

24/194



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio sobre la Ceruloplasmina y su Posible Papel en el Metabolismo del Hierro de Conejos Hechos Anémicos por Sangrado.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
B I O L O G O
P R E S E N T A :

Marta Patricia Velázquez Ocampo

MEXICO, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



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 está 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.

I N D I C E

	Pág.
ANTECEDENTES	1
INTRODUCCION:	
I. Metabolismo del cobre	5
II. Ceruloplasmina. Características generales.	10
III. La actividad catalítica de la ceruloplasmi- na.....	19
IV. Funciones biológicas de la ceruloplasmina..	30
Objetivo.....	40
Materiales y métodos:	
Cuantificación de la actividad de cerulo--- plasmina.....	42
Cuantificación de la actividad de cerulo--- plasmina por un método modificado del de -- Curzon.....	46
Medición del efecto del Fe^{++} en la activi-- dad de ceruloplasmina del suero.....	49
Medición del efecto del Fe^{++} y Fe^{+++} en la- actividad de ceruloplasmina del suero.....	49

Medición del efecto del Cu^{++} en la actividad	
de la ceruloplasmina del suero.....	50
Estabilidad de la actividad de ceruloplasmi	
na en suero y plasma con y sin inhibidor...	50
Medición del efecto del EDTA en la activi--	
dad de la ceruloplasmina.....	51
Medición del efecto de la apotransferrina -	
en la actividad de la ceruloplasmina.....	52
Inducción de la anemia.....	52
Procesamiento de la sangre.....	53
Hemoglobina.....	54
Hematocrito.....	55
Conteo de células rojas.....	55
Determinación de hierro sérico.....	56
Resultados	60
I. Caracterización de la reacción de cerulo---	
plasmina con DPD:	
a.- Efecto del Fe^{++}	61
b.- Efecto del Fe^{+++}	66
c.- Efecto del Cu^{++}	71

	Pág.
d.- Estabilidad de la ceruloplasmina en el- suero.....	76
e.- Efecto del EDTA.....	76
II. Inducción de la anemia a conejos.	
a.- Valores hematológicos.....	85
b.- Actividad de ceruloplasmina del suero..	92
c.- Concentración de hierro sérico.....	96
Discusión.....	116
Resumen.....	130
Bibliografía.....	132

A N T E C E D E N T E S

La sangre es un líquido precioso para la vida. De ella depende un aporte adecuado de oxígeno y materias nutritivas para las células; transporta agua y electrolitos, con lo que mantiene el volumen de líquido corporal y el pH. La sangre transporta hormonas y enzimas, con lo que participa en la defensa del organismo contra los microorganismos.

Son múltiples los componentes de la sangre, desde células de diversos tipos hasta proteínas y metabolitos, todos los cuales tienen un papel específico e importante en el mantenimiento de la homeostasis del organismo. Uno de los principales elementos que intervienen en la formación de la sangre en los vertebrados es el hierro, el cual se encuentra unido a una proteína que lo almacena -- llamada ferritina. El hierro almacenado es utilizado en gran medida para la síntesis hemoglobina, la proteína encargada del transporte de oxígeno en la sangre. Para que el hierro llegue a los sitios en donde se lleva a cabo -

la síntesis de hemoglobina, es necesario liberarlo de la ferritina y hacerlo disponible para la transferrina, proteína encargada de su transporte.

El hierro es liberado por la ferritina en forma de ión ferroso, y la transferrina lo transporta en forma de ión férrico. Existe una controversia acerca de la forma en que el hierro es incorporado a la transferrina, ya que, mientras algunos autores indican que la ceruloplasmina - proteína con actividad de oxidasa - es necesaria para oxidar el hierro, previo a su incorporación a la transferrina, otros mantienen que la presencia de agentes quelantes del hierro como citrato y EDTA, así como el oxígeno libre, son suficientes para que la oxidación e incorporación de hierro a la transferrina se logre en su totalidad. Otros autores inclusive afirman que la propia transferrina puede funcionar como una ferroxidasa.

La ceruloplasmina es una metaloenzima que contiene cobre. Se estableció que existe una relación entre los metabolismos del cobre y del hierro cuando se descubrió -

que animales sujetos a una dieta deficiente en cobre desarrollaban anemia ferropriva, es decir, anemia por deficiencia de hierro.

El estudio del metabolismo del hierro es de suma importancia para elucidar los mecanismos de formación y regulación de la sangre. El laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias, donde se desarrolló el presente trabajo, tiene como objetivos estudiar el metabolismo del hierro y la formación de la sangre, tanto desde el punto de vista molecular como desde el punto de vista celular, comprendiendo los mecanismos leuco y eritropoyéticos. Como herramienta de trabajo se ha establecido un modelo experimental por medio del cual se induce la anemia a conejos por la remoción diaria de sangre. Esto estimula notablemente la eritropoyesis y permite el análisis de los cambios que ocurren a nivel celular y molecular en el organismo tratado.

Uno de los factores limitantes para la elevada producción de eritrocitos es el aporte adecuado de hierro, -

indispensable para la síntesis de hemoglobina. En el presente trabajo me he interesado por conocer el comportamiento de la ceruloplasmina a lo largo de la anemia inducida en el conejo para elucidar el posible papel que juega esta proteína dentro del metabolismo del hierro.

A continuación se presenta un resumen general de las proteínas que contienen cobre, para hablar después específicamente de la ceruloplasmina: sus características, su actividad catalítica y sus funciones biológicas, en especial la de movilización de hierro.

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

I. METABOLISMO DEL COBRE.

a.- Importancia del cobre para la vida.

El cobre es un elemento familiar para nosotros por el uso que le ha dado el hombre desde tiempos prehistóricos, sin embargo, no fue sino hasta hace unos doscientos años que se descubrió su presencia en la materia viva. Sin el cobre, que es un bioelemento, los animales y plantas no existirían; prueba de ello son las zonas de la Tierra carentes de cobre disponible que son incapaces de mantener la vida animal o vegetal. (1)

La concentración en que el cobre se encuentra en los organismos es mínima -del orden de miligramos para los humanos-, sin embargo, su carácter de cofactor de algunas enzimas importantes, lo hace indispensable.

El cobre posee ciertas características químicas que-

lo hacen efectivo como agente biológico. Estas son, en primer lugar, que forma quelatos muy estables con aminoácidos o proteínas, uniéndose con mayor fuerza que otros metales. En segundo lugar, el cobre tiene varios estados de ionización que favorecen sus funciones metabólicas; -- puede existir como átomo libre neutro, como ión cuproso o como cúprico, y puede pasar de un estado de ionización a otro por adición o liberación de un electrón, lo cual lo hace un magnífico aceptor o donador de electrones. Además, los compuestos con el cobre reducido son fácilmente oxidados por el oxígeno del aire, con lo que las enzimas reducidas recuperan su función con rapidez.

b.- Proteínas del cobre.

Entre las proteínas que contienen cobre como parte de su estructura molecular, hay diversidad de funciones: algunas lo transportan (ceruloplasmina), otras lo almacenan (metalotioneína), otras actúan en el transporte de -- oxígeno (hemocianina), y la gran mayoría tiene la función enzimática de oxidasa.

El mecanismo por el que actúan las oxidasas varía de una enzima a otra, pero la característica común es la reducción del Cu(II) a Cu(I), con la consiguiente remoción de electrones al sustrato, que por lo tanto es oxidado. - El Cu(I), en la mayoría de los casos es reoxidado por O₂ a su forma original de Cu(II). El número de átomos de cobre por molécula de enzima puede ser de 1, 2, 4 o máximo 6.

En la siguiente tabla se enumeran las proteínas del cobre más importantes, se menciona su función y el organismo o tejido en que se encuentran (2-7).

T A B L A I

PROTEINAS DEL COBRE

<u>PROTEINA</u>	<u>SITIO EN QUE SE ENCUENTRA</u>	<u>FUNCION</u>
Ceruloplasmina	Plasma de vertebrados	Ferroxidasa. Oxidación aminas -- biogénicas. Transporte de Cobre.

Metalotioneína	Hígado, riñón, intestino de vertebrados.	Almacenamiento de Cobre.
Hemocianina	Plasma de moluscos y artrópodos.	Transporte de O_2
Citocromo <u>oxi</u> dasas.	Prácticamente todas las células aeróbicas.	Oxidasa terminal.
Acido ascorbi <u>co</u> oxidasa.	Mayoría de plantas.	Oxidasa (de ascorbato a dehidroascorbato).
Laccasa	Arbol de laca.	Oxidación de -- aminas aromáticas y fenoles - Posible tipo - primitivo de <u>oxi</u> dasas que prote-- gía a aerobios - tempranos del -- exceso de O_2 .
Tirosinasa (monofenol monooxigenasa)	Insectos, plantas, -- piel, animal, melanoma.	Oxidación de tirosina. Forma--- ción de pigmen-- tos de la piel.- (melanina).
Dopamina β hidroxilasa (Dopamina β monooxigenasa)	Glándulas adrenales	Biosíntesis de - epinefrina.

Plastocianina	Algas, hojas verdes	Transferencia de electrones en la fotosíntesis.
Azurina	Bacterias (Bordetella)	Oxidación de -- agentes reductores, cisteína -- GSH.
Galactosa oxidasa.	Líquén	Oxidación de galactosa a galactohexodialdosa.
Amino oxidasas.	Suero animal, hígado	Oxidación de <u>am</u> inas y diaminas -- al aldehído co-- rrespondiente. Formación de -- H ₂ O ₂ .
Lisil oxid <u>a</u> sas.	Cartílago, aorta, pulmón, oviducto, piel, - tejido granulomatoso.	Oxidación de re- siduos de lisina e hidroxilisina- para terminar la síntesis de colá gena y elastina.
*Superóxido dismutasa.	Hígado, cerebro, eri-- trocitos.	Cataliza dismuta ción de radicales libres superóxido: $O_2^- + O_2^- \rightarrow O_2 + H_2O_2$

*Se ha acordado dar este nombre unificado a una serie de - proteínas provenientes de distintos órganos antes llama-- das hemocupreína, hepatocupreína, eritrocupreína y cere-- brocupreína, por tener todas la misma función.

II. CERULOPLASMINA. CARACTERISTICAS GENERALES.

Adentrémonos ahora en el estudio de una de las proteínas del cobre que más controversias ha provocado y que es el tema de estudio de este trabajo. Se trata de una proteína multifuncional que fué descubierta en 1944 por Holmberg y Laurell⁽⁸⁾ y que fue nombrada por ellos "ceruloplasmina" lo cual significa proteína azul del plasma.

Esta proteína se encuentra en la fracción de α -2 globulinas del suero de mamíferos y posee actividad de oxidasa.

Entre las principales características moleculares de la ceruloplasmina del suero humano tenemos las que se muestran en la Tabla II (9-12).

a.- Estado del cobre en la ceruloplasmina.

Aún no se tienen detalles acerca de la forma en que el cobre se une a la cadena proteica, aunque ésta unión -

podría darse con los residuos de cisteína (SH), de histidina (N) y de metionina. Esto se basa únicamente en la similitud de secuencias de aminoácidos que muestran la azurina y la plastocianina con la ceruloplasmina en la localización de estos aminoácidos. En este sitio se une el Cu(II) tipo 1, el cual es responsable del color azul de otras proteínas como ascorbato oxidasa, laccasa, azurina y plastocianina y podía serlo en la ceruloplasmina.

T A B L A I I

<u>CARACTERISTICA</u>	<u>V A L O R</u>
Peso molecular	132 000 dalton
No. de cadenas	1
Contenido de cobre	0.3± 0.03% (6 átomos por molécula)
Estado del cobre por E.P.R. (espectro de resonancia paramagnética)	Tipo 1 Cu(II) 2 átomos/molécula. Tipo 2 Cu(II) 1 átomo/molécula. Tipo 3 Cu(II) 2 átomos/molécula. Tipo 4 Cu(?) 1 átomo/molécula.

Contenido de Carbohidrato	7-8%
	Hexosa 3%, Fucosa 0.2%, Acetilhexosamina 2.4%, Ac. siálico 2.4% (9 ca denas/molécula).
Contenido de lípidos	0
Coefficiente de extinción:	
$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ a 610 nm	0.69 ± 0.01
$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ a 280 nm	15.0 ± 0.4
pH isoelectrónico	4.4
Constante de sedimentación	$7.1 s_{20}^w \times 10^{-13} \text{cm/seg-dina.}$
Movilidad electroforética	4.6 a pH 8.6 buffer -- barbital
Concentración en plasma humano	27-39 mg/100 ml.
Número de residuos de aminoácido	1065

Se ha demostrado (13, 14) que en la ceruloplasmina - aproximadamente un 43% de átomos de cobre son detectables por E.P.R. (espectro de resonancia paramagnética), y que de éstos, dos son del tipo 1 Cu(II) y uno del tipo 2 Cu - (II). Los tres átomos de cobre restantes no son detecta-

bles por EPR, y se postula que dos de ellos son del tipo-3 y que son el par del spin que se acopla a Cu (II) por analogía con otras oxidasas azules. El tercer cobre no detectable por EPR podría ser del tipo 4 Cu(I) o Cu(II) - que complete el contenido total de cobre (15).

Generalmente se acepta que sólo cuatro de los átomos de cobre son esenciales para el sitio activo, y que uno de los del tipo 1 y el del tipo 4 son los menos importantes (10).

b.- Peso molecular de la ceruloplasmina.

En los primeros trabajos de purificación y caracterización de ceruloplasmina se reportó un peso molecular cercano a 150 000. Sin embargo, en 1969, Magdoff-Fairchild- (16) reportaron un peso molecular de 132 000 basados en estudios de difracción de rayos X en ceruloplasmina cristalizada. Usando el método de sedimentación a equilibrio, Ryden (17) reportó un peso molecular de 134 000, y se ha aceptado un peso de este rango para esta proteína.

c.- Estabilidad de la cadena de ceruloplasmina.

La posibilidad de que la ceruloplasmina estuviera -- formada por subunidades fue considerada por algunos autores (18), lo mismo que la heterogeneidad de la ceruloplasmina en un mismo plasma (19). Sin embargo, en 1971, Ry-- den (20) demostró que los datos anteriores se debían a ma-- nipulación inadecuada de la proteína durante su purifica-- ción, ya que ésta es susceptible al ataque proteolítico - de la plasmina, proteína del plasma cuya función es la de romper coágulos.

Las plasmina (21,22) se forma a partir de plasminóge-- no, el cual debe ser escindido en un enlace arginina-vali-- na en la porción COOH terminal para dar lugar a dos cade-- nas. El sitio activo de la plasmina contiene serina e -- histidina, y tiene especificidad semejante a la tripsina. Rompe o hidroliza proteínas y péptidos en el enlace argi-- nil y lisil peptídico y ésteres de aminoácidos básicos y-- amidas.

Utilizando un inhibidor para esta enzima proteolítica, el ácido epsilon amino caproico (23), Ryden pudo purificar a la ceruloplasmina en una sola cadena y en una sola variedad. Al incubar esta proteína pura con tripsina demostró que se formaban fragmentos similares a los reportados en la literatura (17,24).

Basándose en datos inmunoquímicos, Lowenstein (25), propuso que la cadena de ceruloplasmina contiene un enlace peptídico lábil que es roto por la proteasa para formar dos péptidos enzimáticamente inactivos, con pesos moleculares de 93 000 y 24 000. Después de proteólisis parcial, la molécula es aún enzimáticamente activa, posiblemente debido a que los péptidos se mantienen unidos en su configuración nativa por enlaces intracadena no covalentes. La disociación y pérdida de actividad enzimática ocurre cuando estos enlaces secundarios son escindidos por tratamientos físicos como la electroforesis y la cromatografía en hidroxapatita o con sustancias como la urea.

c.- Biosíntesis de la ceruloplasmina.

