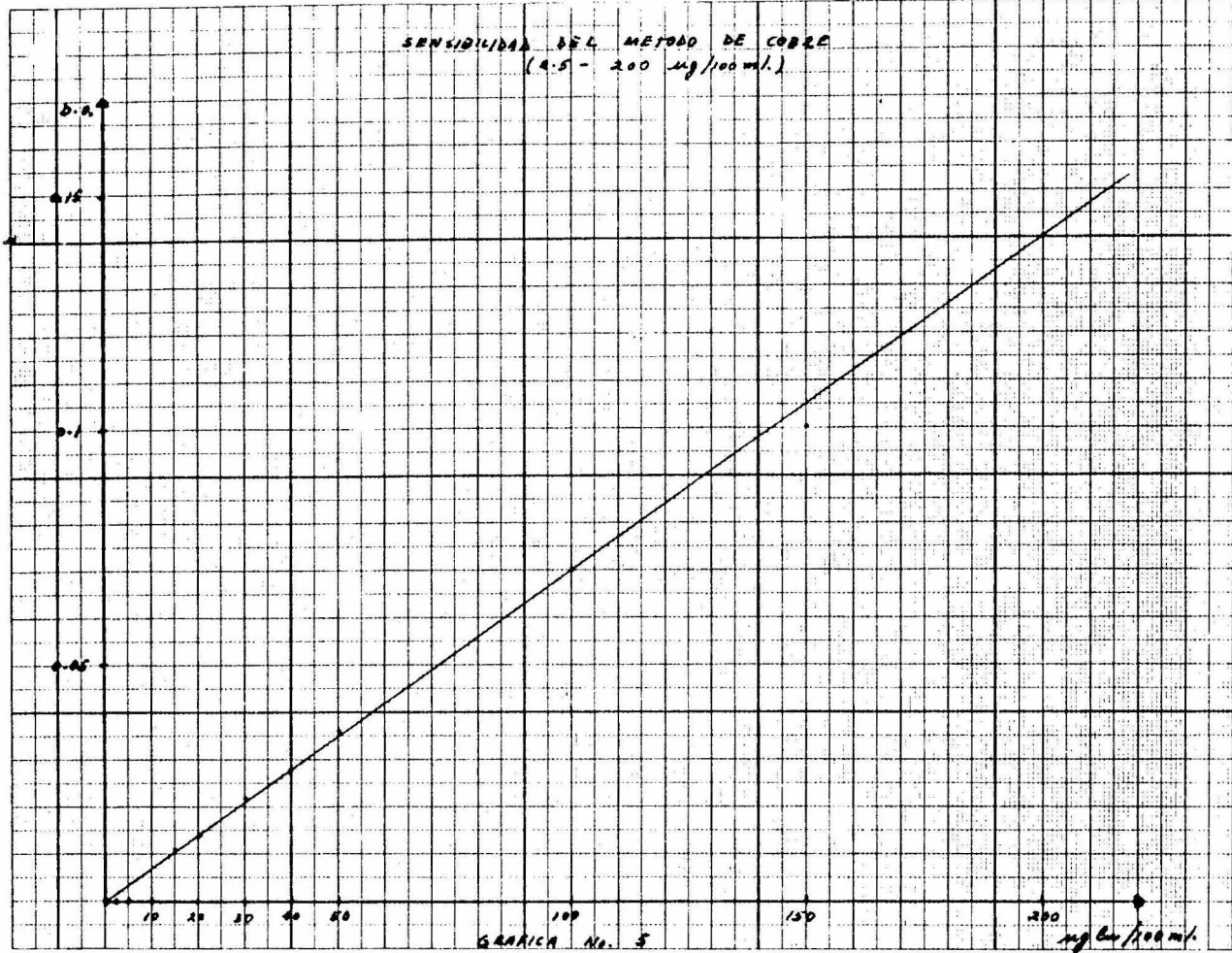


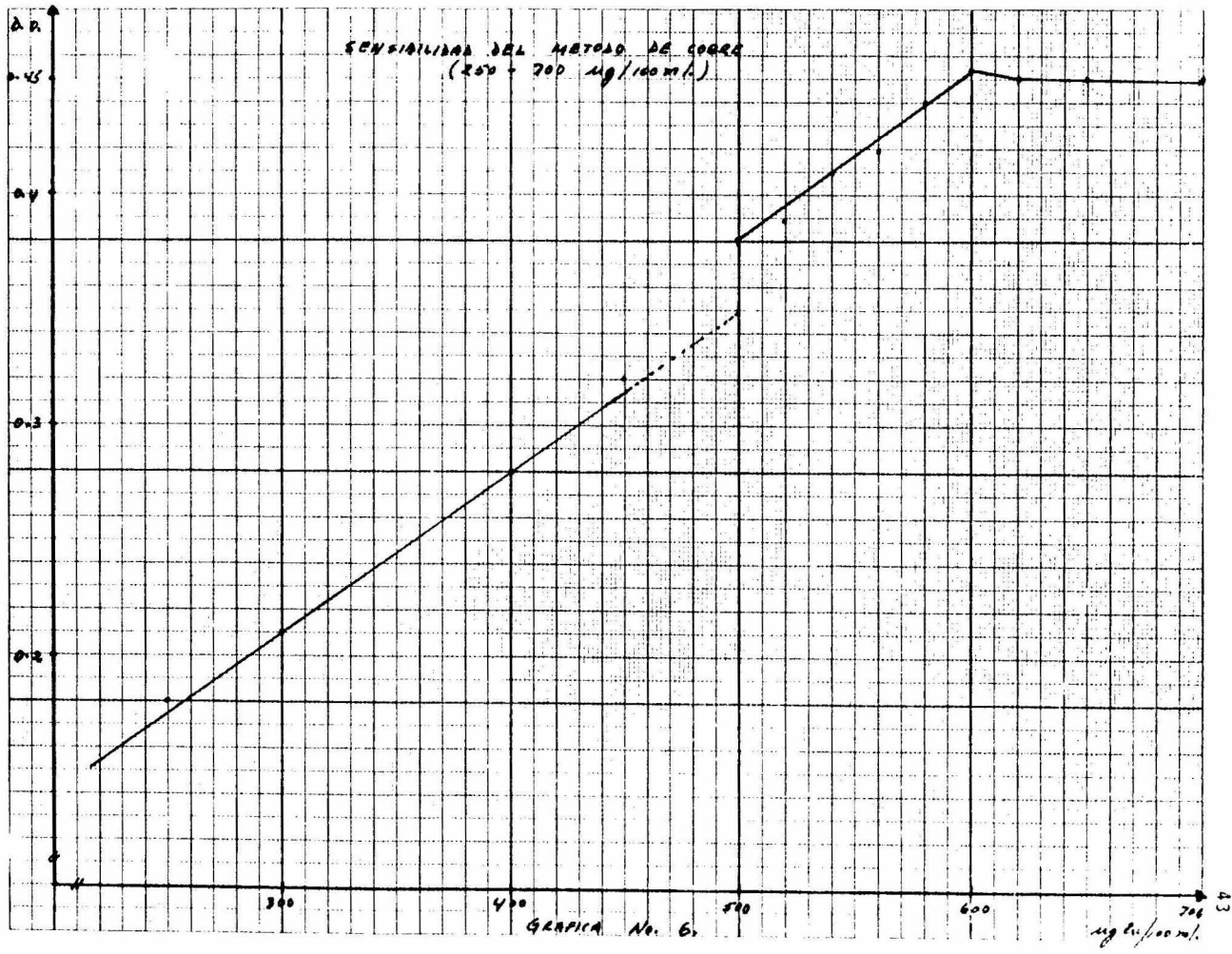
R E S U L T A D O S

- 1.- Primeramente, presentamos los resultados del estudio - del método del cobre, en cuanto a su sensibilidad, gráficas Nos. 5, 6 y 7, así como la confiabilidad, la recuperación y reproducibilidad del método, según tablas 1, 2 y 3.
- 2.- En seguida, el estudio de la cinética de las reacciones del método de ceruloplasmina, en cuanto a la concentración de sustrato, tiempo de incubación, concentración óptima de suero, inhibición de ceruloplasmina por azida de sodio, el pH óptimo al cuál debía trabajarse; que observamos en las gráficas Nos. 8, 9, 10, 11 y 12. En la tabla No. 4, tenemos los resultados de la confiabilidad del método; en la tabla No. 5 la recuperación y en la tabla No. 6, la reproducibilidad del método.
- 3.- En la tabla No. 7, se dan los resultados obtenidos de una población de niños de la Ciudad de México, donde encontramos que el valor medio de cobre, fué de 114.42 ug/100ml con una desviación estándar = ± 11.76 ug/100 ml; y para ceruloplasmina, un valor medio de 33.21 mg/100ml, con una desviación estándar = ± 2.93 mg/100ml, obteniendo una relación de cobre-ceruloplasmina de 0.34 %.
- 4.- En la tabla No. 8, donde se comparan los métodos colorimétrico e inmunológico para ceruloplasmina, observamos que los valores obtenidos fueron:
Para el método colorimétrico, una media de 27.93 mg/100 ml y para el método inmunológico de 26.27 mg/100ml, donde $P = 0.1$ (tabla 9), la que nos da una diferencia, no significativa entre los dos métodos.