La biosíntesis de la ceruloplasmina se lleva a cabo en el hígado. El cobre que es ingerido llega a este órgano por medio de complejos albúmina-cobre o histidiana-cobre, y aparece posteriormente en la circulación unido a ceruloplasmina en unas 24 horas. No se sabe exactamente cómo y cuándo es insertado el cobre en la proteína, pero esto ocurre solo en el hígado, ya que si sale apoceruloplasmina a la circulación, ésta no es capaz de incorporar cobre (26). Una vez que llega a la circulación, la ceruloplasmina tiene una vida media de 54 horas en el conejo (27), la cual es corta comparada con la de otras proteínas del plasma. En ratas se ha estimado una vida media de 12 horas, la cual es adecuada en proporción a la tasa de utilización de cobre por sus tejidos. Se ha demostrado que la supervivencia de la ceruloplasmina en el plasma depende de que esté intacto su contenido de ácido siálico (27). La desialización de la ceruloplasmina con neuraminidasa reduce la vida media de la asialoceruloplasmina a menos de media hora.

e.- Variación en los niveles de ceruloplasmina en el plasma.

La concentración de ceruloplasmina es baja en la rata neonata, pero se incrementa casi 15 veces hacia la tercera semana de vida (4), y a partir de entonces aumenta gradualmente. De manera similar, la concentración de ceruloplasmina es baja en el niño recién nacido y aumenta en forma marcada en los primeros dos años de vida. En el adulto normal la concentración de ceruloplasmina no varía apreciablemente (28).

En animales normocuprémicos y en los que tienen niveles elevados pero subtóxicos de cobre hepático, se sintetiza y libera ceruloplasmina a la circulación en forma -- constante, pero cuando la concentración del cobre hepático alcanza un nivel crítico, la síntesis de esta proteína se acelera en respuesta al aumento en la poza de cobre. (9)

Las hormonas son también importantes reguladoras de los niveles de ceruloplasmina en el plasma. Se ha obser-

vado que los esteroides de las glándulas adrenales incrementan la excreción biliar del cobre, con lo que disminuyen la concentración de cobre hepático y con ello la síntesis de ceruloplasmina. Concordantemente con lo anterior, los animales adrenalectomizados elevan significativamente sus niveles de ceruloplasmina, ya que al haber poca excreción biliar de cobre, la concentración de éste en el hígado aumenta (30). La hipofisectomía trae consigo resultados similares a la adrenalectomía (9), sin embargo, la administración de ACTH a ratas hipofisectomizadas, o corticosterona a animales adrenalectomizados evita el incremento en los niveles de ceruloplasmina.

Meyer (31), observa un incremento en la concentración de ceruloplasmina en el suero de ratas después de la administración de epinefrina, lo cual hace pensar en una relación entre la hormona y la proteína. En apoyo a lo anterior se ha visto que las ratas adultas elevan su concentración de ceruloplasmina después de estar sujetas al stress del ejercicio exhaustivo (32).

f.- La ceruloplasmina como proteína reactante de fase aguda.

Varios investigadores consideran a la ceruloplasmina como una proteína reactante de fase aguda (APR). Gordon (33), menciona que en pacientes sometidos a cirugía menor la concentración de ceruloplasmina se eleva en un 24%; -- sin embargo, aclara que se ha demostrado que la concentración de la gran mayoría de proteínas del plasma se incrementa por trauma en mayor o menor grado, y que, por lo -- tanto, no se puede trazar una línea divisoria entre las -- proteínas de fase aguda y las que no lo son.

III. LA ACTIVIDAD CATALITICA DE LA CERULOPLASMINA.

Vamos a analizar ahora la capacidad de la ceruloplasmina para actuar como oxidasa, mencionando los distintos sustratos que puede atacar.

Mc Dermott (34), propuso 3 grupos principales de sus

tratos para describir la acción de oxidasa de la ceruloplasmina:

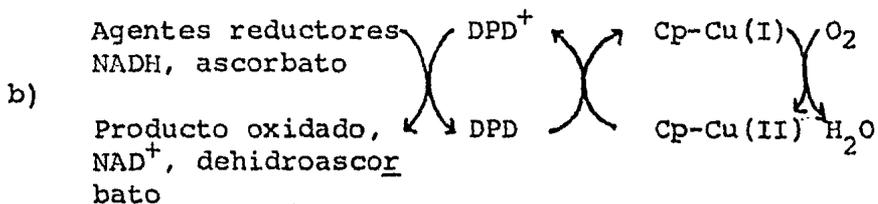
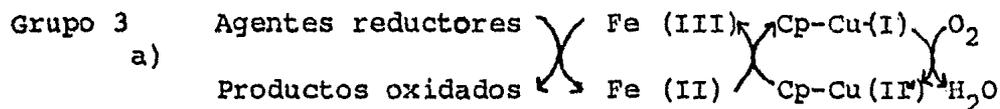
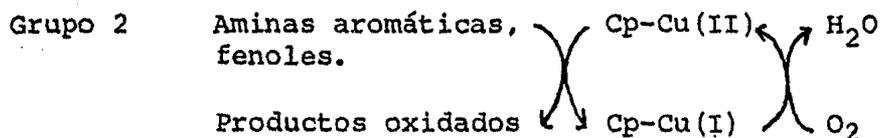
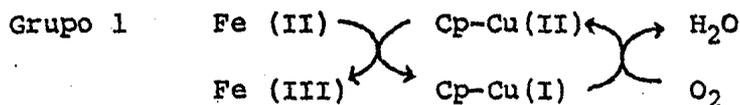
1.- Fe (II), el sustrato con la mayor V_{max} y menor K_m .

2.- Un extenso grupo de aminas aromáticas y fenoles que no dependen de trazas de iones de hierro para su actividad. Este grupo incluye a la epinefrina (adrenalina), norepinefrina (noradrenalina), 5-hidroxiindoles (serotonina), fenotiazinas, dopamina y fenildiaminas.

3.- Agentes reductores que pueden reducir rápidamente a Fe (III) como ascorbato, tioglicolato, cisteína, ferrocianato y DOPA. Estos compuestos no son directamente oxidados por la enzima, sino por una reacción acoplada -- Fe-Ceruloplasmina.

En la figura 1 se muestran los tres tipos de reacción:

FIGURA 1



Abreviaturas: Cp= ceruloplasmina. DPD= dimetilparafenilendiamina.

DPD⁺= dimetilparafenilendiamina oxidada.

Basándose en la función de ferroxidasa, se propuso -
 que el nombre de la enzima se cambiara a Ferro-O₂-oxido--
 rreductasa, y la Unión Internacional de Bioquímica le - -

asignó el número EC 1.16.3.1, aunque se ha conservado el nombre de ceruloplasmina por ser más familiar para todos.

a.- Actividad de ferroxidasa.

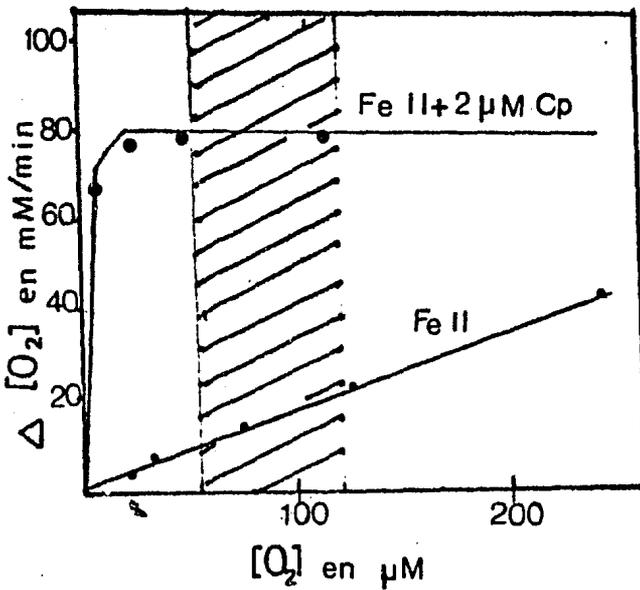
Analizaremos la primera reacción que se describe en la figura 1, considerada como la más importante ya que -- tiene implicaciones biológicas de relevancia que serán -- discutidas más adelante.

Osaki et al (35), estudiaron la oxidación de Fe (II) a pH 7.35 y con diferentes concentraciones de O₂) que simulan las condiciones fisiológicas del suero humano. Encontraron que la oxidación del Fe (II) por ceruloplasmina es de orden cero con respecto al oxígeno (10 a 200 μM), -- mientras que la oxidación no enzimática es de primer or-- den. (Figura 2)

Esto demuestra que, en las condiciones en que normalmente hay salida de Fe (II) que debe ser oxidado a Fe -- (III) para incorporarse a la transferrina, la oxidación -

enzimática es independiente de la concentración de O_2 del medio y es unas 5 veces más rápida que la no enzimática.

FIGURA 2



En la gráfica se aprecia el efecto de la concentración de oxígeno sobre la tasa de oxidación enzimática (\bullet) y no enzimática (\circ) de $Fe(II)$ a $30^\circ C$. El consumo de - -

oxígeno por minuto está graficado contra varias concentraciones de oxígeno. La mezcla de incubación contenía 70 μ M de sulfato ferroso de amonio en buffer de fosfatos - - 0.0133 M pH 7.35 con o sin ceruloplasmina. La parte sombreada de la figura indica el rango de concentración de oxígeno en la vena humana (mínimo) y arteria (máximo). Tomado de Osaki et al (35).

Estudios posteriores de la cinética de la reacción de ferroxidasa mostraban dos valores diferentes de K_m para una sola molécula de enzima, lo cual condujo a la idea de que había dos sitios activos en ésta (36).

Experimentos desarrollados por Huber (37) demostraron que hay un solo sitio activo, y que hay un mecanismo de activación por el sustrato, es decir, que el Fe (II) se une a la molécula de enzima y la convierte en enzima activada.

Huber (38), investigó también el efecto de cationes en la actividad de ferroxidasa y encontró en general que

los divalentes la aumentan y los trivalentes la inhiben.

b.- Sustancias con posible actividad de ferroxidasa.

Se ha propuesto que la ceruloplasmina no es la única proteína del suero con actividad de ferroxidasa.

Ferroxidasa II.

En 1970, Topham (39), aisló por primera vez una proteína del suero a la que llamó ferroxidasa II y que difiere de la ceruloplasmina en que su color es amarillo y no azul, además de no ser inhibida por azida y no tener actividad con parafenilendiamina. Esta proteína parece tener un peso molecular mayor a 800 000 y 12 nmoles de cobre -- por miligramo de proteína.

Existe controversia con respecto a la actividad de ferroxidasa de esta proteína, ya que Sexton (10) sugiere que sea una beta lipoproteína peroxidada cuyo poder reductor hacia Fe (II) es inducido durante su aislamiento y al

macenamiento, mientras que Garnier (40) compara la actividad de Ferroxidasa II con lecitina peroxidada y demuestra que la primera es cuatro veces más activa.

Quelantes del hierro.

Existen algunos agentes que también parecen tener un papel importante en la oxidación de Fe (II), como el citrato, apotransferrina y apoferritina.

Lee (41), reporta al citrato como un factor con actividad de ferroxidasa que puede llevar a cabo aproximadamente un 15% de la actividad de ferroxidasa en el suero humano normal y un 100% en suero con bajos niveles de ceruloplasmina (enfermedad de Wilson).

Bates (42), considera que la apotransferrina, en presencia de HCO_3^- y O_2 es capaz de facilitar la oxidación de Fe (II) con la formación de Fe^{3+} -Transferrina- CO_3^{2-} . El propone una forma intermedia de Fe^{2+} -Transferrina- CO_3^{2-} que es susceptible a oxidación por O_2 y menciona que aun-

que la ferroxidasa no es un requerimiento para la oxidación de este complejo es posible que la facilite.

Rama y Crichton (43), por su parte, reportan que la apotransferrina tiene baja afinidad por el hierro que ha sido oxidado por ceruloplasmina. Más aún, que la ceruloplasmina no tiene ningún efecto en la transferencia de hierro entre ferritina y apotransferrina, y que el único posible papel para la ceruloplasmina sería catalizar la formación de transferrina cuando el ión ferroso ya está un complejo con la apotransferrina.

c.- Evidencia a favor de la ceruloplasmina como única ferroxidasa efectiva del suero.

En contraste, Harris y Aisen (44), demostraron que la tasa de oxidación de Fe (II) por O₂ atmosférico a pH 7 efectivamente era favorecida por agentes de bajo peso molecular que forman complejos con el hierro: EDTA > NTA > Citrato > Fosfato > Oxalato y que la apotransferrina tenía una capacidad semejante a la del citrato para promover la

oxidación del Fe (II), pero ésta está basada únicamente en el efecto de formar un complejo con el hierro y no en una verdadera actividad de ferroxidasa.

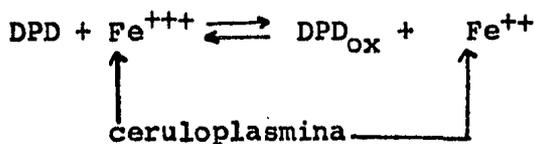
Además, Frieden (9), reporta que la albúmina a concentraciones mayores a 25 μ M, disminuye rápidamente la tasa de oxidación de Fe (II) en presencia de concentraciones fisiológicas de bicarbonato, citrato y apotransferrina, y parece no tener efecto sobre la oxidación de Fe (II) catalizada por ceruloplasmina. La adición de ceruloplasmina tiene el efecto de incrementar de 13-44 veces la tasa de oxidación no enzimática del Fe (II) y la tasa de formación de Transferrina-Fe (III) aún en presencia de 0.6-1.2 mM de albúmina. Estos datos sugieren que la ceruloplasmina es la única ferroxidasa efectiva en el suero.

d.- Actividad de la ceruloplasmina como oxidasa de otros sustratos.

Como se vio en la figura 1, el segundo grupo de reacciones que cataliza la ceruloplasmina es la oxidación de

aminas aromáticas y fenoles. Entre ellos, uno de los primeros sustratos que se estudiaron fué el N,N, dimetil-pa-rafenilendiamina (DPD), por dar éste un producto oxidado-colorido que facilita la cuantificación de actividad de -oxidasa del suero (45). Esta reacción ha sido ampliamente utilizada, ya que, debido a la baja concentración en -que la ceruloplasmina se encuentra en el suero y a su alta labilidad, no siempre es posible purificarla para preparar anticuerpos específicos y así hacer una cuantificación inmunológica.

Posteriormente Curzon (46,47) encontró que el Fe^{++} - y el Fe^{+++} en menor medida parecen incrementar la actividad de oxidasa de la ceruloplasmina sobre el DPD. Este - autor sugirió que la ceruloplasmina oxida el Fe^{++} a Fe^{+++} , y que este último es capaz de oxidar al sustrato DPD in-crementando así la cantidad de producto oxidado.



En base a lo anterior se ha recomendado el uso de --
agentes quelantes de Fe^{++} para evitar la activación de la
reacción y por lo tanto resultados más altos de los rea--
les.

Young y Curzon (48) demostraron que, la ceruloplasmi
na tiene un solo sitio de unión para DPD, es decir, que --
la ceruloplasmina tiene un solo sitio activo en el que --
puede entrar Fe^{++} o DPD o cualquiera de los otros sustra--
tos sobre los que actúa ésta enzima, y que el Fe^{++} es ca--
paz de activar a la ceruloplasmina haciendo que aumente --
su velocidad de reacción sobre cualquiera de sus sustratos.