5.- Se estudió la relación entre cobre y ceruloplasmina, - en niños con hipoproteinemia y hepatitis, cuyos valores, se encuentran respectivamente, en las tablas Nos. 10 y 11.

SENSIBILIDAD DEL METODO DE COBRE
(A-5 - 200 $\mu\text{g}/100\text{ml}$.)





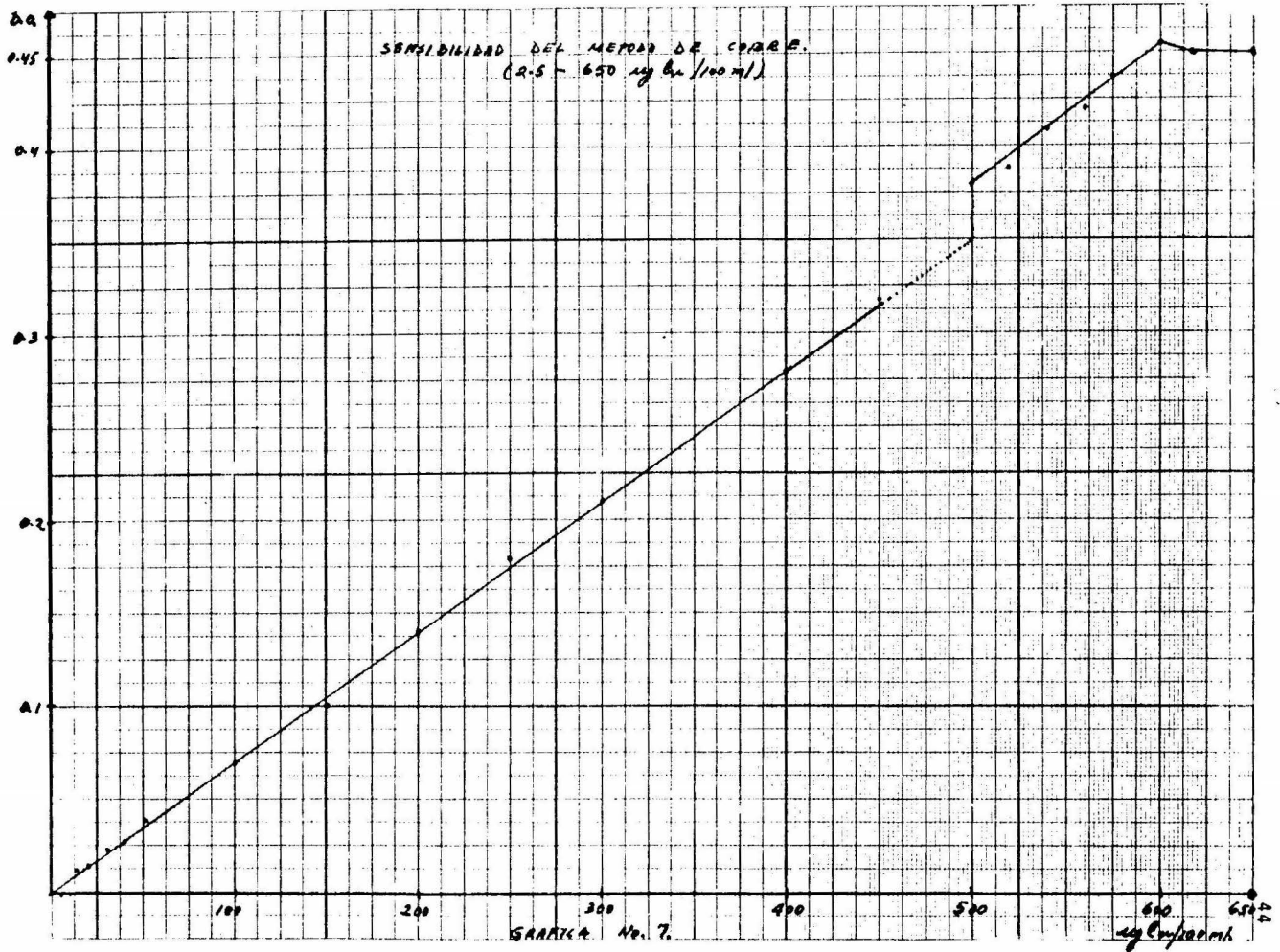


TABLA I
CONFIABILIDAD DEL METODO DE COBRE

X	Y	XY	X ²	Y ²
0.037	50	1.85	0.001369	2500
0.07	100	7.00	0.0049	10000
0.10	150	15.00	0.01	22500
0.14	200	28.00	0.0196	40000
0.18	250	45.00	0.0324	62500
0.21	300	63.00	0.0441	90000
0.28	400	112.00	0.0784	160000
0.38	500	190.00	0.1444	250000
$\Sigma X = 1.397$	$\Sigma Y = 1950$	$\Sigma XY = 447.85$	$\Sigma X^2 = 0.335169$	$\Sigma Y^2 = 627500$

$$r = \frac{\Sigma XY - \frac{(\Sigma X)(\Sigma Y)}{n}}{\sqrt{\left[\Sigma X^2 - \frac{(\Sigma X)^2}{n}\right]\left[\Sigma Y^2 - \frac{(\Sigma Y)^2}{n}\right]}}$$

$$r = \frac{46.185 - \frac{(1.397)(1950)}{8}}{\sqrt{\left(0.335169 - \frac{1.951609}{8}\right)\left(627500 - \frac{3802500}{8}\right)}}$$

$$r = \frac{121.332}{\sqrt{4794.981}} = \frac{121.332}{69.245}$$

$$r = 0.997525$$

confiabilidad

$$r^2 = 99.5056\%$$

porcentaje de confianza

$r^2 \times 100 = \text{PORCENTAJE DE CONFIANZA}$

$$P = 1 - r \quad (\Sigma X)^2 = 1.951609$$

$$(\Sigma Y)^2 = 3.802500$$

TABLA 2
RECUPERACION DE COBRE

TUBO	MUESTRA ug/100ml.	SOLUCIONES PATRONES ug/100 ml.	CONCENTRACION ESPERADA ug/100 ml.	CONCENTRACION OBTENIDA ug/100 ml.	PORCENTAJE %
1	250	50	300	276.31	92.1
2	250	100	350	315.78	90.
3	250	150	400	368.42	92.
4	250	200	450	421.05	93.5
5	250	250	500	460.52	92.1
6	250	300	550	500.00	90.9
7	250	350	600	552.63	92.1
8	250	400	650	605.26	93.1
9	250	450	700	644.23	92.1

$\bar{x} = 92\%$

NOTA: LA CONCENTRACION DE LA MUESTRA UTILIZADA FUE DE
250 ug/100 ml Y SE LE ADICIONARON PATRONES DE
CONCENTRACIONES DE:

50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 Y 450 ug/100 ml

TABLA 3
REPRODUCIBILIDAD DE COBRE

TUBO	D. O.	ug/100ml
1	0.21	297.5
2	0.22	310.0
3	0.21	297.5
4	0.21	297.5
5	0.21	297.5
6	0.21	297.5
7	0.21	297.5
8	0.21	297.5
9	0.22	310.0
10	0.22	310.0

TUBO	D. O.	ug/100ml.
1	0.22	310.0
2	0.22	310.0
3	0.21	297.5
4	0.21	297.5
5	0.21	297.5
6	0.21	297.5
7	0.21	297.5
8	0.21	297.5
9	0.21	297.5
10	0.22	310.0

TUBO	D. O.	ug/100ml.
1	0.21	297.5
2	0.21	297.5
3	0.22	310.0
4	0.21	297.5
5	0.21	297.5
6	0.21	297.5
7	0.22	310.0
8	0.22	310.0
9	0.21	297.5
10	0.21	297.5

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\sum (x_i - \bar{x})^2 = 984.4230$$

$$\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} = \frac{984.4230}{29} = 33.9456$$

$$C.V. = \frac{6.15}{301.21} \times 100 = 2.04$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$n = 30$$

$$\sum x_i = 9037.5$$

$$x_i - \bar{x} \begin{cases} a) 297.5 - 301.21 = -3.71 \\ b) 310.0 - 301.21 = 8.79 \end{cases}$$

$$s = \pm \sqrt{33.9456} = \pm 6.15$$

$$\bar{x} = \frac{9037.5}{30} = 301.21$$

$$(x_i - \bar{x})^2 \begin{cases} a) (-3.71)^2 = 13.7641 \\ b) (8.79)^2 = 77.2641 \end{cases}$$

DESVIACION ESTANDAR

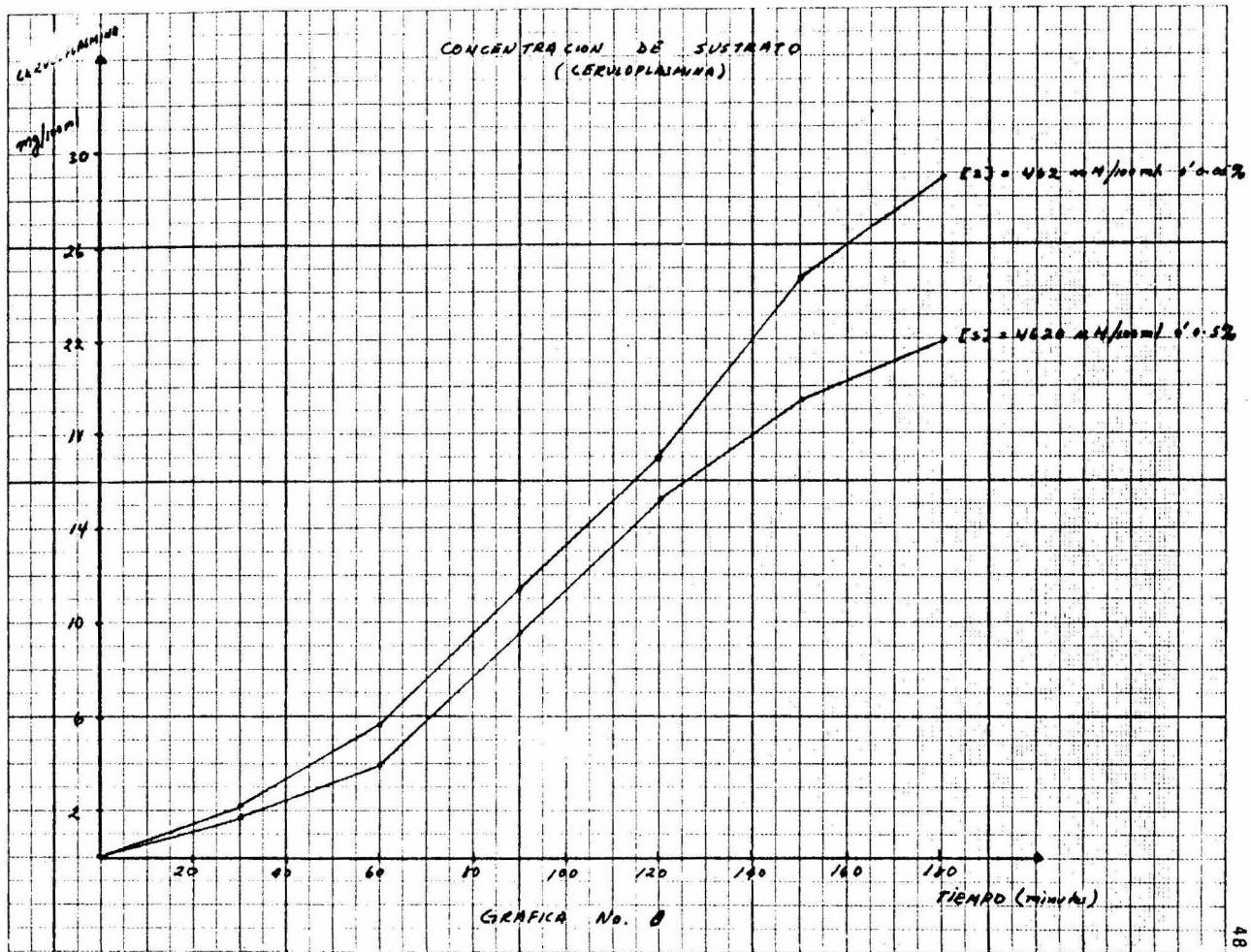
$$s = \pm 6.15 \text{ ug/100 ml}$$

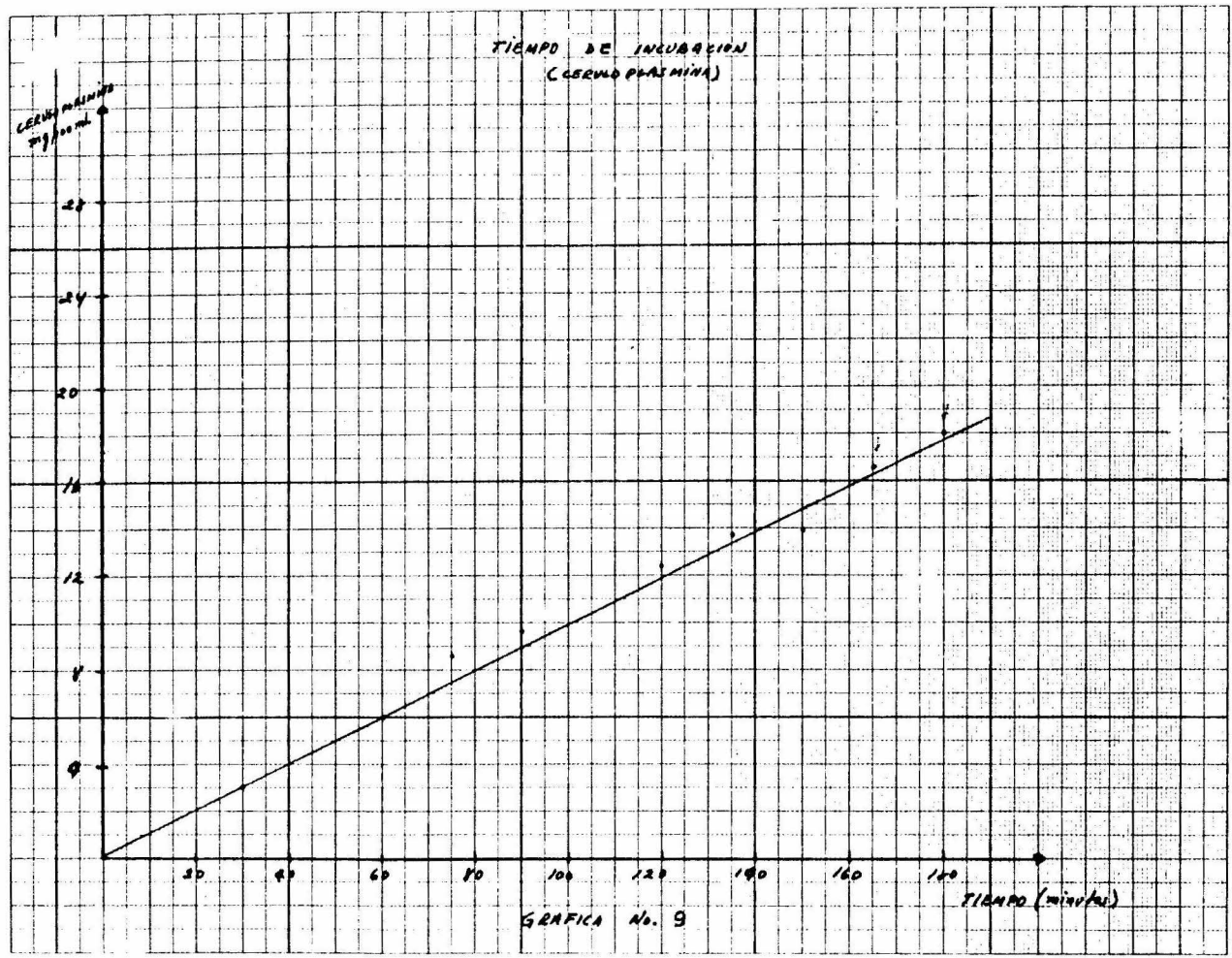
$$C.V. = 2.04\%$$

CORPONENTE DE VARIACION

$$C.V. = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

CORPONENTE DE VARIACION





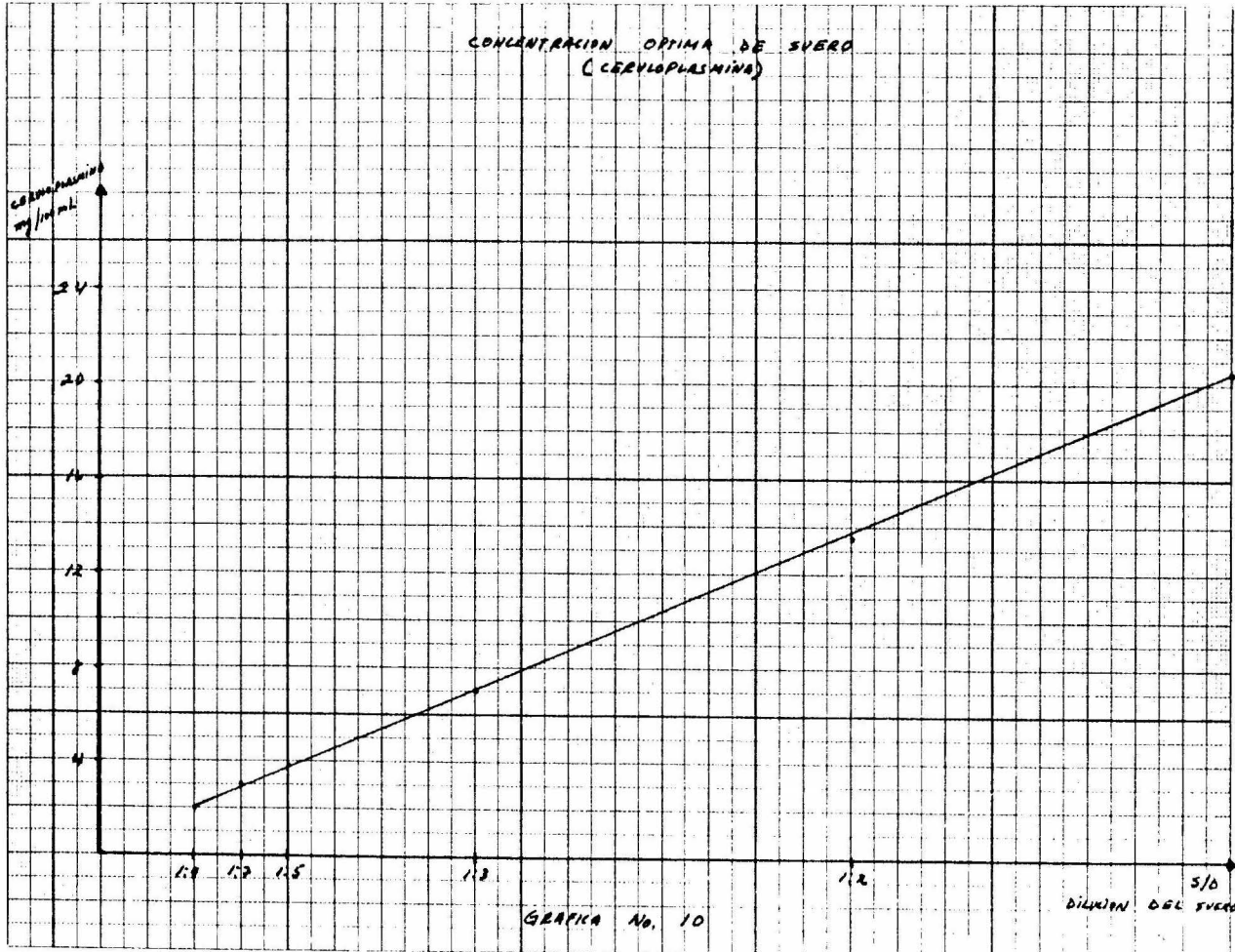
CONCENTRACION OPTIMA DE SERO
(CERVOPASMINA)