IV. LAS FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA CERULOPLASMINA.

Llegamos ahora al tema de las funciones biológicas --
de la ceruloplasmina, y en especial vamos a enfocarnos a --
la función de ferroxidasa, aunque también se mencionan --
otras funciones que se han encontrado para esta proteína--
y que son de importancia.

a.- Mobilización de hierro.

En 1966, Osaki et al (35), propusieron por primera vez que la ceruloplasmina podía tener un papel importante en la conversión de Fe (II) a Fe (III), promoviendo la tasa de incorporación de este último a la apotransferrina.- Esta idea sugiere por lo tanto una relación entre el metabolismo del hierro y el del cobre.

Una de las observaciones que apoyaban la proposición anterior era el hecho de que la mayoría de mamíferos que eran sometidos a una dieta deficiente en cobre desarrollaban una anemia ferropriva severa aún cuando los sitios de almacenamiento de hierro fueran normales y se suplementara hierro oral o intramuscularmente.

Roeser et al (49) administraron ceruloplasmina a cerdos en las condiciones antes descritas y encontraron un rápido incremento en la concentración de hierro en plasma. El incremento era proporcional al logaritmo de la dosis de ceruloplasmina administrada. La administración de

cobre inorgánico inducía también un incremento en la concentración de hierro en plasma, pero sólo después de que la ceruloplasmina aparecía en la circulación. La administración de asialoceruloplasmina, que es rápidamente removida del plasma, casi no tenía efecto en la concentración de hierro plasmático, lo cual indicaba que la ceruloplasmina lleva a cabo su función en el plasma.

Osaki et al (50), visualizaron la movilización de -- hierro por la ceruloplasmina al perfundirla en una solución amortiguadora sin otras proteínas del plasma a hígado de cerdo y perro y observar la formación de Transferrina-Fe (III) en el perfundido. La administración de apo-- transferrina 30 μM veinticinco minutos antes de perfundir la ceruloplasmina no provocaba la salida de hierro ni lo hicieron HCO_3 , 10 μM de CuSO_4 , 5 mM de glucosa, 0.6 mM de fructosa, 120 μM de citrato o 36 μM de BSA + 21 μM CuSO_4 . Ellos observaron también que la respuesta de salida de -- hierro debida a la administración de ceruloplasmina se da sólo cuando los niveles de esta eran bajos, ya que en animales con niveles normales de esta proteína no se veía

un efecto de salida de hierro al inyectarla.

La concentración mínima de ceruloplasmina necesaria para remover hierro en el hígado perfundido era de 4 nM y la saturación ocurrió a 0.2 μ M, lo cual equivale al 10% del nivel normal de esta enzima en humanos. Esto significa que la enzima existe en exceso para tener únicamente la función de ferroxidasa.

Planas (51) mantuvo a gallos con una dieta deficiente en cobre y hierro por 17 días. Sus valores de hemoglobina, hematocrito, hierro y actividad de ferroxidasa se reducían considerablemente. Después de 40 días con esta dieta llegaban a una pérdida total de actividad de ferroxidasa. La suplementación con cobre era suficiente para restablecer concentraciones normales de hierro sérico.

Frieden, basado en la evidencia anterior, propone el siguiente mecanismo para explicar el papel de la ceruloplasmina como eslabón entre el metabolismo del hierro y del cobre.

FIGURA 3

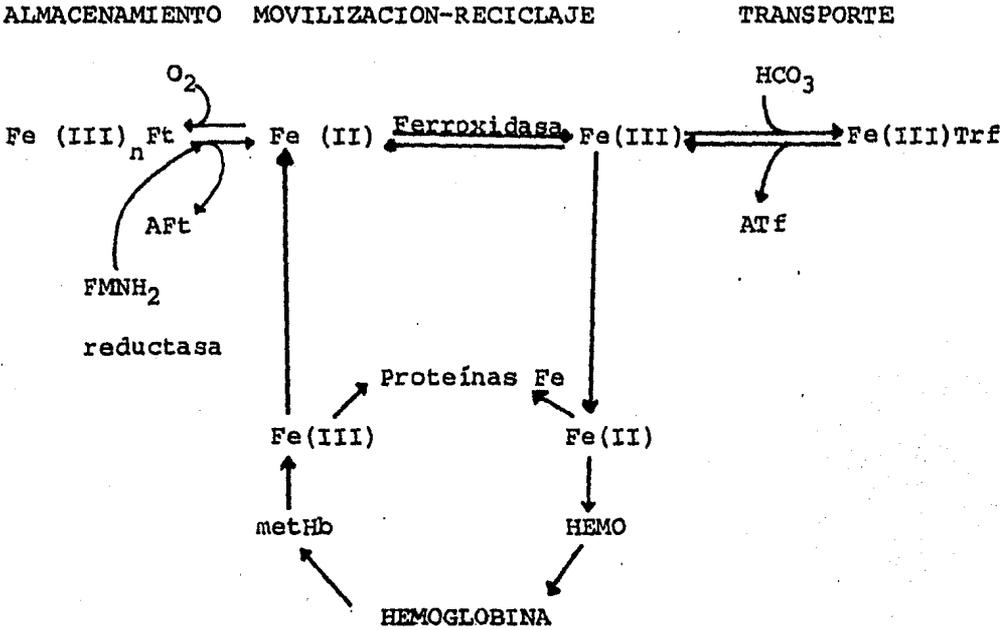


FIGURA 3.- Papel central de la ceruloplasmina (ferroxidasa) en la movilización y transporte de hierro. Se muestran los ciclos de Fe (II) a Fe (III) en relación al metabolismo de la hemoglobina, el principal compuesto de hierro de los vertebrados. Ft. - Ferritina, Aft apoferritina, Tf transferrina - - ARf, apotransferrina. Tomado de Frieden (10).

La ceruloplasmina podría estar jugando un papel importante en el control de la liberación de hierro de sitios de almacenamiento hacia la transferrina para su utilización en la biosíntesis de hemoglobina.

b. - Transporte de cobre.

Como se dijo antes, el cobre que es ingerido en la dieta se absorbe a nivel del estómago y duodeno (4) y es inmediatamente tomado por la albúmina y algunos aminoácidos como histidina y treonina para ser transportado en el plasma en forma de complejo ternario albúmina-Cu⁺⁺-aminoácido (52); de esta manera llega al hígado y es incorporado a la ceruloplasmina.

Existen sin embargo evidencias de que la ceruloplasmina podría ser una proteína transportadora de cobre: Una de ellas es su presencia en tejidos como corazón, bazo, riñón, páncreas y cerebro independientemente de los restos de sangre que pudieran contener estos tejidos (52). Más aún, Cambell (53), administró a ratas⁶⁷ Cu(NO₃) y - -

^{67}Cu -Ceruloplasmina, y encontró que si bien la mayor parte de la radioactividad entraba al hígado en una hora, -- tiempo después ésta llegaba a diversos tejidos, los cuales mostraban diferencias en avidez por el cobre proveniente de ceruloplasmina o de cobre iónico: mientras que corazón, bazo y cerebro preferían a la ceruloplasmina, el riñón prefería al cobre iónico. La ceruloplasmina también es absorbida por los tejidos de la rata, pero con menor velocidad que el cobre, lo cual se determinó por la administración de ^3H -leucina-ceruloplasmina incorporada in vivo o ^{125}I -ceruloplasmina marcada in vitro.

Hsieh (54), mantuvo a ratas con una dieta deficiente en cobre por 8 semanas y encontró en ellas un decremento en la actividad de citocromo c oxidasa en corazón, bazo, hígado, pulmón y páncreas, pero ningún cambio en riñón y cerebro. Tres inyecciones de ceruloplasmina humana o de rata en un período de 5 días incrementaron considerablemente la actividad de citocromo c en bazo, hígado, corazón y pulmón. La administración a otras ratas de CuCl_2 , Cu-histidina y Cu-albúmina produjo un incremento menor y

más lento en la actividad de esta enzima comparada con -- las ratas tratadas con ceruloplasmina.

Evans (4), postula que, ya que el cobre de ceruloplasmina no se puede disociar, el intercambio de cobre entre ceruloplasmina y tejidos extrahepáticos involucra probablemente un mecanismo degradativo ya sea en la membrana de la célula o dentro de ésta. Posiblemente los complejos de albúmina-cobre contribuyen también como fuentes -- del metal en tejidos extrahepáticos.

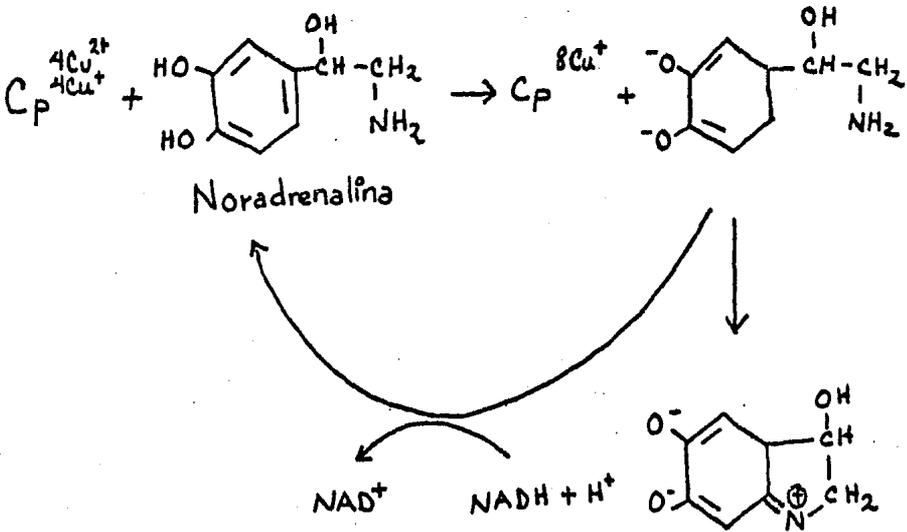
c.- Regulación de aminas biogénicas.

Como se había mencionado antes, la ceruloplasmina es capaz de oxidar a algunas aminas biogénicas importantes, -- entre ellas a la adrenalina y a la noradrenalina que son hormonas del tipo de las catecolaminas y que funcionan en respuesta a situaciones de urgencia produciendo una gran variedad de respuestas fisiológicas. La ceruloplasmina -- también oxida a la 5 hidroxitriptamina o serotonina, la cual es un vasoconstrictor que es transportado en la san-

gre por las plaquetas para ser liberado al suero durante la coagulación, por acción de la trombina.

El mecanismo propuesto para la oxidación de la noradrenalina por la ceruloplasmina es el siguiente:

FIGURA 4



Mecanismo de acción de la ceruloplasmina.

Tomado de Barras (55).

El mecanismo de oxidación de la serotonina es similar.

Barras (55), estudió algunas drogas que actúan sobre el sistema nervioso central desde el punto de vista de su efecto sobre la actividad de oxidasa de la ceruloplasmina y encontró que compuestos como el LSD que provocan aumento en los niveles cerebrales de serotonina y depresión en noradrenalina provocan una inhibición en la oxidación de serotonina por ceruloplasmina y aceleran la oxidación de noradrenalina por esta enzima. El encontró también que la oxidación de noradrenalina y serotonina por ceruloplasmina se ve acelerada por el efecto de tranquilizantes de tipo fenotiazinas, y que algunas otras fenotiazinas sin propiedades de tranquilizante no tienen efecto sobre esta reacción.

Estos resultados indican que la ceruloplasmina, o una enzima con propiedades similares juega un papel importante en la regulación de los niveles de estas hormonas, y por lo tanto en el mantenimiento del funcionamiento mental normal, y que la interferencia con esta enzima puede conducir a la aparición de estados mentales anormales.

O B J E T I V O

He revisado en la sección anterior el posible papel de la ceruloplasmina en el metabolismo del hierro, específicamente en la movilización de hierro de los sitios de almacenamiento para facilitar su incorporación a la transferrina y la controversia que aún existe al respecto.

Teniendo en cuenta la importancia de esta posible relación entre el metabolismo del cobre y el del hierro, me he interesado en conocer el comportamiento de la ceruloplasmina en condiciones en que se requiere aumentar la movilización de hierro para la síntesis de hemoglobina. Estas condiciones se dan cuando se induce anemia a conejos por sangrado diario, ya que se estimula la eritropoyesis y por lo tanto la síntesis de hemoglobina (59).

La cuantificación de la ceruloplasmina puede llevarse a cabo inmunológicamente o por medición de su actividad enzimática. En este caso, por no disponerse de los anticuerpos específicos contra la ceruloplasmina, se cuan

tificó la actividad enzimática de ésta en el suero de conejo durante el desarrollo de la anemia.

La cuantificación se hizo en base a una reacción colorida específica de la ceruloplasmina que ha sido utilizada ampliamente para determinar la cantidad de ceruloplasmina en suero o preparaciones purificadas.

Se llevaron a cabo algunas pruebas preliminares, para demostrar la confiabilidad de este método y posteriormente se procedió a la cuantificación de la ceruloplasmina en el suero de conejos anémicos.

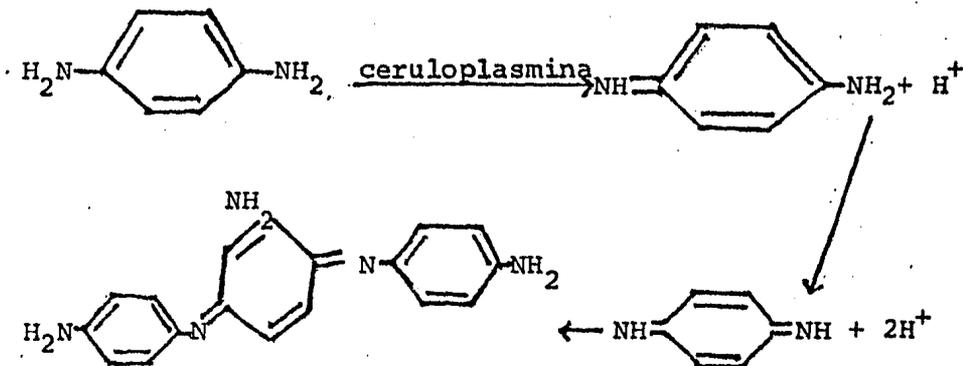
Se midió también la concentración de hierro en el suero de conejos anémicos con el objetivo de relacionarlo con las mediciones de ceruloplasmina sérica.

MATERIALES Y METODOS

CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE CERULOPLASMINA.

Como se mencionó antes, la ceruloplasmina es capaz - de oxidar a algunos compuestos aminados, entre ellos a la parafenilendiamina. Esta reacción de oxidación es un reflejo directo de la actividad de ferroxidasa de la ceruloplasmina del suero (56) y ha sido ampliamente utilizada - para la cuantificación de la actividad de ceruloplasmina - del suero, debido a que el producto oxidado tiene un color rosa fácilmente detectable en el espectrofotómetro. - La reacción que ocurre es la siguiente: (57)

FIGURA 5



Base de Bandrowski.

Secuencia de reacciones oxidativas por las cuales la ceruloplasmina se convierte a p-fenilendiamina (DPD) en la base de Bandrowski identificada por Rice como el último producto de oxidación.

La reacción anterior sirvió de base a Curzon (45), para establecer un método de cuantificación de actividad de ceruloplasmina en el suero, el cual fue utilizado en el presente trabajo para algunas determinaciones.