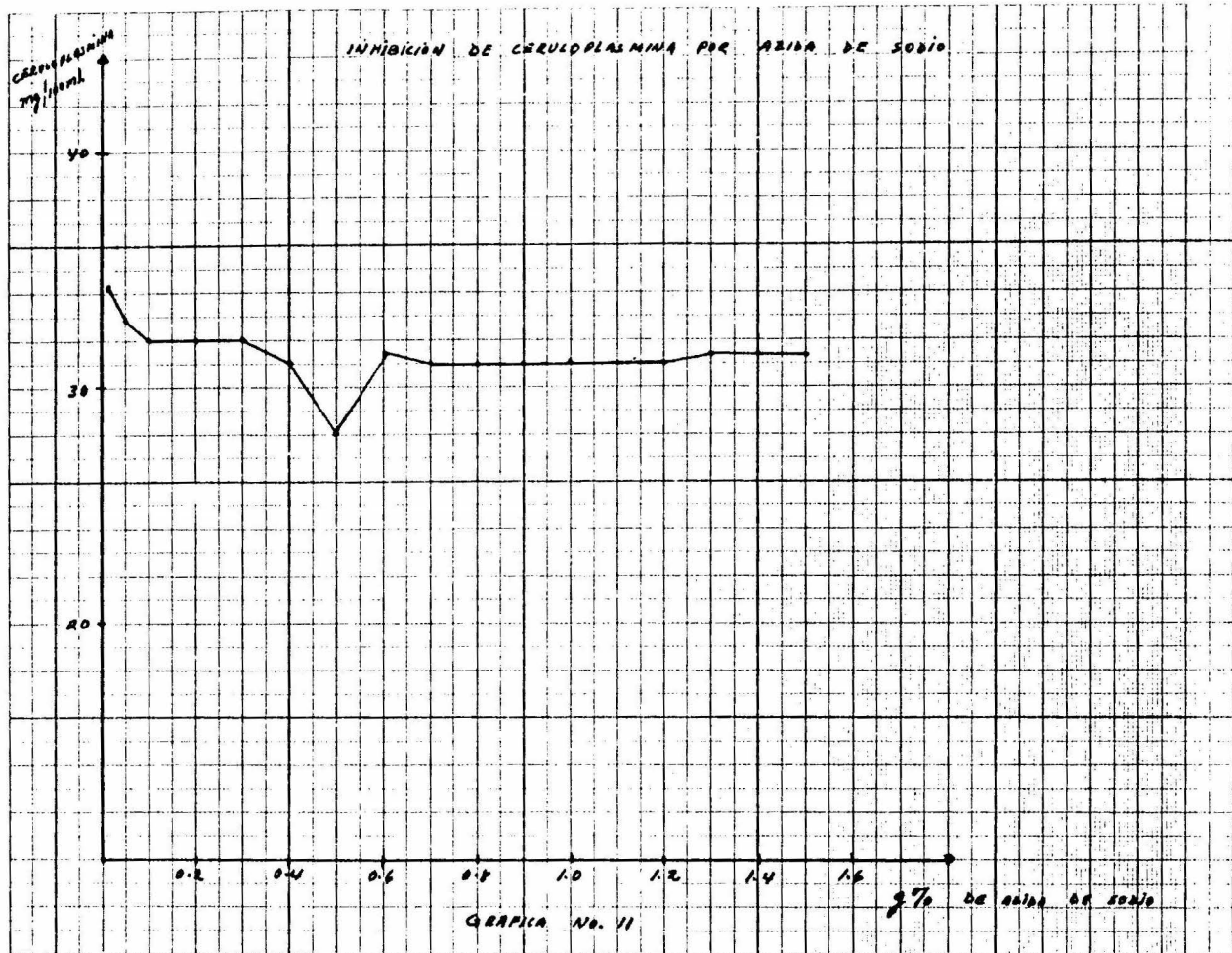
CERVOPASMINA
mg/ml

24
20
16
12
8
4

1/8 1/7 1/5 1/3 1/2 5/8
DILUCION DEL SERO

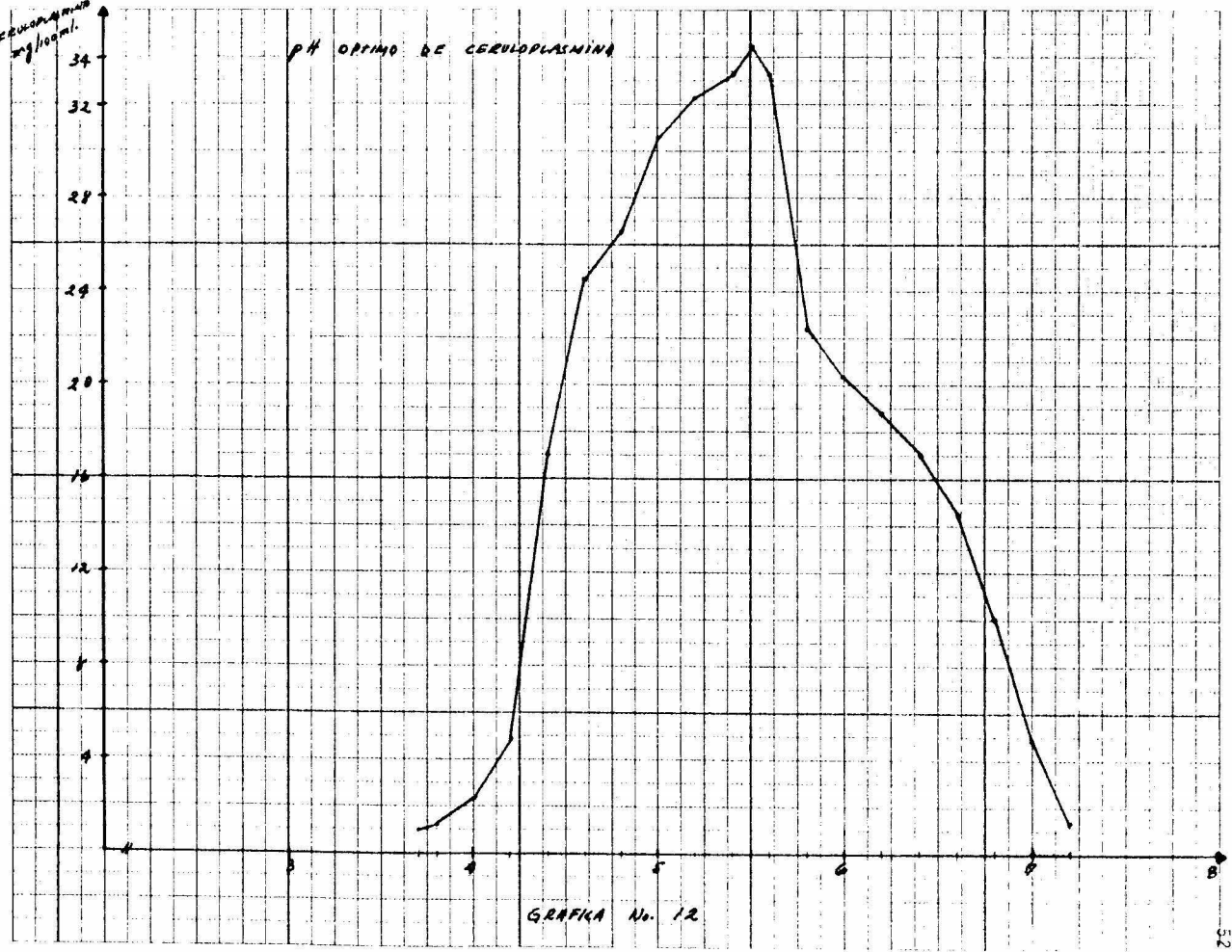
GRAFICA No. 10





сыворотка
1 мг/100 мл.

pH ОПТИМ. ДЕ СЕРУОПАСИНА



ГРАФИКА No. 12

TABLA 4
CONFIABILIDAD DEL METODO DE CERULOPLASMINA

X	Y	XY	X ²	Y ²
5.0	8.5	42.5	25	72.25
6.8	23.5	159.8	46.24	552.25
<u>8.5</u>	<u>54</u>	<u>439</u>	<u>72.25</u>	<u>2916</u>
Σx=20.3	Σy=86.0	Σxy=661.3	Σx ² =143.49	Σy ² =3540.5

$$r = \frac{\sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n}}{\sqrt{(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n})(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n})}}$$

$$r = \frac{661.3 - \frac{(20.3)(86)}{3}}{\sqrt{(143.49 - \frac{412.09}{3})(3540.5 - \frac{7396}{3})}}$$

$$r = \frac{661.3 - 581.93}{\sqrt{6468.1921}} = \frac{79.37}{80.429} = 0.9868$$

CONFIABILIDAD

$$r = 0.9868$$

$$r^2 \times 100 = 97.37\%$$

LIMITE DE CONFIANZA

$r^2 \times 100 =$ PORCENTAJE DE CONFIANZA

$D = 1 - r$ PROBABILIDAD

$$(\sum x)^2 = 412.09$$

$$(\sum y)^2 = 7396$$

$$r^2 = 0.9737742$$

TABLA 5
RECUPERACION DE CERULOPLASMINA

TUBO	MUESTRA mg/100ml	SOLUCIONES PATRONES mg / 100 ml	CONCENTRACION ESPERADA mg / 100 ml.	CONCENTRACION OBTENIDA mg/100 ml	PORCENTAJE %
1	13.78	1.25	15.03	13.58	90.2
2	13.78	2.5	16.28	14.43	88.6
3	13.78	5	18.78	17.06	90.8
4	13.78	10	23.78	21.87	91.9
5	13.78	15	28.78	25.81	89.6
6	13.78	20	33.78	31.06	91.9
7	13.78	25	38.78	35.43	91.3
					$\bar{X} = 90.6 \%$

NOTA : LA CONCENTRACION DE LA MUESTRA UTILIZADA FUE DE 13.78 mg/100 ml
Y SE ADICIONARON PATRONES DE CONCENTRACIONES DE
1.25, 2.5, 5, 10, 15, 20 y 25 mg/100 ml
LAS SOLUCIONES FUERON HECHAS A PARTIR DE SUEROS PATRONES
DE HYLAND DE 7.5, 33.5 y 54 mg/100 ml

TABLA 6
REPRODUCIBILIDAD DE CERULOPLASMINA

TUBO	D.O. (P)	D.O. (B)	mg/100ml
1	0.34	0.05	25.37
2	0.34	0.05	25.37
3	0.33	0.05	24.5
4	0.34	0.05	25.37
5	0.34	0.05	25.37
6	0.34	0.05	25.37
7	0.34	0.05	25.37
8	0.33	0.05	24.5
9	0.34	0.05	25.37
10	0.34	0.05	25.37

TUBO	D.O. (P)	D.O. (B)	mg/100ml
1	0.33	0.05	24.5
2	0.34	0.05	25.37
3	0.34	0.05	25.37
4	0.34	0.05	25.37
5	0.33	0.05	24.5
6	0.34	0.05	25.37
7	0.34	0.05	25.37
8	0.34	0.05	25.37
9	0.34	0.05	25.37
10	0.34	0.05	25.37

TUBO	D.O. (P)	D.O. (B)	mg/100ml
1	0.34	0.05	25.37
2	0.34	0.05	25.37
3	0.34	0.05	25.37
4	0.33	0.05	24.5
5	0.34	0.05	25.37
6	0.34	0.05	25.37
7	0.34	0.05	25.37
8	0.34	0.05	25.37
9	0.34	0.05	25.37
10	0.33	0.05	24.5

$$s \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

DATOS: $n=30$
 $\sum x_i = 755.88$

$$\bar{x} = \frac{755.88}{30} = 25.196$$

$$x_i - \bar{x} \begin{cases} a) 25.37 - 25.196 = 0.27 \\ b) 24.5 - 25.196 = -0.60 \end{cases}$$

$$(x_i - \bar{x})^2 \begin{cases} a) 0.27 \times 0.27 = 0.0729 \\ b) (-0.60) \times (-0.60) = 0.36 \end{cases}$$

$$\sum (x_i - \bar{x})^2 = 3.9096$$

$$\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} = \frac{3.9096}{29} = 0.1348$$

$$\sqrt{0.1348} = \pm 0.36$$

$$s = \pm 0.36 \text{ mg/100ml}$$

$$C.V. = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

$$C.V. = \frac{0.36}{25.196} \times 100 = 1.42$$

$$C.V. = 1.42\%$$

TABLA 7
RANGO DE VALORES NORMALES DE COBRE Y CERULOPLASMINA EN UNA
POBLACION DE LA CIUDAD DE MEXICO.

CASO	EDAD (años)	COBRE ug/100ml.	CERULOPLASMINA M. COLORIMETRICO [C ₅] = 0.05% mg/100 ml.	PROTEINAS g/100ml.	TRANSAMINASAS
1	15	128	26.37	7.6	N
2	5	129.3	28.2	6.0	N
3	15/12	115	28.7	7.5	N
4	2	94.7	28.7	8.0	N
5	9 1/12	110.0	29	6.5	N
6	2	133.8	29.06	7.4	N
7	3 3/12	95	29.4	8.0	N
8	5	114	29.5	7.9	N
9	1	115	29.75	7.2	N
10	8	135	30	7.9	N
11	14	93.1	30.1	6.0	N
12	4	128	30.1	7.6	N
13	4	117	30.18	6.5	N
14	9	131.5	30.3	7.0	N
15	16	97	30.3	2.9	N
16	15	114	30.4	8.0	N
17	14	125	30.5	7.8	N
18	3	124.2	30.5	6.6	N
19	3	97	30.6	6.7	N
20	12	107	30.7	6.7	N
21	1 10/12	121	30.8	6.0	N
22	14	95	30.8	7.0	N
23	9	123	30.9	6.7	N
24	2	102	31	2.0	N
25	5	130	31.1	7.0	N
26	13	121	31.2	6.5	N
27	10	102	31.2	7.3	N
28	4	127	31.8	8.0	N
29	9	128	31.8	7.4	N
30	69/12	137	32	6.4	N

CASO	EDAD (años)	COBRE ug/100ml.	CERULOPLASMINA M. COLORIMETRICO [S] = 0.05% mg/100ml.	PROTEINAS g/100ml.	TRANSAMINASAS
31	9 ¹ / ₂	121	32	6.7	N
32	12	90	32	6.9	N
33	2	108	32.3	7.2	N
34	1 ³ / ₂	124	32.3	7.3	N
35	8	127	32.3	7.7	N
36	6 ⁹ / ₁₂	122.6	32.4	7.8	N
37	5	113	32.6	6.0	N
38	1 ⁹ / ₁₂	98	32.6	6.0	N
39	12	124	32.7	8.0	N
40	1 ⁶ / ₁₂	113	33.1	7.6	N
41	13	115	33.5	6.4	N
42	1	111	33.8	6.3	N
43	1 ² / ₁₂	115	34	7.9	N
44	6	128	34	7.9	N
45	13	116.3	34	6.9	N
46	6	122	34	6.4	N
47	4	127	34	6.3	N
48	2	114.2	34	7.2	N
49	6	101.33	34.12	7.2	N
50	11	112	34.4	6.1	N
51	7	95	34.8	6.3	N
52	14	97	34.8	6.0	N
53	10 ¹ / ₁₂	108	34.8	6.8	N
54	4	120	34.9	7.7	N
55	5	110	35	8.0	N
56	6	124.7	35	7.5	N
57	8	110	35	7.5	N
58	7	125	35	7.4	N
59	10	97	35	7.0	N
60	13	121	35.1	6.6	N
61	4	123	35.3	7.7	N
62	4	131.5	35.4	7.6	N
63	4	123	35.6	6.0	N
64	12	124	35.7	6.9	N

CASO	EDAD (años)	COBRE ug/100ml.	CERULOPLASMINA M. COLORIMETRICO C=J= 0.05% mg/100 ml.	PROTEINAS g/100ml.	TRANSAMINASAS
65	9	124.7	35.7	7.5	N
66	5	107	35.87	6.0	N
67	14	122	36	6.5	N
68	7	127	36	6.8	N
69	16	126.8	36	6.8	N
70	18	120	36	6.8	N
71	8	121.5	36	6.7	N
72	1	119.4	36.1	6.8	N
73	11	124	36.1	7.5	N
74	13	129	36.6	8.0	N
75	3 7/12	95	36.6	7.8	N
76	8	97	36.75	8.0	N
77	16	125	37	6.4	N
78	14	123.6	37	6.4	N
78	4	126	37	6.2	N
80	11	132	37.1	6.5	N
81	12	98	37.4	7.6	N
82	2 0/12	121	37.5	7.4	N
83	6	99	37.62	7.3	N
84	9 1/12	126	37.9	6.6	N
85	11	105	38	6.3	N
86	10	110.5	38	6.8	N
87	2	102.6	38.02	6.9	N
88	5	118.1	38.1	7.0	N
89	14	110	38.2	6.9	N
90	3	123.6	38.2	7.9	N
FERULOPLASMINA	VALOR MAS ALTO = 58.2 mg/100 ml VALOR MAS BAJO = 26.32 mg/100 ml $\bar{x} = 35.21$ mg/100 ml $\sigma = 12.93$ mg/100 ml		COBRE	VALOR MAS ALTO = 130 ug/100 ml VALOR MAS BAJO = 90 ug/100 ml $\bar{x} = 114.42$ ug/100 ml $\sigma = 11.76$ ug/100 ml	
				N = NORMALES CASOS = 90 NIÑOS	

TABLA 8
COMPARACION DEL METODO DE CERULOPLASMINA
COLORIMETRICO CON EL INMUNOLOGICO.