Se puede utilizar suero completo o muestras con ceruloplasmina parcial o totalmente purificada. La ceruloplasmina reacciona con el sustrato DPD en un buffer de acetato 0.2 M de pH 5.5, en el cual la reacción es óptima y se incuba a 37°C durante 15 minutos. Por las condiciones establecidas en este método, en el que hay un exceso de sustrato, la aparición de producto oxidado es lineal a través del tiempo hasta los 25 minutos (43), por lo que si la reacción se detiene a los 15 minutos se pueden observar claramente las diferencias debidas a la concentración de enzima.

La reacción se detiene con una solución helada de azida de sodio 0.3 mM, la cual es potente inhibidora de la ceruloplasmina (38). Cuando se trabaja con suero o muestras poco puras de ceruloplasmina, se agrega la azida de sodio en una solución de cloruro de sodio al 10% para evitar la aparición de turbidez en las muestras, y se mide la absorbancia a 550 nm lo más pronto posible debido a que éste decrece rápidamente.

Los pasos que se siguieron para la reacción de cuantificación son los siguientes:

1.- Es importante primeramente que el material utilizado para la determinación esté libre de hierro, para lo cual se lavó con una solución al 37% v/v de HCl y se enjuagó con agua seguida de agua desionizada. El agua desionizada se preparó pasando agua destilada comercial a un desmineralizador Corning LD 2A, alcanzando una pureza de 1 megaohm/cm.

2.- Se preparó la siguiente mezcla de incubación:

- a).- 2 ml buffer acetatos 0.2M pH 5.5.
- b).- 1 ml agua desionizada.
- c).- 1 ml N,N dimetilparafenilendiamonio dicloruro -
(DPD) 1.7 mM.
- d).- 1 ml dilución de suero en cloruro de sodio 0.1 M

Todas las soluciones utilizadas en la determinación -
se prepararon con agua desionizada.

3.- Se incubó 15 minutos a 37°C en un baño de tempe-
ratura constante Grant, tomando como tiempo cero el momento
en que se agregaba el sustrato (DPD) a la mezcla de incu
bación.

4.- Se paró la reacción agregando 2 ml de azida de -
sodio 0.3 mM helada diluída en NaCl 10%.

5.- Se leyó la absorbancia a 550 nm en un espectrofoto
tómetro Zeiss PMQ II y se descontó para cada lectura la -

absorbancia de un tubo blanco que contenía todos los reactivos excepto el suero.

CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE CERULOPLASMINA POR UN METODO MODIFICADO DE CURZON.

Se hizo necesario modificar el método anterior para algunas de las mediciones debido a que se sabe que es de suma importancia eliminar trazas de hierro que aumentan la reacción de ceruloplasmina con DPD y que conducen a resultados más elevados que los reales en la actividad de ceruloplasmina del suero (46).

Se tomaron entonces algunas de las modificaciones -- que Lovstad (36) utiliza en un experimento de cuantificación de actividad de ceruloplasmina de suero para estudios de la cinética de la reacción de esta enzima con DPD.

Las modificaciones que se hicieron son las siguientes: a) Agregar ortofenantrolina 1 mM, (quelante específico para el hierro) al buffer de acetatos 0.2M pH 5.5 --

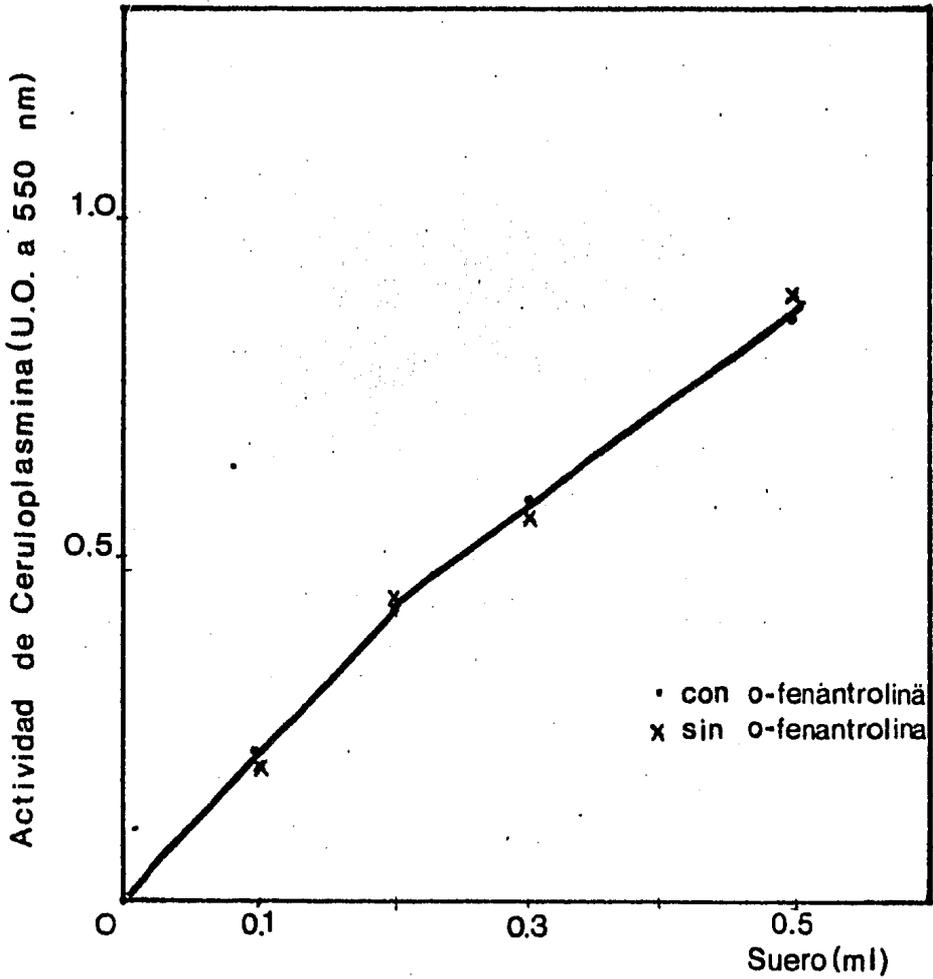
que se utiliza para la mezcla de incubación del método de Curzon. La solución de buffer con ortofenantrolina era preparada al momento debido a que un agente oxidante, posiblemente H_2O_2 se forma al almacenarla (36).

b) La solución de DPD se preparó disolviéndolo en agua desionizada que contenía 5 mM de EDTA, ya que el DPD es oxidado por trazas de metales presentes.

Por lo demás, el método se mantuvo sin cambios. Se hizo una prueba con ambos métodos usando concentraciones crecientes del mismo suero para encontrar hasta qué límite la reacción es directamente proporcional a la actividad de ceruloplasmina del suero. Esta prueba se hizo también para demostrar que la ortofenantrolina y el EDTA no interfieren con la reacción.

Se obtiene la siguiente curva: (GRAFICA I)

De acuerdo con los datos anteriores se utilizó en todos los experimentos posteriores el suero en concentración de 0.1 ml diluído con 0.9 ml de NaCl 0.1M debido a que se ve que hay linealidad en esa parte de la curva patrón.



Gráfica 1.-Actividad de ceruloplasmina en amortiguador con y sin ortofenantrolina y diferentes concentraciones de suero.

MEDICION DEL EFECTO DE HIERRO (II) EN LA ACTIVIDAD DE CERULOPLASMINA DEL SUERO.

Se utilizó hierro en la forma de sulfato ferroso de amonio 4mM disuelto en agua desionizada y se agregó a la mezcla de incubación del método de cuantificación de ceruloplasmina modificado o sin modificar sustituyendo una -- parte del agua desionizada por solución de hierro.

MEDICION DEL EFECTO DEL HIERRO (II) Y HIERRO (III) EN LA ACTIVIDAD DE CERULOPLASMINA DEL SUERO.

Se utilizó sulfato ferroso de amonio 1 mM y sulfato férrico de amonio 1 mM. A este último se le agregó HCl - en proporción 5 mM en 1M de Fe^{+++} para mantener el pH bajo y evitar la formación de complejos de Fe^{+++} que ocurre a pH mayor a 5 (46).

La solución respectiva de hierro se agregó justamente al momento de iniciar la reacción sustituyendo una parte de agua desionizada de la mezcla de incubación del mé-

todo no modificado de Curzon para cuantificación de ceruloplasmina en suero.

MEDICION DEL EFECTO DEL COBRE⁺⁺ EN LA ACTIVIDAD DE CERULOPLASMINA DEL SUERO.

Se agregó cobre en forma de sulfato de cobre en una solución 50 mg/100 ml de agua desionizada sustituyendo -- una parte del agua desionizada de la mezcla de incubación del método de Curzon no modificado.

ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD DE CERULOPLASMINA EN SUERO Y PLASMA CON Y SIN INHIBIDOR.

Se sangró por punción intracardiaca a un conejo Nueva Zelanda blanco en estado aparentemente normal y que -- nunca antes había sido sangrado.

Se tomaron 20 ml de sangre y se repartieron en cuatro muestras de 5 ml cada una. Las muestras se repartieron de la siguiente forma:

- 1.- Con EDTA al 20% pH 7.4
- 2.- Con EDTA al 20% pH 7.4 + inhibidor de frijol de soya.
- 3.- Desfibrinada
- 4.- Desfibrinada + inhibidor de frijo de soya.

El inhibidor de frijol de soya se agregó a las muestras diluido en NaCl 0.9%; 2mg inhibidor/0.5 ml NaCl 0.9%.

Las cuatro muestras se mantuvieron en hielo y se centrifugaron a 2600 rpm (1300 g) en una centrífuga clínica Adams-Dynac con cabezal de columpio CT-1350 durante 30 minutos y se obtuvo para las dos primeras el plasma y para las dos restantes el suero. Se midió la actividad de ceruloplasmina por el método modificado de Curzon ese mismo día y 30 días después. En el intervalo las muestras se mantuvieron en congelación.

MEDICION DEL EFECTO DEL EDTA EN LA ACTIVIDAD DE CERULO---
PLASMINA.

Se agregó EDTA (ácido etilendinitrilotetracético) en una solución de 5 mg/ml en agua desionizada a la mezcla de incubación del método de Curzon modificado para la - - cuantificación de ceruloplasmina en suero, sustituyendo - parte del agua desionizada que se utiliza en la determina-
ción.

MEDICION DEL EFECTO DE LA APOTRANSFERRINA EN LA ACTIVIDAD DE CERULOPLASMINA.

Se agregaron aproximadamente 0.4 mg de apotransferri-
na a 100 µl de suero y posteriormente se cuantificó la ac-
tividad de ceruloplasmina por el método modificado de Cur-
zon.

INDUCCION DE LA ANEMIA.

Se utilizaron cuatro conejos Nueva Zelanda blancos, -
machos, (Oryctolagus cuniculus) nacidos en el bioterio de
la Facultad de Ciencias UNAM, de 90 días de edad y de la
misma camada. Su alimentación consistió en conejina dia-

riamente "ad libitum" y zanahoria y lechuga tres veces -- por semana. Se pesaron varias veces a lo largo de su crecimiento y un día antes de iniciar el experimento.

Se sangraron por punción intracardiaca con jeringas de vidrio de 30 ml enjuagadas con NaCl 0.9%, extrayéndose les 10 ml de sangre por kilogramo de peso diariamente durante 15 días.

PROCESAMIENTO DE LA SANGRE.

La sangre extraída a los conejos se repartió en dos muestras: la primera, de aproximadamente 5 ml se colocó en una matraz con unas gotas de EDTA al 20% pH 7.4 y se sumergió en hielo después de haber agitado ligeramente. El resto de la sangre se colocó en un matraz con perlas de vidrio y se desfibrinó por agitación.

La primera muestra de sangre se utilizó para la determinación de parámetros hematológicos: hemoglobina, hematocrito y número de células rojas. La segunda fue cen-

trifugada a 2800 rpm (1300 g) durante 30 minutos en una -
centrífuga clínica Adams-Dynac con cabezal de columpio --
CT-1350. El suero se colectó por separado para cada cone-
jo y para cada día, manteniéndose en congelación para ser
usado en la determinación de la actividad de ceruloplasmí-
na por el método modificado de Curzon.

HEMOGLOBINA.

La concentración de hemoglobina de la sangre se obtu-
vo por el método de cianometahemoglobina (58), utilizando
una dilución 1:200 de sangre en el diluyente de Drabkin -
que contiene 1 g NaHCO_3 , 50 mg KCN y 200 mg $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en
1 lt de agua destilada.

El ferricianuro convierte al hierro de la hemoglobi-
na de ferroso a férrico y se forma metahemoglobina que se
combina entonces con el cianuro de potasio y forma un pig-
mento estable que es la cianometahemoglobina.

La dilución se lee a 540 nm en un espectrofotómetro-

Zeiss PMQ III y para los cálculos de concentración se considera el peso molecular de la hemoglobina de 66 000 g/mol y el coeficiente de extinción milimolar de ésta a 540 nm como 44.u.o./ml.

HEMATOCRITO.

El volumen que ocupa el paquete celular después de centrifugar la sangre expresado en porcentaje del volumen total se conoce como hematocrito. Este fue determinado usando tubos capilares sellados por uno de sus extremos y centrifugándolos durante 30 minutos a 2800 rpm (1300 g) en una centrífuga clínica Adams-Dynac con cabezal de lumpio CT-1350.

CONTEO DE CELULAS ROJAS.

El número de células en las muestras se determinó en un contador electrónico Haema-Count MK-2S y cada una de las mediciones se hizo por duplicado. Se tomaron 20 ml de sangre y se diluyeron en 16 ml de ISOTON (NaCl 7.93 --

gr/lt, EDTA 0.38 gr/lt., KCl 0.40 gr/lt, NaH_2PO_4 0.19 --
gr/lt y Na_2HPO_4 1.95 gr/lt). De esta primera dilución --
1:800 se tomaron 100 ml y se llevaron a un volumen de 10
ml de ISOTON. Esta última muestra con una dilución de --
1:80 000 sirvió para determinar el número de células ro--
jas, que se expresó por el contador como número $\times 10^6/\text{mm}^3$.

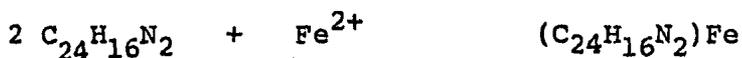
DETERMINACION DE HIERRO SERICO.

El hierro sérico está unido a proteínas siderófilas--
como la transferrina. En un amortiguador de fosfatos li-
geramente ácido se separa de ésta y queda en solución. -
Si se usa una solución 1 N de HCl, éste hierro es removi-
do completamente. Una vez liberado el hierro, se precipi-
ta a las proteínas séricas con TCA 3M para eliminar inter-
ferencias por dispersión debidas a los componentes séri--
cos, se centrifuga y se toma el sobrenadante, en el cual-
se encuentra el hierro libre. Este último es reducido --
con ascorbato de sodio y se pone a reaccionar con batofe-
nantrolina, con lo que se forma un compuesto colorido que
puede ser determinado por espectrofotometría. Esta reac-

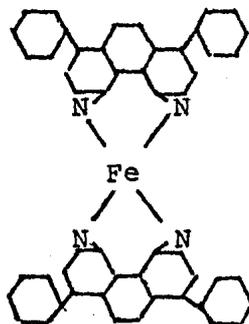
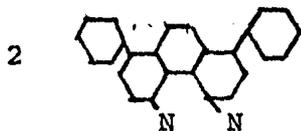
ción se lleva a cabo a pH 5.5.