CASO	EDAD (años)	CERULOPLASMINA M. COLORIMETRICO mg/100ml. [s]=0.05%	CERULOPLASMINA M. COLORIMETRICO mg/100ml. [s]=0.5%	CERULOPLASMINA INMUNOLOGICO mg/100ml.
1	1 ³ / ₁₂	6.12	11.3	5
2	9	8.31	13.23	7
3	2	9.18	10.5	8
4	2 ⁶ / ₁₂	14	63.8	10
5	9	14.6	40.7	12
6	2	15.25	19.68	14
7	1 ⁴ / ₁₂	15.75	33	11.5
8	4	16	36	12
9	3 ¹ / ₁₂	16.5	36	12
10	2 ¹ / ₁₂	17.06	34	15
11	7	17.5	24.9	15
12	7	18	38	15
13	4	20.12	20.18	19
14	6	20.12	50.75	20
15	8 ¹ / ₁₂	20.56	41.12	20
16	9 ³ / ₁₂	21	23.62	20
17	6 ⁶ / ₁₂	21	36.75	20
18	4	22	32	20
19	8 ¹ / ₁₂	22.31	41	19
20	16	24	38	22
21	16	24.87	40.2	23
22	6	24.9	35.8	23
23	2 ⁸ / ₁₂	26	44	26
24	15	26.2	39.3	25
25	5 ⁸ / ₁₂	26.25	40.4	25
26	10	28	48	25
27	5	29.2	41	29
28	2 ⁸ / ₁₂	30	40	29
29	5	30.18	38.62	29
30	2	30.18	31.5	26

C 30	EDAD (años)	CERULOPLASMINA M. COLORIMETRICO mg/100ml. [s] = 0.05%	CERULOPLASMINA M. COLORIMETRICO mg/100 ml. [s] = 0.5%	CERULOPLASMINA INMUNOLOGICO mg/100 ml	
31	9	30.3	45	29	
32	2	31	57.62	30	
33	8	31	51	30	
34	5	31.1	38	30	
35	7/12	32	42	30	
36	10	31.5	40.25	30	
37	12/12	32	46	31	
38	18/12	32	43.75	31	
39	6/12	32	52	31	
40	2	32.3	38.5	31	
41	15/12	34	44	32	
42	6	34	44.62	32	
43	18	34	45	32	
44	6	34.12	43.75	32	
45	6	35	51	33	
46	5	35	54	33	
47	4	35.4	50	33	
48	5	35.82	77.8	34	
49	14	36	41.12	35	
50	16/12	36	58	35	
51	11	37.1	50	35	
52	9/12	37.9	53	35	
53	11	38	52	36	
54	6	38.2	46.3	36	
55	24/12	38.5	58	36	
56	16	38.5	38.9	36	
57	5/12	38.3	59	37	
58	10	44.42	46.8	40	
59	10	45.5	63.3	40	
60	6	49	77	45	
CERULOPLASMINA M. COLORIMETRICO	VALOR MAS ALTO = 49 mg/100ml VALOR MAS BAJO = 6.12 " $\bar{X} = 27.93$ mg /100 ml	CERULOPLASMINA M. INMUNOLOGICO	VALOR MAS ALTO = 45 mg/100ml VALOR MAS BAJO = 5 mg/100ml $\bar{X} = 26.27$ mg/100ml		

TABLA 9
PRUEBA DE "T" DE STUDENT.

CASO	METODO COLORIMETRICO mg/100 ml. [s] = 0.05 %	METODO INMUNOLOGICO mg/100 ml.	d*	d* - \bar{d}	(d* - \bar{d}) ²
1	20.12	19	1.12	-1.2561	1.5777
2	32.3	32	0.3	-2.0761	4.3101
3	34.12	30	4.12	1.7439	3.0411
4	32	29	3	0.6239	0.3892
5	45.5	40	5.5	3.1239	9.7587
6	35.87	34	1.87	-0.5861	0.2561
7	38	35	3	0.6239	0.3892
8	31	30	1	-1.3761	1.8936
9	32	30	2	-0.3761	0.1414
10	34	32	2	-0.3761	0.1414
11	24	32	2	-0.3761	0.1414
12	31.5	30	1.5	-0.8761	0.7675
13	21	20	1	-1.3761	1.8936
14	36	33	3	0.6239	0.3892
15	39	32	2	-0.3761	0.1414
16	32	30	2	-0.3761	0.1414
17	31	29	2	-0.3761	0.1414
18	35.4	30	5.4	3.0239	9.1439
19	30.3	29	1.3	-1.0761	1.1579
20	31.1	28	3.1	0.7239	0.5240
21	23.2	29	0.2	-2.1761	4.7354
22	37.1	35	2.1	-0.2761	0.7623
23	37.9	35	2.9	0.5239	0.2744
24	15.75	11.5	4.25	1.8739	3.5115
25	35	32	3	0.6239	0.3892
26	17.06	15	2.06	-0.3161	0.0999
27	35	32	3	0.6239	0.3892
28	30	29	1	-1.3761	1.8936
29	34	30	4	1.6239	2.6370
30	38.5	35	3.5	1.1239	1.2631

CASO	METODO COLORIMETRICO mg/100ml.	METODO INMUNOLOGICO mg/100 ml.	d^*	$d^* - \bar{d}$	$(d^* - \bar{d})^2$
31	38.2	35	3.2	0.8239	0.6788
32	26	26	0	-2.3761	5.6458
33	28	25	3	0.6239	0.3892
34	21	20	1	-1.3761	1.8936
35	9.18	8	1.18	-1.1961	1.4306
36	49	45	4	1.6239	2.6370
37	16	12	4	1.6239	2.6370
38	39.3	35	4.3	1.9239	3.7013
39	16.3	12	4.5	2.1239	4.5109
40	30.18	29	1.18	-1.1961	1.4306
41	36	35	1	-1.3761	1.8936
42	6.12	5	1.12	-1.2561	2.5122
43	24.9	23	1.9	-0.4761	0.2266
44	31.2	30	1.2	-1.1761	1.3832
45	44.62	40	4.62	2.2439	5.0350
46	22.31	19	3.31	0.9339	0.8721
47	20.12	20	0.12	-2.2561	5.0899
48	14	10	4	1.6239	2.6370
49	18	15	3	0.6239	0.3892
50	20.56	20	0.56	-1.8161	3.2982
51	8.31	7	1.31	-1.0661	1.1365
52	15.25	14	1.25	-1.1261	1.2681
53	26.75	25	1.75	-0.6261	0.3920
54	22	20	2	-0.3761	0.1414
55	26.2	25	1.2	-1.1761	1.3832
56	24.87	23	1.87	-0.5061	0.2561
57	30.18	26	4.18	1.8039	3.2540
58	38.5	35	3.5	1.1239	1.2631
59	17.5	15	2.5	0.1239	0.01535
60	14.6	12	2.6	0.2239	0.05013

$$\hat{S} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x}_1)^2 + \sum (x_2 - \bar{x}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

$$\hat{S} = \sqrt{\frac{5100.1824 + 4072.209}{60 + 60 - 2}} = \sqrt{\frac{9172.3914}{118}} = \sqrt{84.511791} = 9.1930$$

$$t_{110} = \frac{28.08 - 29.72}{9.1930} \sqrt{\frac{60 \times 60}{60 \times 60}} =$$

$$t_{110} = \frac{2.3}{9.1930} \sqrt{\frac{3600}{120}}$$

$$t_{110} = 0.250190 \sqrt{30}$$

$$t_{110} = (0.250190)(9.478)$$

$$t_{110} = 1.3705408$$

$$P = 0.1$$

TABLA 10
 RELACION ENTRE COBRE Y CERULOPLASMINA
 EN NIÑOS CON HIPOPROTEINEMIA

CASO	EDAD (años)	COBRE ug/100ml.	CERULOPLASMINA M. COLORIMETRICO [s] = 0.05% mg/100ml	PROTEINAS g/100ml.	TRANSAMINASAS Y OTROS
1	1 ² /12	74	18.8	3.3	N
2	9	152.1	8.31	3.5	H
3	10	153.4	8.31	3.5	F.A. ♀
4	1	85	22.75	3.5	SEPTICEMIA TGO ♀
5	4	176	16.6	3.6	H
6	1 ¹ /12	69	15.75	4.0	N
7	6 ¹ /12	58	12.25	4.0	N
8	15 ¹ /12	122.1	66.5	4.0	TGO ♀
9	26 ¹ /12	163	14	4.1	H
10	7 ¹ /12	53	12.25	4.1	E
11	13 ¹ /12	145	6.12	4.3	TGO ♀
12	8 ¹ /12	64	20.56	4.5	TGO ♀
13	1 ¹⁰ /12	177	20.12	4.5	E/B1
14	2	52	10.86	4.5	RABBITISMO REFRACTARIO
15	3	77	16.1	4.6	N
16	9	85	17.5	4.7	H
17	4	195	22	4.9	H
18	10	182	19.68	4.9	H
19	4	170.7	14.4	4.9	H
20	2 ¹ /12	65	17.06	5.0	N
21	4	166	16	5.0	E
22	6	187	20.12	5.0	H
23	9	165	14.6	5.0	A. H
24	19 ¹ /12	173	17.5	5.0	H
25	7	72.1	18.7	5.0	N
26	1 ⁶ /12	60	13.5	5.0	T.G.P. ♀
27	1	199	22.75	5.0	E
28	6	80	24.06	5.1	N
29	1 ¹¹ /12	181	18.37	5.1	F.A. ♀
30	5	175	17.5	5.1	E