El cálculo de hierro se hace en función del cambio de coloración con respecto a la coloración de una solución patrón de hierro de concentración 1 µg/ml.

La reacción que ocurre es la siguiente:



6



Los pasos necesarios para la cuantificación son los siguientes:

1.- Se lavó el material de vidrio limpio con HCl al 37% seguido de agua y agua desionizada.

2.- Se prepararon las siguientes soluciones con agua desionizada; HCl 1N, TCA (Acido tricloroacético) al 40%, acetato de sodio al 30% y NaCl al 0.9%.

3.- Se pipeteó 1 ml de suero y se colocó en un tubo con 1 ml de NaCl 0.9%.

4.- Se agregó 1 ml de HCl 1N. Se agitó y se dejaron los tubos en reposo a temperatura ambiente durante 45 minutos.

5.- Se agregó 1 ml. de TCA al 40% y se agitó en Vórtex.

6.- Se centrifugó 30 minutos a 10 000 rpm y a 4°C en una centrífuga refrigerada IEC.

7.- Se tomaron 2 ml del sobrenadante y se les agregó 1 ml de acetato de sodio al 30%, así como 5 mg de ascorbato de sodio. Se agitó perfectamente.

8.- Se agregó 1 ml de solución de batofenantrolina - al 0.1% en amortiguador de fosfatos 0.4M de pH 5.5 (disulfonato de batofenantrolina $6.8 \times 10^{-4}M$ en fosfatos 0.4M - pH 5.5).

9.- Se preparó una solución patrón que contenía 2 ml de solución de hierro 1.0 $\mu g/ml$ y todos los reactivos indicados en los pasos 4 al 8.

10.- Se preparó una solución blanco con 2 ml de agua desionizada y todos los reactivos indicados en los pasos 4 al 8.

11.- Se leyeron los tubos blanco, patrón y problemas en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II a 535 nm. La absorbancia del blanco se restó a los demás tubos, y para obtener la concentración de hierro se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Hierro en suero} = \frac{\text{Absorbancia del suero} \times 2}{\text{Absorbancia del patrón.}}$$

$\mu g/ml$

R E S U L T A D O S .

Como se mencionó en la introducción, la ceruloplasmina posiblemente juega un papel importante en la disponibilidad del hierro para su transporte por la transferrina - y su posterior utilización en la síntesis de hemoglobina.

Cuando los conejos se someten a un sangrado diario - de 10 ml de sangre por kilogramo de peso, se les induce - una anemia crónica macrocítica que se caracteriza por presentar una fase inicial de descenso en el número de células rojas, en la concentración de la hemoglobina y en el porcentaje de hematocrito, seguida de una recuperación que se inicia a partir del séptimo día de sangrado (día 6). - Se aprecia entonces que los parámetros hematológicos se - mantienen más o menos constantes, y que esta condición -- persiste a lo largo de todos los días de sangrado restantes. Esto, junto con los índices de producción de reticulocitos, nos indica que ha habido una estimulación de la eritropoyesis en respuesta al sangrado, y que, por lo tanto, es de esperar que los factores involucrados en ella -

se vean afectados en mayor o menor medida.

Enfocamos aquí nuestro interés al seguimiento de la ceruloplasmina a lo largo de los días de sangrado por estar ella muy posiblemente relacionada con la eritropoye--sis, específicamente con la síntesis de hemoglobina.

Se puede hablar de dos fases dentro de este trabajo: primeramente la caracterización de la reacción de ceruloplasmina con DPD (dimetilparafenilendiamina) y posteriormente la inducción de la anemia en conejos para la cuantificación de ceruloplasmina y de hierro séricos.

I.- CARACTERIZACION DE LA REACCION CERULOPLASMINA + DPD.

a.- Efecto del Fe⁺⁺

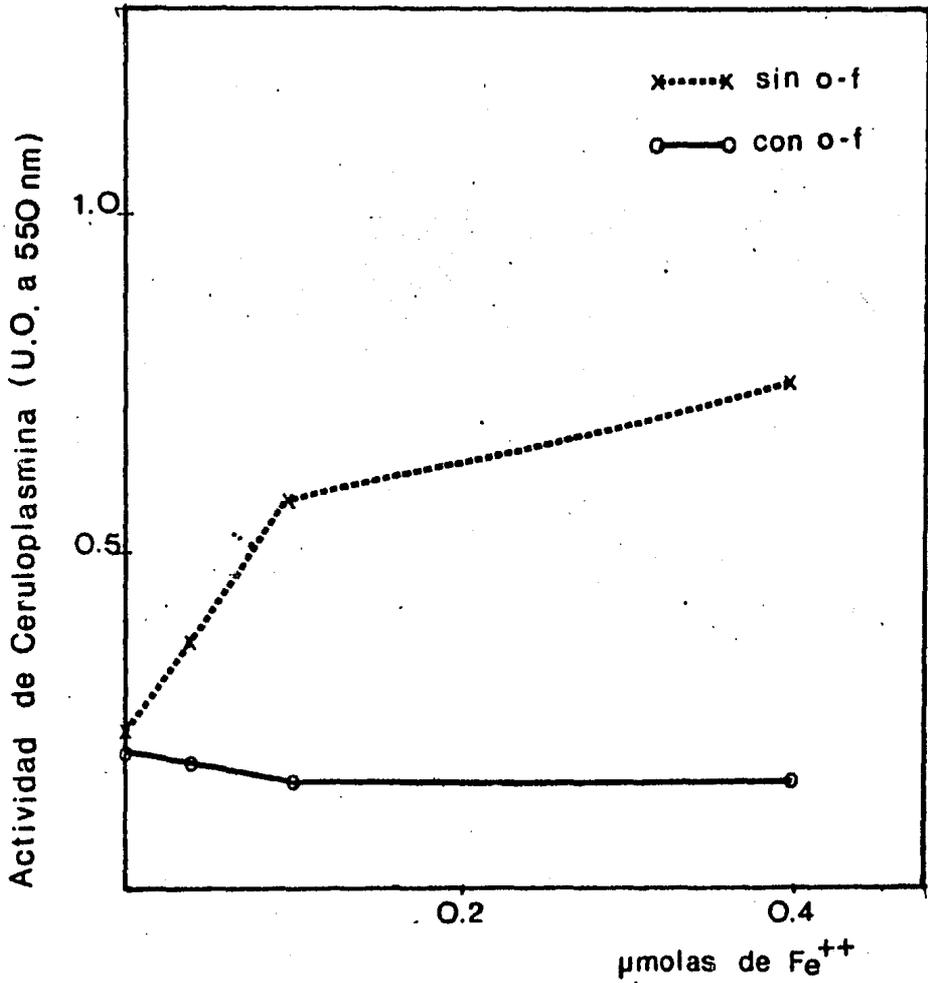
La ceruloplasmina, como se dijo antes, es activada por el Fe⁺⁺ al reaccionar sobre el DPD (46). Para saber si la ortofenantrolina era realmente capaz de evitar la aceleración de la reacción de ceruloplasmina + DPD por --

efecto del Fe^{++} , se incubaron algunas muestras de suero con diversas concentraciones de Fe^{++} , y se utilizó un amortiguador con y sin ortofenantrolina (Metodo de Curzon modificado y no modificado).

Los resultados se muestran en las gráficas 2 y 3. Se utilizaron primero concentraciones de 0.04 a 0.4 μ Molas de Fe^{++} por 0.1 ml de suero en una dilución final de 5 ml (Gráfica 2), y posteriormente se agregaron concentraciones de 0.4 a 4 μ Molas de Fe^{++} /0.1 ml de suero en una dilución final de 5 ml (Gráfica 3).

Como se puede ver en la gráfica 2, se obtuvieron resultados muy diferentes para los tubos incubados con ortofenantrolina y los que no tenían este agente quelante del hierro.

Los tubos incubados con ortofenantrolina daban una actividad de ceruloplasmina similar aún cuando se agregara hierro hasta en una concentración de 0.4 μ Molas de Fe^{++} por 0.1 ml de suero.

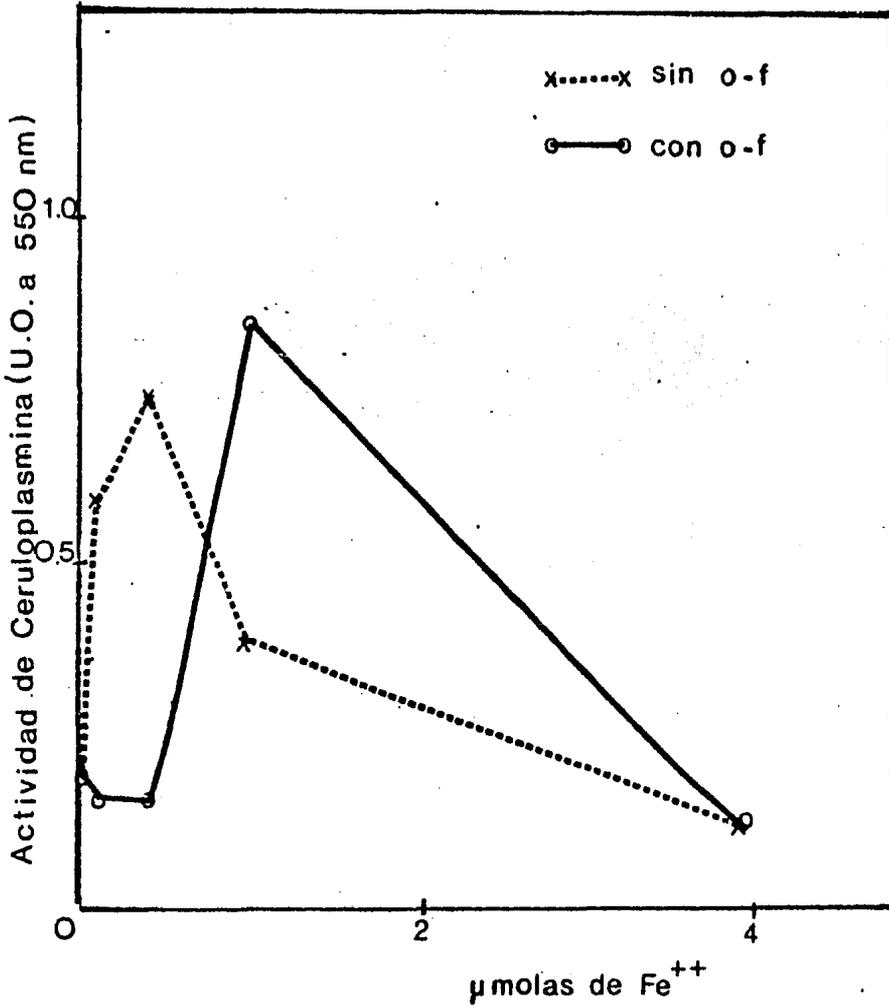


Gráfica 2.-Efecto del Fe⁺⁺ sobre la reacción de ceruloplasmina con DPD utilizando amortiguador con y sin orto fenantrolina. El volumen final de la mezcla de incubación es de 5 ml.

Los tubos incubados sin ortofenantrolina daban una mayor absorbancia a 550 nm debida a una aceleración de la reacción, causada por el Fe^{++} libre. Este aumento es proporcional para concentraciones hasta de 0.1 μM de Fe^{++} .

Como se puede ver en la gráfica 3, que integra todas las concentraciones de Fe^{++} utilizadas, a altas concentraciones éste ión inhibe en vez de acelerar la reacción. En los tubos sin ortofenantrolina, con 1 μM de Fe^{++} hay menor actividad de ceruloplasmina que con 0.4 μM de Fe^{++} pero sigue habiendo más que sin Fe^{++} . Con 4 μM la reacción se ve definitivamente inhibida en un 50%.

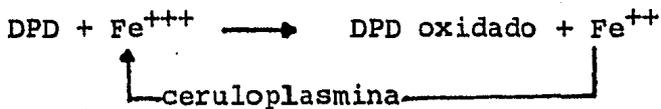
En los tubos con ortofenantrolina, al poner 1 μM de Fe^{++} se pierde el efecto quelante y "amortiguador" que tenía en concentraciones menores de Fe^{++} debido a que ya no hay suficiente ortofenantrolina para secuestrar la gran cantidad de Fe^{++} agregado, y se observa una aceleración bastante pronunciada. Al agregar 4 μM de Fe^{++} , nuevamente tenemos el efecto de inhibición debida al exceso de este ión.



Gráfica 3.-Efecto de altas concentraciones de Fe⁺⁺ sobre la reacción de ceruloplasmina con DPD utilizando amortiguador con y sin ortofenantrolina. El volumen final de la mezcla de incubación es de 5 ml.

b.- Efecto del Fe⁺⁺⁺

Curzon (46), menciona la posibilidad de que la aceleración de la reacción de ceruloplasmina con DPD por el Fe⁺⁺ se deba a la formación de Fe⁺⁺⁺ por la ceruloplasmina, convirtiéndose éste en un agente oxidante que participa activamente en la conversión de DPD a DPD oxidado, contribuyendo así a la formación de producto. El esquema que Curzon propone es el siguiente (46):



Para comprobar la hipótesis anterior era necesario saber si efectivamente el Fe⁺⁺⁺ es capaz de oxidar el DPD, y para eso se preparó una serie de muestras en las que se hacía reaccionar DPD con Fe⁺⁺⁺, y por otra parte DPD + ceruloplasmina con Fe⁺⁺⁺. También incluí tubos en los que reaccionara el DPD con Fe⁺⁺, y el DPD + ceruloplasmina con Fe⁺⁺ para establecer un punto de comparación. Hubo un blanco que contenía solo DPD para descontar la

oxidación que pudiera sufrir éste, y una muestra que contenía únicamente suero + DPD como punto de referencia para las muestras que además contenían Fe^{++} o Fe^{+++} . En este caso se utilizó el método original de Curzon, en el que no hay ningún quelante de hierro en la mezcla de incubación. El hierro Fe^{+++} se agregó en forma de sulfato férrico de amonio en una solución que contenía HCl para mantener el pH bajo y así evitar la formación de hidróxido y la posterior precipitación del hierro.

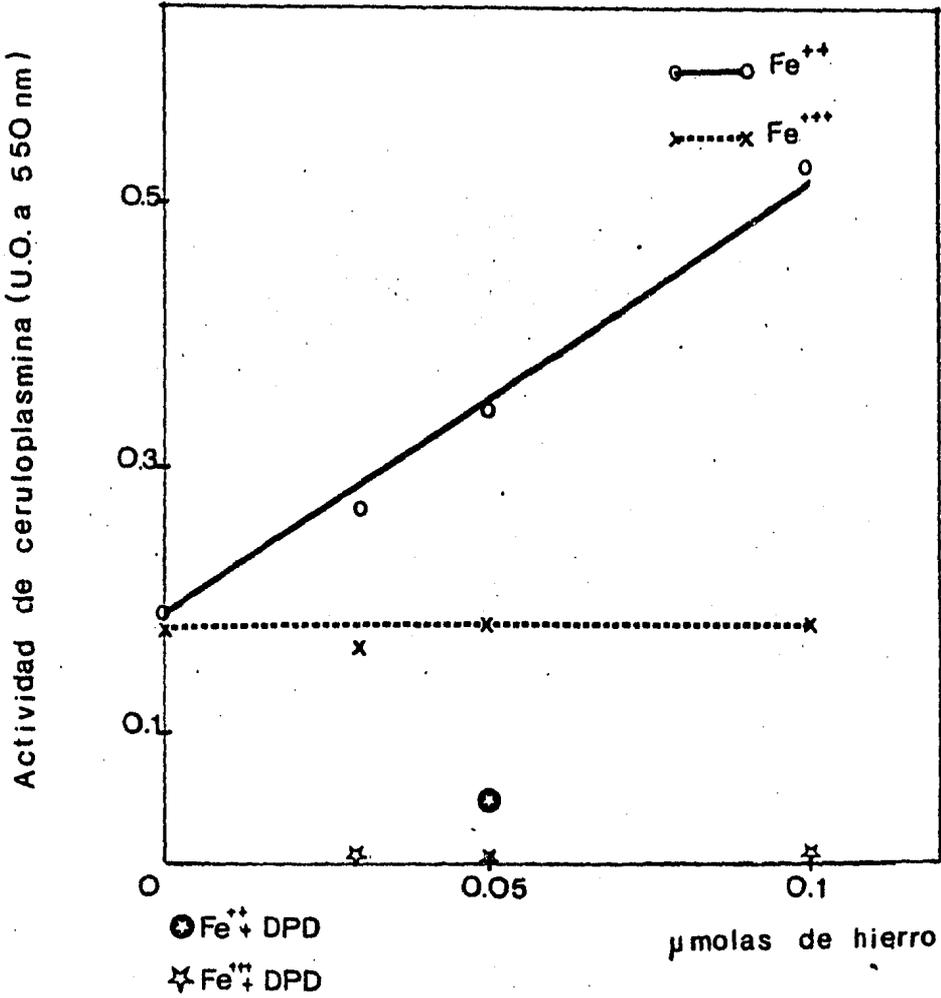
Los resultados pueden verse en la tabla III y en la gráfica 4.

T A B L A I I I

EFEECTO DEL HIERRO FERROSO Y HIERRO FERRICO SOBRE LA REACCION -
DE CERULOPLASMINA CON DPD.

MUESTRA	CONTENIDO	ABSORBANCIA A 550 nm
1	DPD	0
2	DPD + Fe ³⁺ 0.03 μmolas	-0.004
3	DPD + Fe ³⁺ 0.05 μmolas	0
4	DPD + Fe ³⁺ 0.10 μmolas	0.004
5	DPD + Fe ²⁺ 0.05 μmolas	0.039
6	DPD + Suero	0.182
7	DPD + Suero + Fe ³⁺ 0.03 μmolas	0.160
8	DPD + Suero + Fe ³⁺ 0.05 μmolas	0.170
9	DPD + Suero + Fe ³⁺ 0.10 μmolas	0.177
10	DPD + Suero + Fe ²⁺ 0.03 μmolas	0.267
11	DPD + Suero + Fe ²⁺ 0.05 μmolas	0.340
12	DPD + Suero + Fe ²⁺ 0.10 μmolas	0.523

Todas las muestras se corrieron por duplicado.
Todos los tubos contenían los reactivos de la mezcla de incubación que se indicó antes para la cuantificación de ceruloplasmina por el método de Curzon no modificado.



Gráfica 4.-Efecto del Fe^{++} y Fe^{+++} sobre la reacción de ceruloplasmina con DPD. Se muestra también la reacción directa de Fe^{++} y Fe^{+++} con DPD. El volumen final de la mezcla de incubación es de 5 ml.

Como se puede observar en la Tabla III y en la gráfica 4, el Fe^{+++} no reaccionó directamente con el DPD en ninguna de las concentraciones usadas, mientras que el Fe^{++} tuvo una acción oxidante sobre el DPD poco significativa.

En las muestras que contenían suero, se pudo ver que el Fe^{++} tenía el efecto de aceleración de la reacción que ya había sido observado antes, y que, en cambio, el Fe^{+++} no alteraba en absoluto la reacción. Estos resultados están en contraposición con la hipótesis de Curzon antes mencionada, ya que él supone que el Fe^{+++} es capaz de oxidar directamente el DPD y que por ello acelera la reacción de ceruloplasmina con este sustrato.

Es importante señalar que la reacción del Fe^{++} con DPD no corresponde al incremento observado cuando se pone esa misma concentración de Fe^{++} con ceruloplasmina y DPD, lo cual es congruente con la hipótesis de que el efecto del Fe^{++} se debe a una interacción con la ceruloplasmina, de tal manera que la transforma en ceruloplasmina activada.

c.- Efecto del Cu^{++}

Por otro lado, me pareció necesario saber si el cobre era capaz de activar la reacción de ceruloplasmina -- con DPD de una manera similar al Fe^{++} , ya que esto tendría implicaciones biológicas interesantes.

Para ello se calculó primero la concentración de Cu unido a ceruloplasmina que existe normalmente en el suero. De acuerdo al método de Curzon de cuantificación de actividad de ceruloplasmina del suero, él define que 1 μg de Cu de ceruloplasmina se encuentra en 21 unidades de actividad, siendo 1 unidad de actividad = 0.1Δ Absorbancia a 550 nm, en las condiciones establecidas por el método (47).

De esta forma y teniendo en cuenta que en promedio el suero con el que se había estado trabajando tenía -- 0.194 de absorbancia a 550 nm/0.1 ml de suero, es decir, -- 19.4 unidades de actividad por ml de suero, consideré que esto se aproximaba bastante a 1 μg de Cu unido a cerulo--

plasmina por ml de suero, es decir, 0.1 μg Cu-Cp/0.1 ml de suero.

Se agregó entonces cobre en concentraciones de 0.025 0.05 y 0.1 μg por ml de suero, en forma de sulfato de cobre, de manera de llegar a equipararlo con el cobre que se tenía unido a la ceruloplasmina.

Además, se preparó una muestra con una alta concentración de cobre, similar a la que se usó de hierro para acelerar la reacción de ceruloplasmina con DPD (0.05 μmoles , ver gráfica anterior). Este tubo contenía 0.05 μmoles de cobre, las cuales equivalen a 12.5 μg de éste.

Se prepararon también tubos en los que reaccionó el cobre con DPD sin agregar suero, y este valor se tomó en cuenta para obtener la absorbancia corregida, en la que se restaba la absorbancia debida a la reacción exclusivamente entre el cobre y el DPD. Los resultados se pueden ver en la siguiente tabla y en la gráfica 5, en la cual se graficaron las absorbancias corregidas.

Como se puede observar, concentraciones bajas de cobre, similares a las normalmente encontradas unidas a ceruloplasmina en el suero de conejo, no tienen efecto sobre la reacción en cuestión. Concentraciones elevadas de cobre, del orden de 0.05 μ molas, sí tienen un efecto sobre la reacción, aunque éste no se debe a una activación de la ceruloplasmina por el cobre, sino a una reacción directa entre el cobre y el sustrato DPD.

Si se resta la reacción directa que ocurre entre el cobre y el DPD, se puede ver que la reacción de ceruloplasmina con DPD se ve inclusive inhibida.

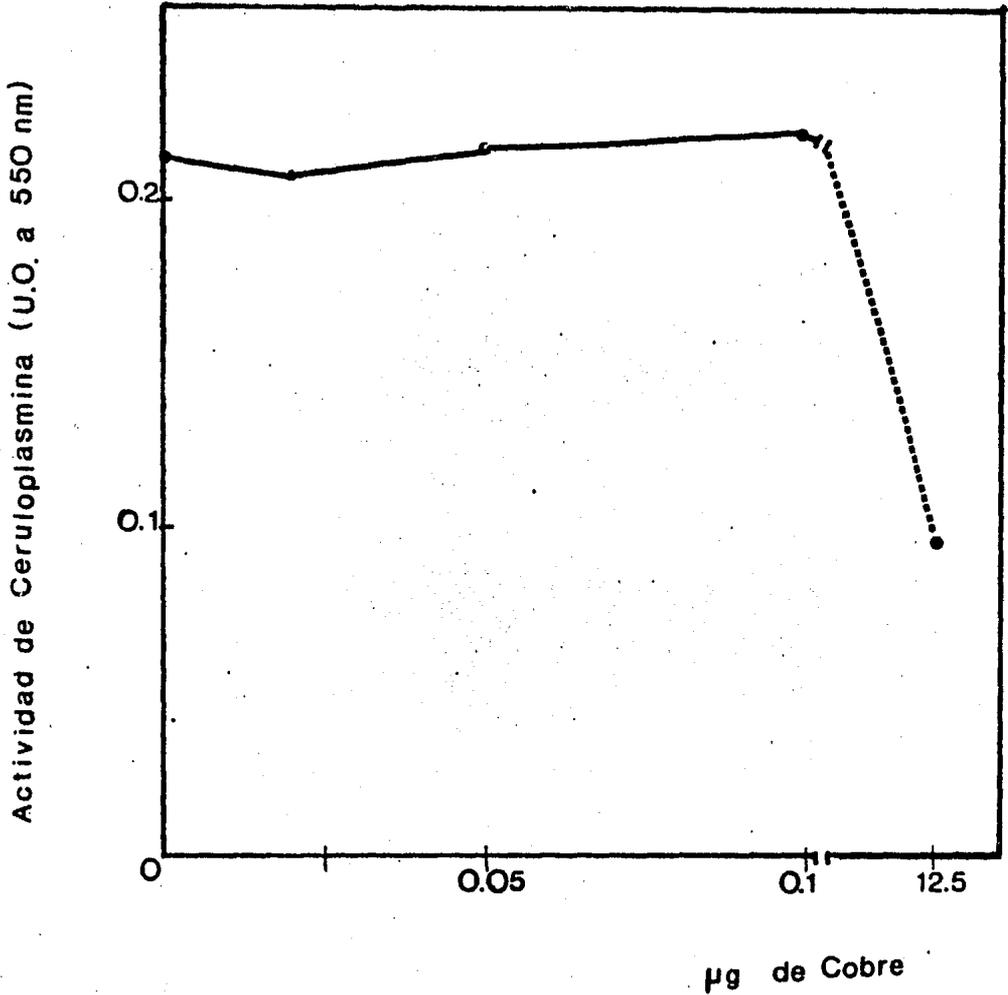
T A B L A IV.

Efecto del cobre sobre la reacción de ceruloplasmina con DPD.

MUESTRA*	CONTENIDO**	ABSORBANCIA a 550 nm	ABSORBANCIA CORREGIDA.
1	DPD	0	
2	DPD + 0.025 µg Cu ⁺⁺	0.018	
3	DPD + 0.05 µg Cu ⁺⁺	0.009	
4	DPD + 0.1 µg Cu ⁺⁺	0.015	
5	DPD +12.5 µg Cu ⁺⁺	0.526	
6	DPD + Suero	0.211	0.211
7	DPD + 0.025 µg Cu ⁺⁺ + Suero	0.225	0.207
8	DPD + 0.05 µg Cu ⁺⁺ + Suero	0.225	0.216
9	DPD + 0.1 µg Cu ⁺⁺ + Suero	0.236	0.221
10	DPD +12.5 µg Cu ⁺⁺ + Suero	0.622	0.096

* Todas las muestras se corrieron por duplicado.

** Los tubos contenían la mezcla de incubación para la cuantificación de ceruloplasmina por el método de Curzon no modificado.



Gráfica 5.- Efecto del cobre sobre la reacción de ceruloplasmina con DPD. Se grafica la absorbancia corregida, a la que se le restó la absorbancia debida a la reacción directa del cobre con DPD. El volumen final de la mezcla de incubación es de 5 ml.

d.- Estabilidad de la ceruloplasmina en el suero.

Considerando reportes previos sobre la inestabilidad la ceruloplasmina al almacenaje y durante su aislamiento en ausencia de inhibidores de plasmina (20), decidí someter a prueba su estabilidad bajo las siguientes condiciones experimentales.

Obtuve suero y plasma de conejo en presencia y ausencia de un inhibidor de tripsina reportado también como -- inhibidor de plasmina (Inhibidor de frijo de soya (22B), -- y medí la actividad de ceruloplasmina inmediatamente y -- 30 días después de almacenado el suero en congelación.

Los resultados se expresan en la Tabla V, y como puede verse, no hay una diferencia significativa entre las muestras al pasar un mes almacenadas en congelación, aún en el caso de suero y plasma incubados sin inhibidor.

e.- Efecto del EDTA en la actividad de la ceruloplasmina.

T A B L A V

ACTIVIDAD DE CERULOPLASMINA EN SUERO Y PLASMA FRESCOS DE CONE-
JO O ALMACENADOS POR TREINTA DIAS EN CONGELACION

MUESTRA *	ACTIVIDAD INICIAL	ACTIVIDAD 30 DIAS DESPUES.
Suero	0.087	0.084
Suero + Inhibidor	0.081	0.089
Plasma	0.041	0.040
Plasma + Inhibidor	0.038	0.032

*
Todas las muestras se corrieron por duplicado.

Se utilizó el método de cuantificación de actividad de ceru-
loplasma de Curzon modificado.

Analizando los resultados anteriores, se observa que el plasma muestra una actividad de ceruloplasmina muy baja, aproximadamente del 50% con respecto al suero aún - - cuando se utilizó la misma sangre para obtener el suero y el plasma. Esta diferencia podría deberse a un efecto inhibitorio sobre la actividad de ceruloplasmina del EDTA, - ya que la concentración en que se usa como anticoagulante es elevada.

(5 m /ml suero o 1.3 mM).

Esto me condujo a la realización de otro experimento en el que incubé el suero de conejo con diferentes concentraciones de EDTA y medí la actividad de ceruloplasmina. - Los resultados se muestran en la Tabla VI.

De esta tabla se concluye que el EDTA a baja concentración no tiene efecto sobre la actividad de la ceruloplasmina, sin embargo a concentración de 0.5 mg/0.1 ml - de suero causa un decremento en la actividad de esta enzima de aproximadamente un 45%, y si la concentración se incrementa 10 veces, a 5 mg/0.1 ml de suero, el decremento es de un 82%. Si tomamos en cuenta que la concentración de EDTA que había en el plasma utilizado en el experimento anterior era aproximadamente de 0.5 mg/0.1 ml de suero, podemos decir que el decremento en actividad de la ceruloplasmina observado en las muestras de plasma con respecto al suero colectado a partir de la misma sangre se debía - a la presencia de EDTA en el primero.

T A B L A V I

ACTIVIDAD DE CERULOPLASMINA DEL SUERO INCUBADO POR EDTA.

MUESTRA*	ACTIVIDAD (Abs. a 550 nm)
Suero	0.136
Suero + 0.05 mg EDTA (0.13 mM)	0.134
Suero + 0.50 mg EDTA (1.34 mM)	0.075
Suero + 5.00 mg EDTA (13.43 mM)	0.024

*
Todas las muestras se corrieron por duplicado.

Se utilizó el método modificado de Curzon para la cuantificación.

Este decremento en la actividad de la ceruloplasmina podría deberse por un lado a la remoción de trazas de hierro que están pegadas a la ceruloplasmina y que la hacen más activa, y por otro a una interacción directa con el cobre de la ceruloplasmina, de manera que ésta perdiera parte del cobre de su centro activo.

Suponiendo que nuestro sistema pudiera estar libre de hierro debido al quelante utilizado en la cuantificación (ortofenantrolina, ver Materiales y Métodos), la segunda posibilidad, es decir, la interacción directa del EDTA con el cobre de la ceruloplasmina sería más factible. Una evidencia a favor de esta posibilidad es el hecho de que se agregaron 0.4 mg de apotransferrina, la cual tiene alta afinidad por el hierro, a 0.1 ml de suero y se incubaron con DPD para cuantificar la actividad de ceruloplasmina por el método de Curzon, obteniéndose la misma actividad en suero con y sin apotransferrina. (Tabla VII)

La cantidad de apotransferrina que se agregó en el experimento anterior corresponde a la de transferrina que

normalmente existe en 0.1 ml de suero de conejo. La ausencia de un efecto sobre la actividad de ceruloplasmina por la presencia de apotransferrina se debe a que esta última es un "quelante" específico del hierro, y no interactúa, por lo tanto con el cobre de la ceruloplasmina, dejando intacta su actividad.