CASO	EDAD (años)	COBRE ug/100ml.	CERULOPLASMINA M. COLORIMETRICO [s] = 0.05 % mg/100ml.	PROTEINAS g/100ml.	TRANSAMINASAS
31	2 8/12	68	21.43	5.2	N
32	8/12	66	18	5.2	E
33	3	225	26.68	5.2	TGO ↑
34	16	262	31.5	5.2	FA ↑
35	16	205	24.87	5.3	H
36	7	185	19.1	5.3	FA ↑
37	3 1/2	79	24	5.4	N
38	10	160	15.2	5.4	E
39	4 1/2	48	8.75	5.4	TGP ↑
40	2	70	12.5	5.5	N
41	1	75	19	5.5	N
42	3 1/2	78	22.31	5.5	N
43	6 1/2	77	20.93	5.5	E
44	2 1/2	57	12.25	5.5	FA ↑
45	8	83	31	5.5	N
46	4	268	31.5	5.5	E
47	10	331	44.62	5.5	TGO ↑
48	13	68.4	21.3	5.6	TGP ↑
49	15	227.1	26.2	5.6	H
50	2	160.7	16.7	5.6	H
51	1 9/12	63	19.68	5.6	N
52	1 5/12	68	15.75	5.6	NS.1
53	9 1/2	55	11.37	5.6	NS.1
54	13	69.4	21.3	5.6	TGP ↑
55	15	395	58.1	5.6	H
56	4	188.9	19.1	5.7	TGO
57	5	177	17.12	5.7	H
58	16	58	14	5.7	N
59	9	150	7.87	5.7	E
60	5	50	9.62	5.7	NS.1.
61	3 1/2	64	12.75	5.7	FA ↑
62	5	153.6	11.27	5.8	H
63	3	175	14	5.8	H
64	6	79	23.5	5.8	N

CASO	EDAD (años)	COBRE ug/100ml.	CERULOPLASMINA M. COLORIMETRICO C = J = 0.05 % mg/100 ml.	PROTEINAS g/100ml.	TRANSAMINASAS
65	1 9/12	187.8	18.7	5.8	E
66	5/12	86	17.5	5.8	E
67	3	163	14	5.8	E
68	7/12	86	31.2	5.8	TGO ↑
69	3/12	60	16.5	5.9	E
70	2	68	20.12	5.9	N
CERULOPLASMINA		VALOR MAS ALTO = 66.5 mg/100ml	VALOR MAS ALTO = 268 ug/100ml		
		VALOR MAS BAJO = 6.12 mg/100ml COBRE	VALOR MAS BAJO = 48 ug/100ml		
		\bar{x} = 19.78	\bar{x} = 129.12 ug/100ml		
CASOS = 70 NIÑOS					
SIMBOLOS:					
N = NORMALES					
H = HEPATITIS					
F.A = FOSFATASA ALCALINA					
S.I = SUERO ICTERICO					
TGO = TRANSAMINASA GLUTAMICO OXALACETICA					
TGP = TRANSAMINASA GLUTAMICO PIRUVICA					
A.H. = ABSCESO HEPATICO					
E = ELEVADAS					

TABLA II
RELACION ENTRE COBRE Y CERULOPLASMINA
EN NIÑOS CON HEPATITIS

CASO	EDAD (años)	COBRE ug/100ml.	CERULOPLASMINA M. COLORIMETRICO mg/100ml. [±] = 0.05%	PROTEINAS g/100ml	TRANSAMINASAS	
1	9	152.1	8.31	3.5	H	
2	10	153.4	8.31	3.5	H	
3	5	153.6	11.37	5.8	H	
4	3	175	14	5.8	H	
5	2 9/12	163	14	4.1	H	
6	7	171.05	14	8.0	H	
7	4	170.7	14.4	4.9	H	
8	2	160	15.25	6.6	H	
9	2	160.9	15.7	5.6	H	
10	4	176	16.6	3.6	H	
11	5	177	17.12	5.2	H	
12	1 9/12	187.8	18.7	5.0	H	
13	9	181	18	8.1	H	
14	10	183	17.68	4.9	H	
15	6	187	20.12	5.0	H	
16	8/12	64	20.56	4.5	H	
17	4	195	22	4.9	H	
18	2	204	24.06	6.0	H	
19	16	205	24.87	5.3	H	
20	3	224	25.1	6.0	H	
21	15	250	26.2	5.6	H	
22	5 8/12	262	26.75	5.4	H	
23	15	400	58.1	5.6	H	
CERULOPLASMINA		VALOR MAS ALTO = 58.1 mg/100ml VALOR MAS BAJO = 8.31 mg/100ml $\bar{x} = 19.7$ mg / 100 ml	COBRE	VALOR MAS BAJO = 64 ug/100ml VALOR MAS ALTO = 400 ug/100ml $\bar{x} = 191.9$ ug / 100 ml		H = HEPATITIS CASOS = 23 NIÑOS

D I S C U S I O N

En nuestro estudio, al determinar la sensibilidad, reproducibilidad, desviación estándar, recuperación, espectro de absorción y confiabilidad del método de Zack B. y Landers J.W. para determinación de cobre sérico, observamos que la sensibilidad, corresponde a las concentraciones comprendidas desde 15 hasta 450 ug Cu/100ml, según se observa en las gráficas Nos. 5, 6 y 7. Así mismo, se comprobó que la longitud de onda especificada en el método original, corresponde a la obtenida por nosotros, entre 420 y 440 nm. La lectura de nuestras determinaciones, fueron hechas a 440 nm según se observa en la gráfica No. 2. La confiabilidad del método, representada en la tabla No. 1, vemos que corresponde según datos estadísticos a $r = 0.997$, con un porcentaje de confianza de 99.5 %; lo que nos presenta un error de 0.5 %. La recuperación del cobre sérico, fué de 92 %, según datos reportados en la tabla No. 2, donde se especifica el número de muestras utilizadas, soluciones patrones empleadas, concentración esperada, concentración obtenida, así como el porcentaje de recuperación de cada una de ellas. Con respecto a la reproducibilidad del mismo, ésta fué realizada con 30 determinaciones, utilizando el patrón, de concentración de 300 ug/100ml. El método en sí, es reproducible de acuerdo a los resultados obtenidos, representados en la tabla No. 3, donde encontramos una desviación estándar de ± 6.15 ug/ml y un coeficiente de variación de 2.04 %.

Al estudiar las características cinéticas, del método de Ravin H.A. para la determinación de ceruloplasmina, encontramos que el pH óptimo fué de 5.5, según se demuestra en la gráfica No. 12; la concentración óptima de azida, para frenar la reacción, fué de 0.5 %, como podemos observar en la gráfica No. 11; el tiempo de incubación empleado por nosotros, fué de 60 minutos, de acuerdo a lo obtenido, según gráfica No. 9 y la concentración óptima de

suero, después de hacer diluciones del mismo, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 y 1:9, observamos que el suero sin deluir, nos proporcionaba la concentración óptima, cómo se demuestra en la gráfica No. 10. Las lecturas fueron realizadas a 530 nm., ya que de acuerdo al espectro de absorción, gráfica No. 3, encontramos que la absorción máxima, se realizaba entre 530-540 nm.

La única modificación empleada por nosotros, fué la variación de la concentración de sustrato utilizado, ya que de acuerdo al método de Ravin H.A., éste, utiliza una concentración al 0.5 % y nosotros, encontramos que la concentración óptima era 10 veces menor, o sea la concentración al 0.05 %, según demostramos en la gráfica NO. 8.

A la comparación de los datos obtenidos, encontramos una variación marcada entre ellos, y observamos que al utilizar nuestra modificación, los valores concuerdan con los hallados por el método inmunológico, dónde encontramos, de acuerdo a la estadística empleada, $P = 0.1$ (Tabla 9), por lo que según esto, no observamos diferencia significativa entre los dos métodos.