Una vez llegado a este punto, se concluyó la primera fase experimental.

Como pudo comprobarse, el Fe^{++} es capaz de activar la molécula de ceruloplasmina por un efecto posiblemente alostérico, el cual no se da con el Fe^{+++} (37). La ortofenantrolina cumple con la función de evitar este efecto de aceleración de la reacción de ceruloplasmina con DPD, - - siempre y cuando el Fe^{++} no llegue a una concentración mayor a 0.4 $\mu\text{Molas}/0.1$ ml de suero, la cual difícilmente se tendría en las condiciones experimentales usadas, ya que se tiene el reporte (60), de que el suero de conejo anémico contiene un máximo de 0.012 μMolas de $\text{Fe}^{++}/0.1$ ml de suero.

T A B L A V I I

EFFECTO DE LA APOTRANSFERRINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE CERULOPLASMINA.

MUESTRA*	ACTIVIDAD (Absorbancia a 550 nm)
Suero	0.136
Suero + 0.4 mg apotransferrina	0.133

*

Las muestras se corrieron por duplicado.

Se utilizó el método de cuantificación de actividad de ceruloplasmina de Curzon modificado.

Por otra parte, el cobre no es capaz de modificar la actividad de ceruloplasmina sobre DPD, aunque es capaz de reaccionar con este sustrato. Consideramos que las precauciones que se toman al preparar los reactivos y el material para la determinación de la actividad de ceruloplasmina son suficientes para eliminar las trazas de cobre -- que pudiera haber en ellos, y que aún cuando el suero llevara el doble de la concentración de cobre que suele llevar unido a ceruloplasmina, éste no interferiría con la reacción.

Pudimos ver también que el EDTA es un inhibidor de la actividad de ceruloplasmina, y que este efecto posiblemente se debe a una interacción directa con el cobre de la enzima.

Finalmente, vimos que las muestras de suero y plasma de conejo almacenadas bajo congelación por un mes conservaron la actividad de ceruloplasmina sin cambio aún en -- ausencia de inhibidor de la plasmina. Esto nos permitió -- llevar a cabo las cuantificaciones de la actividad de ce-

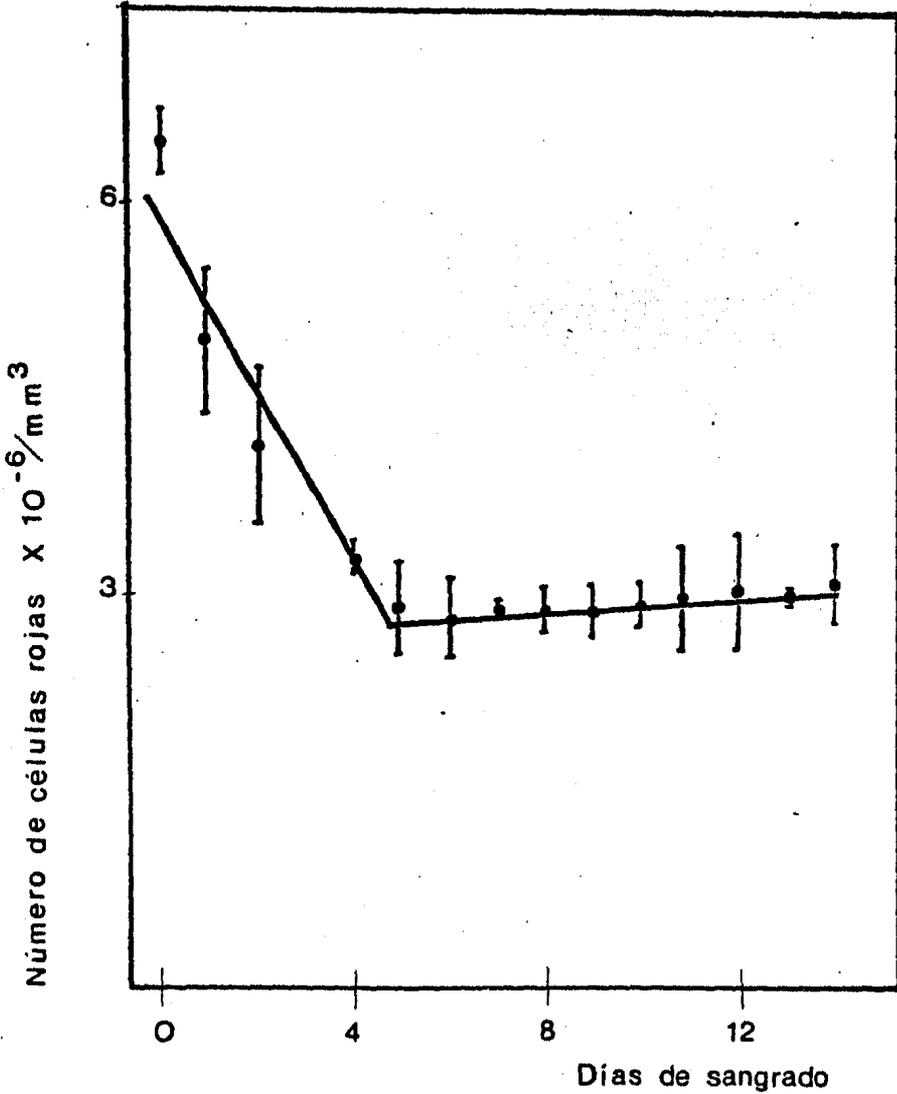
rueloplasmina del suero de conejos anémicos sin necesidad del uso de inhibidor de plasmina.

II.- INDUCCION DE LA ANEMIA A CONEJOS.

a.- Valores hematológicos.

En la segunda fase de este trabajo se indujo la anemia a conejos de la manera descrita anteriormente y se obtuvieron para cada día de sangrado los valores hematológicos correspondientes al número de células rojas, hemoglobina y hematocrito. Las gráficas siguientes, que describen la cinética de estos parámetros durante el sangrado, fueron ajustadas en su parte recta por el método estadístico de mínimos cuadrados.

En la gráfica 6 se puede observar que el número de células rojas disminuye a menos de la mitad debido al sangrado para el día 5, y que a partir del día 6 éste ya no baja más, sino que se mantiene constante a lo largo del sangrado hasta el día 14 en que se terminó el experimento.

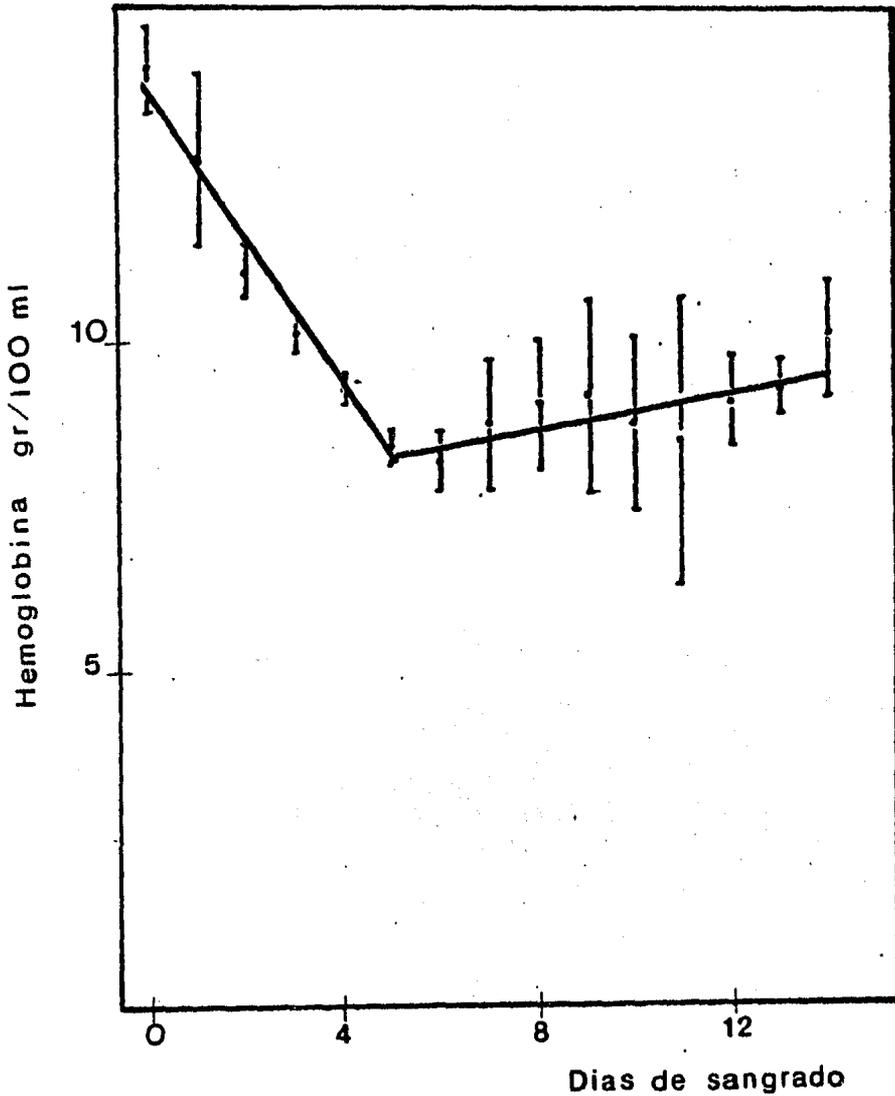


Gráfica 6.-Variación en el número de células rojas del conejo durante los días de sangrado. Se han ajustado dos rectas por mínimos cuadrados y se muestran los puntos experimentales con su desviación standard.

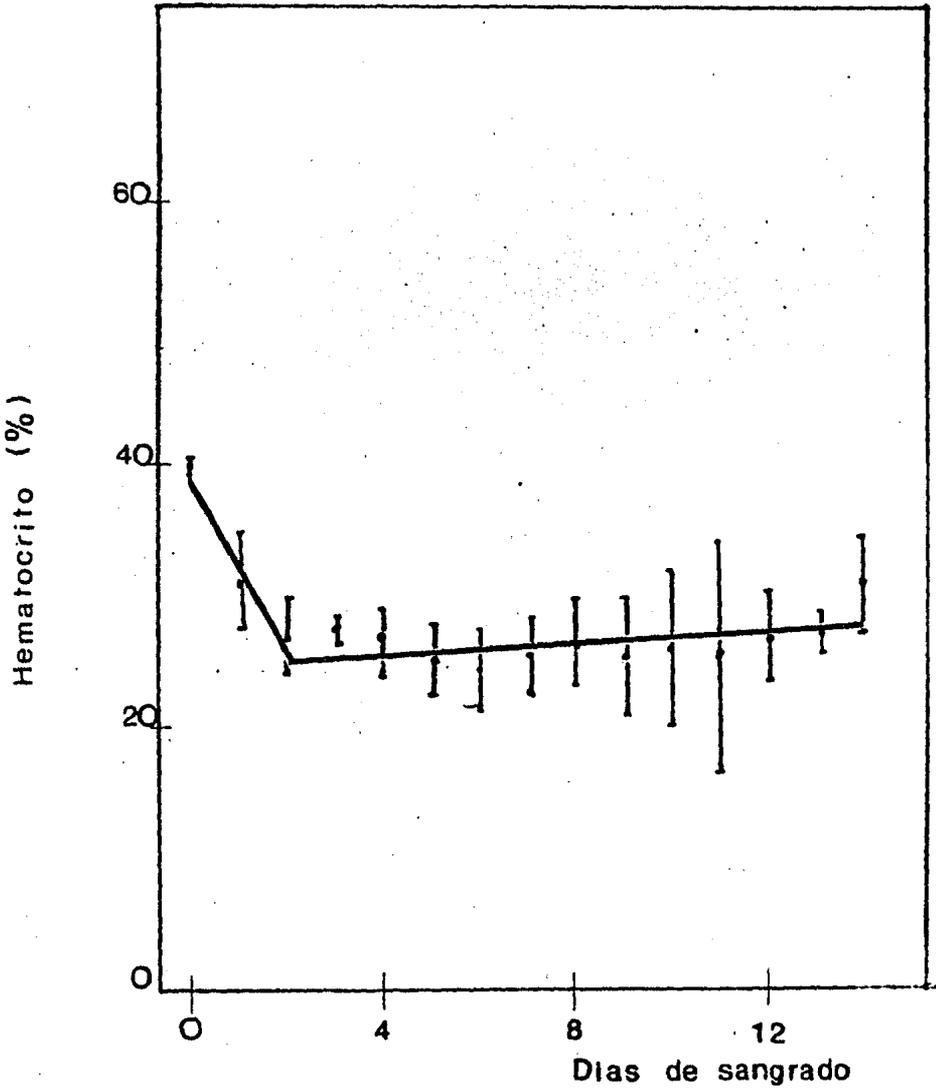
En la gráfica 7 se observa que la concentración de hemoglobina sigue una cinética similar al número de células rojas, aunque tiene la tendencia a subir un poco del día 5 al 14, y el de la gráfica 8 se puede ver que el hematocrito disminuye también, aunque se estabiliza antes, a partir del día 3.

Si se combina el hematocrito con el número de células rojas ($Htc/No. \text{ cels. rojas} \times 10$), se obtiene el volumen celular (volumen corpuscular medio o MCV, en micras cúbicas) y, como se puede ver en la gráfica 9, éste se incrementa a partir del primer día de sangrado de un valor medio de aproximadamente $60 \mu^3$ hasta llegar a estabilizarse el día 6 en un valor medio de $87 \mu^3$, con lo que se ve un incremento en el volumen celular de aproximadamente un 50%.