En cuanto a la confiabilidad del método, representada en la tabla No. 4, observamos que $r = 0.987$, dándonos una confiabilidad de 97.4 %. La recuperación de acuerdo a lo expuesto en la tabla No. 5, el promedio fué de 90.6 %. La reproducibilidad del método, fué realizada con 30 determinaciones de un suero control, conteniendo 25.37 mg/100ml de la enzima, según se representa en la tabla No. 6, donde obtuvimos una desviación estándar de ± 0.36 mg/100ml y con un coeficiente de variación de 1.42 %. Lo que nos demuestra, que al estudio de los dos métodos (cobre sérico y ceruloplasmina), observamos en

ellos, tanto recuperación como reproducibilidad y por lo tanto, confiabilidad en ellos.

En la tabla No. 7, representamos 90 casos estudiados, de niños "clínicamente sanos", donde además de la determinación de cobre y ceruloplasmina, se hicieron las determinaciones de proteínas totales y transaminasas, con el fin de que no interfiriera la anormalidad de ellas en el metabolismo de cobre y de la ceruloplasmina. Este estudio, fué hecho con el propósito de obtener los valores normales tanto del cobre como de la ceruloplasmina, donde obtuvimos: valores de cobre de 114.42 ug/100ml con una desviación estándar de ± 11.76 ug/100ml, y para ceruloplasmina, encontramos una media de 33.21 mg/100ml con una desviación estándar de ± 2.93 mg/100ml. Así mismo, correlacionar los valores de cobre y ceruloplasmina, para determinar en un momento dado, si al estudio de uno de ellos, podría calcularse el otro parámetro. En este caso, encontramos una relación de cobre-ceruloplasmina de 0.34 %, lo que coincide con los datos reportados por Scheinberg y Sternlieb (21).

Por último, en las tablas Nos. 10 y 11 donde estudiamos un grupo de 70 pacientes con hipoproteïnemia y 23 pacientes con hepatitis, respectivamente; a la revisión de los datos obtenidos de acuerdo a la tabla No. 10, donde se encuentran los 70 niños con hipoproteïnemia, debido a la gran variación tanto de cobre como de ceruloplasmina, no nos fué posible, obtener una correlación constante entre ellos. El rango de valores obtenidos, fué para ceruloplasmina de 6.12-66.5 mg/100ml con una media igual a 19.78 mg/100ml. y para cobre, fué de 48-268 ug/100ml con un valor medio de 129.12 ug/100ml. En este grupo de niños estudiados, la hipoproteïnemia se acompañó en muchos -

casos, de trastornos de tipo hepático. En la tabla No. - 11, donde se agruparon 23 niños con hepatitis, también observamos gran variación en los datos obtenidos, por lo -- cuál, tampoco en este caso nos fué posible, correlacionar el valor de cobre contenido en la ceruloplasmina. Los valores encontrados, fueron de un rango de 64-400 ug/100ml - con una media de 191.9 ug/100ml para cobre, y de 8.31-58.1 mg/100ml con una media de 19.7 mg/100ml para ceruloplasmi- na.

R E S U M E N

- 1.- En nuestro estudio, se tratan generalidades sobre cobre y ceruloplasmina, así como su relación en distintos padecimientos.
- 2.- Se describen con detalle, los métodos de cobre (Zack B. y Landers J.W.), así como el de ceruloplasmina colorimétrico (Ravin H.A.) y el inmunológico (Hyland), en donde la única modificación hecha en el método de Ravin H.A., fué la concentración de sustrato empleada.
- 3.- Se reporta, el resultado de los estudios de cobre y ceruloplasmina, en cuanto a su sensibilidad, reproducibilidad, recuperación, espectro de absorción, desviación estándar y confiabilidad de acuerdo a -- las gráficas Nos. 2, 3, 5, 6, 7 y a las tablas Nos. 1, 2, 3, 4, 5, 6. También se reporta el estudio de la concentración óptima de sustrato (gráfica No. 8), el tiempo óptimo (gráfica No. 9), la concentración adecuada de suero (gráfica No. 10), la concentración óptima de azida de sodio (gráfica No. 11) y el pH óptimo (gráfica No. 12) para la enzima ceruloplasmina.
- 4.- Se estudiaron 90 sueros, de pacientes -- "clínicamente sanos", para obtención de los valores normales y la relación existente entre cobre y la ceruloplasmina, cuyos valores fueron de: cobre, 90-130 ug/-100ml de suero y ceruloplasmina, 26.3-38.2 mg/100ml de suero; y la relación de 0.34%.

- 5.- Se comparan, los métodos de Rovin H.A. colorimétrico y el inmunológico (Hyland), - para la determinación de ceruloplasmina, - en 60 casos.
- 6.- Se estudiaron 23 casos de niños con hepatitis, determinándoles cobre y ceruloplasmina.
- 7.- Se hizo el estudio de 70 niños con hipo--proteinemia.
- 8.- Se hace una breve discusión sobre los resultados obtenidos.

C O N C L U S I O N E S

Por los estudios hechos y los datos obtenidos, podemos decir que los métodos de cobre de Zack, B. y Landers J.W., así como el de ceruloplasmina de Ravin H.A., --son métodos confiables, que no presentan dificultades técnicas y que pueden llevarse a cabo en cualquier laboratorio de Química Clínica.

Además, que indistintamente puede utilizarse el método colorimétrico o el inmunológico, para la determinación de ceruloplasmina; y por último, que únicamente encontramos la correlación entre cobre y ceruloplasmina, en personas "clínicamente sanas", y que en las alteraciones --observadas, (hepatitis e hipoproteïnemia), en los pacientes estudiados, es conveniente realizar las dos determinaciones en ellos, ya que no encontramos una correlación entre el cobre y la ceruloplasmina.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Mattenheimer, H.
Micromethods for the Clinical and Biochemical Laboratory.
2nd. Edition.
Ann arbor science publishers inc.
Michigan (1971).
- 2.- Ravin, A. H.
An improved colorimetric enzymatic assay of Ceruloplasmin.
J. Lab. and Clin. Med. 58 , 161-68, 1961.
- 3.- Frieden, E.
The Biochemistry of Copper.
Scientific American 218, 5, 103-114, 1968.
- 4.- Hyland Immunoplate. Human Ceruloplasmin Test.
Carries list No. 085-134.
- 5.- Neale, F. C. and Fischer-Williams.
Copper Metabolism in normal adults and in clinically normal relatives of patients with Wilson's disease.
J. Clin. Pathol. 11, 441-47, 1950.
- 6.- Rice, E.W.
Spectrophotometric determination of serum Copper with oxalyldihydrazide.
J. Lab. Clin. Med. 55 , 325-28, 1960
- 7.- Adelstein, S. J. and Vallee, B. L.
Copper Metabolism in man.
New. Engl. J. Med. 265, 892-97, 941-46, 1961.



- 8.- Davies, I. J. T.
The Clinical Significance of the essential Biological-Metals.
William Heinemann Medical Books LTD.
London (1972).
- 9.- Turay, P., Szorady, I. and Kiss, J.
Some remarks on the relation between the serum bilirubin level and the Ceruloplasmin activity of New-Born - Babies suffering from icterus. *Enzymologia* 27, 281, 1964.
- 10.- Sundermann, F. W. Jr. and Nomoto, S.
Measurements of human serum Ceruloplasmin by it's -- p-Phenilenediamine Oxidase Activity.
Clinical Chemistry 16, 11, 1970.
- 11.- Haufťová, D., Slavíček, J., Fialová, J. and Vizinuva, H.
Serum Ceruloplasmin in acute viral hepatitis.
Gastroenterologia 108, 309-316, 1967.
- 12.- Pojerová, A. and Továrek, J.
Ceruloplasmin in Early Childhood
Acta Paediatrica 49, 113-120, 1960.
- 13.- Haufťová, D., Slavíček., J. and Fialová, J.
Serum Ceruloplasmin in Obstructive Jaundice.
Gastroenterologia 108, 317-323, 1967.
- 14.- Krishnamachari, K. A. and Kamala, S.
Ceruloplasmin activity in infants born to undernourished mothers.
The Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Commonwealth 79, 162-165, 1972.

- 15.- Walshe, J.M. and Briggs, J.
Ceruloplasmin in liver disease. A diagnostic Pitfall.
Lancet 757750: 263, 1963.
- 16.- Kasper, O. B. and Deutsch, H.F.
Immunochemical studies of Crystalline Human Ceruloplasmin and Derivatives.
The Journal of Biological Chemistry 238, No. 7, 1963.
- 17.- Curzon, C. and Speyer, B.
Inhibitors of Ceruloplasmin.
Biochem. J. 105, 243, 1967.
- 18.- Gault et Al.
Serum Ceruloplasmin in Hepatobiliary and other diseases: Significance of Abnormal values.
Gastroenterology 50: 8, 1966.
- 19.- Snedecor, G.
Métodos estadísticos aplicados a la investigación Agrícola y Biológica.
Compañía Editorial Continental, S.A.
México, (1964)
- 20.- Bancroft, H.
Introducción a la Bioestadística.
Editorial Universitaria de Buenos Aires.
Argentina (1965).
- 21.- Seligson, D.
Métodos Seleccionados de Análisis Clínicos.
Volumen IV.
Editorial Aguilar.
España (1972).