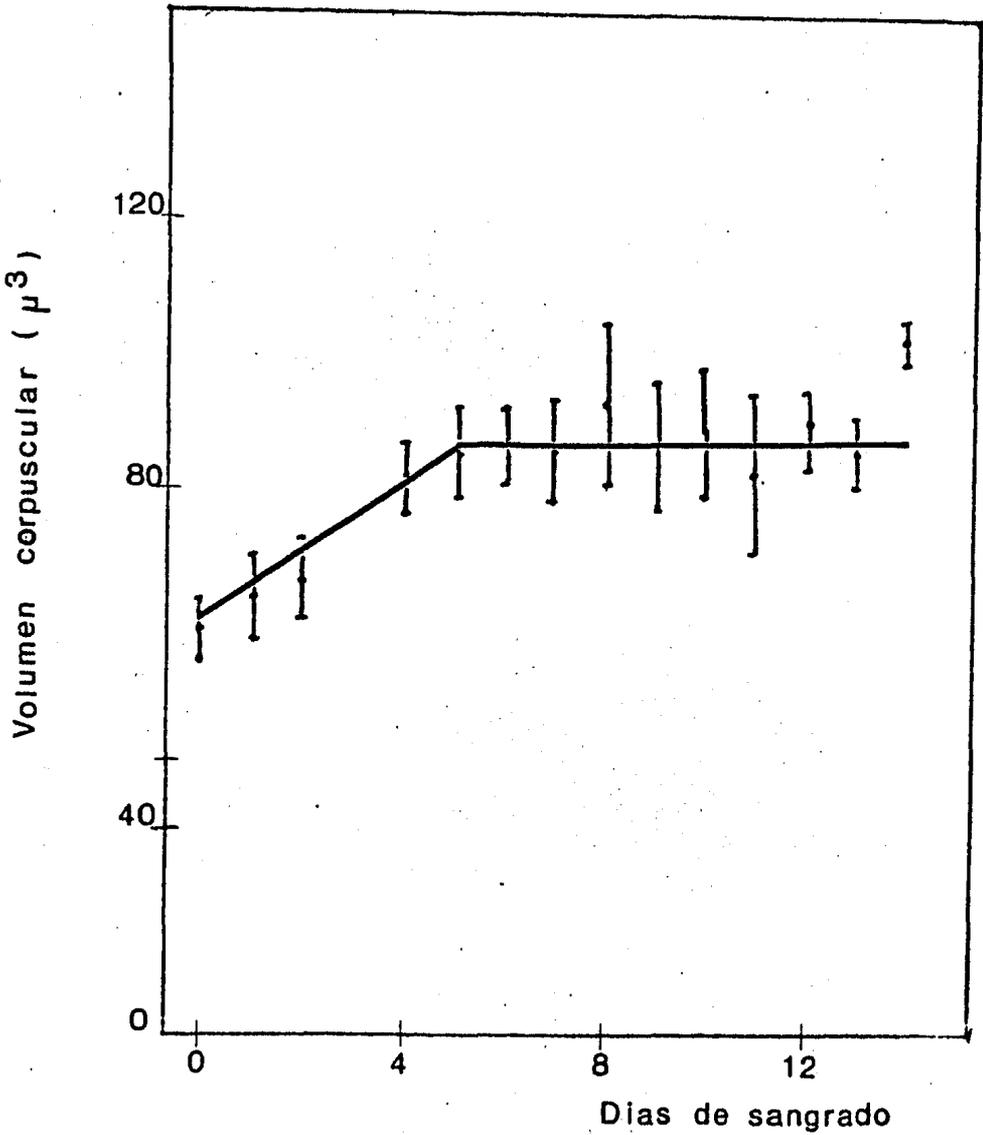
La concentración de hemoglobina por célula también se incrementó rápidamente, y siguió haciéndolo durante todo el experimento, como puede verse en la gráfica 10 que combina la concentración de hemoglobina (gr/100 ml) con -



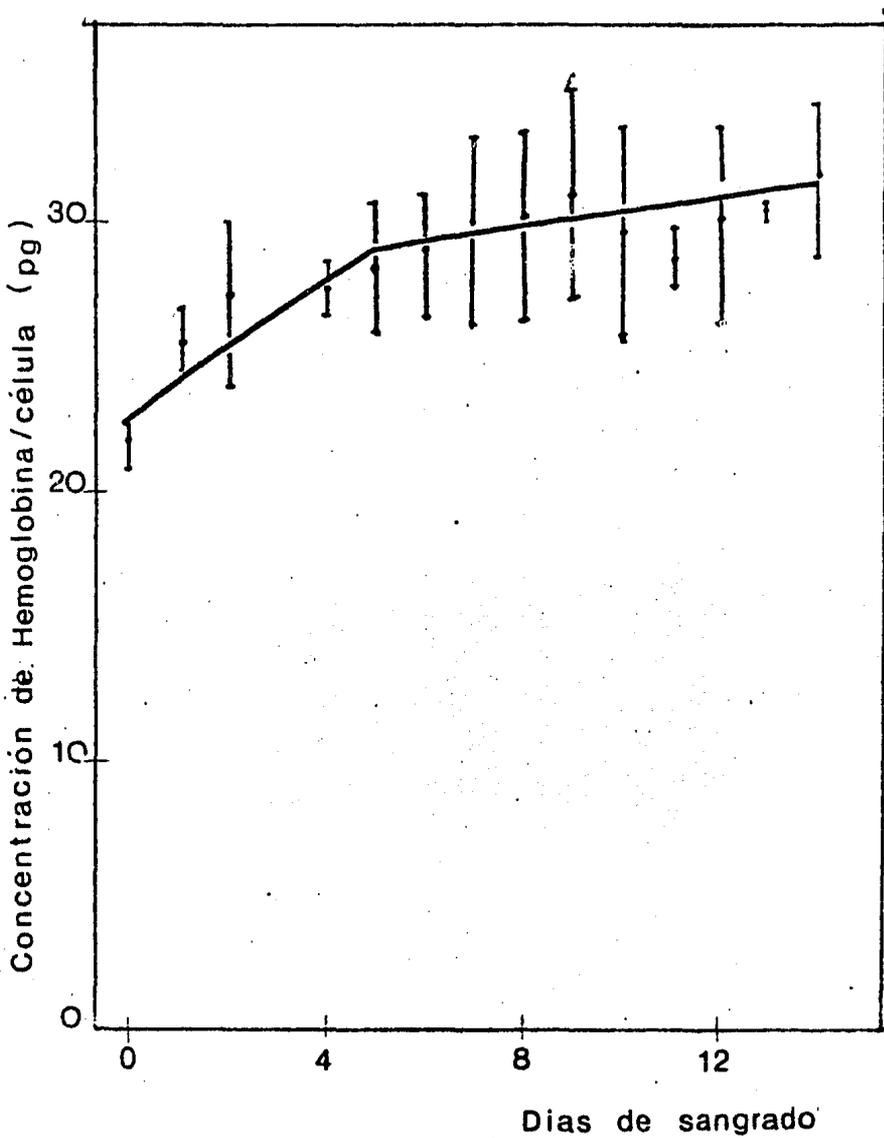
Gráfica 7.- Variación en la concentración de hemoglobina del conejo durante los días de sangrado, Se han ajustado dos rectas por mínimos cuadrados y se muestran los puntos experimentales con su desviación standard.



Gráfica 8.- Variación en el hematocrito del conejo durante los días de sangrado. Se han ajustado dos rectas por mínimos cuadrados y se muestran los puntos experimentales con su desviación standard.



Gráfica 9.-Variación en el volumen de los eritrocitos del conejo durante los días de sangrado. El volumen celular se obtiene indirectamente como volumen de células empacadas por 1000 ml/ número de células rojas en 10^{-6} células por mm^3 .



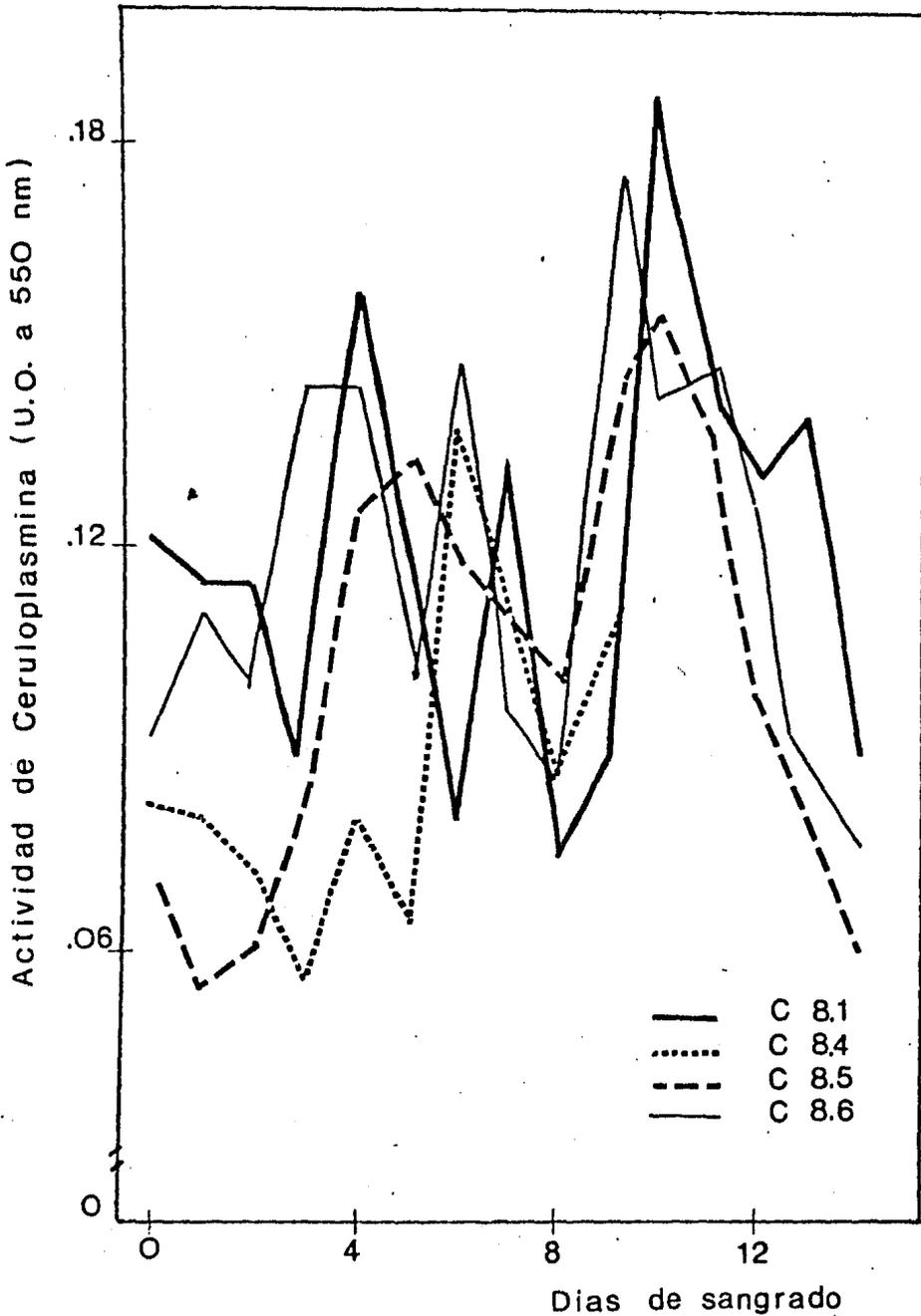
Gráfica 10.-Variación en la concentración de hemoglobina por célula durante el sangrado. Esta se obtuvo indirectamente como concentración de hemoglobina en gr/1 entre el número de células rojas en 10^6 células/mm³.

el número de células rojas.

b.- Actividad de ceruloplasmina del suero.

Se determinó también la actividad de ceruloplasmina en el suero de los conejos para cada día de sangrado. En la gráfica 11 se muestra este parámetro para los cuatro conejos de manera individual. Los niveles de actividad de ceruloplasmina se mantienen dentro de un mismo rango en los días 0, 1 y 2, y a partir del día 3 para algunos y 4 para otros, se empiezan a elevar. La elevación va seguida de un descenso y de esta manera se hacen ciclos que tiene una duración diferente para cada conejo. Los ciclos, además, no se encuentran en fase.

En la tabla VIII y en la gráfica 12 se ve la tendencia general de los conejos, promediándose la actividad de ceruloplasmina de todos para cada día. Se puede ver nuevamente que no hay variaciones notables entre el día 0 y 3, y que a partir del día 4 se inician ciclos de ascenso y descenso en la actividad de ceruloplasmina, los cuales-



Gráfica 11.-Actividad de ceruloplasmina del suero de conejos anémicos durante el sangrado. Se grafican individualmente a los cuatro conejos que participaron en el experimento.

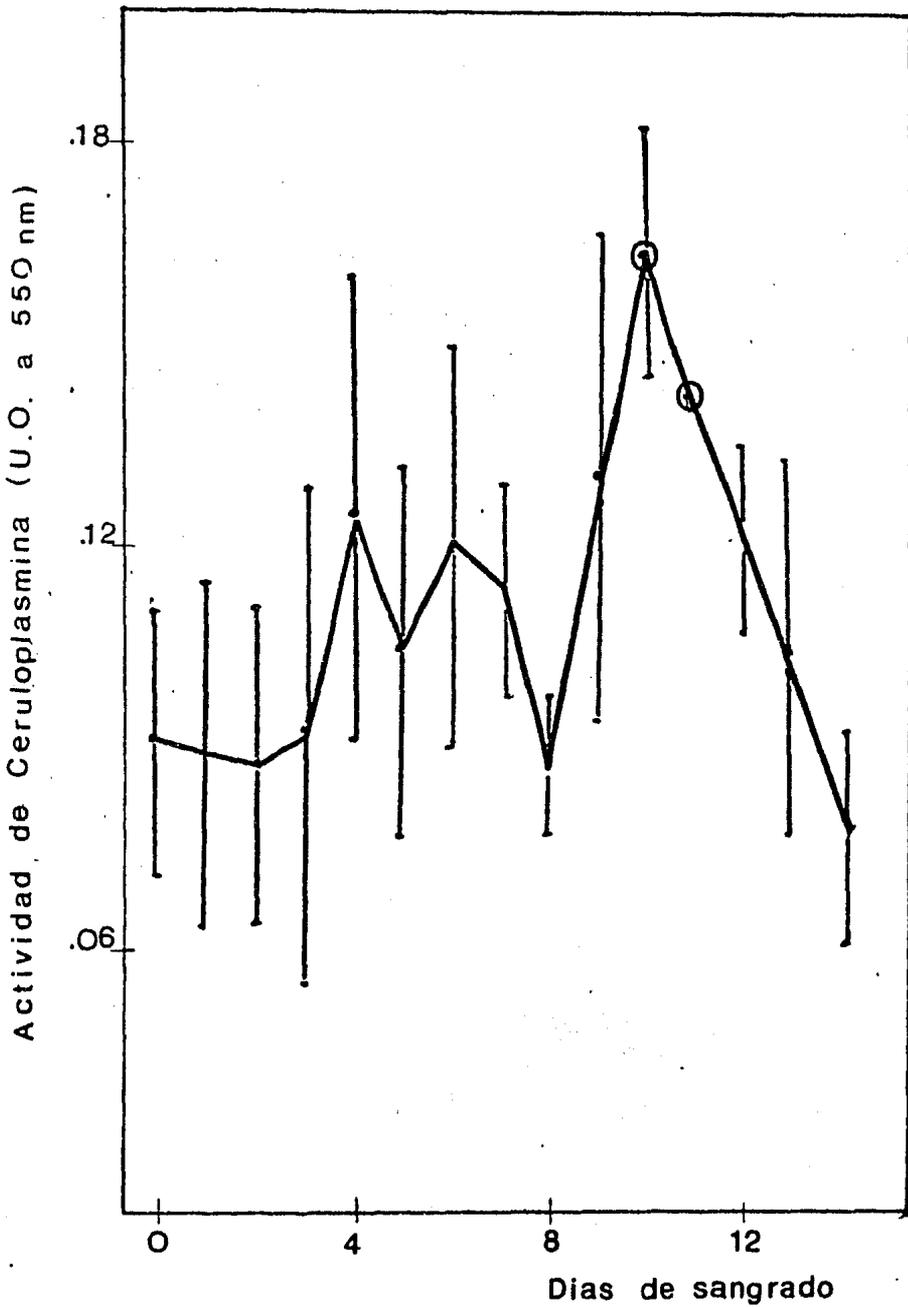
T A B L A V I I I

ACTIVIDAD DE CERULOPLASMINA EN SUERO DE CONEJOS DURANTE -
LOS DIAS DE SANGRADO.

DIA	ACTIVIDAD * (Absorbancia a 550 nm)	S	CV
0	0.091	0.020	22.8%
1	0.089	0.027	30.6%
2	0.087	0.024	28.2%
3	0.092	0.037	40.2%
4	0.126	0.035	27.6%
5	0.104	0.028	27.3%
6	0.120	0.030	25.1%
7	0.114	0.016	14.5%
8	0.087	0.011	12.7%
9	0.131	0.037	28.5%
10	0.164	0.019	11.8%
11	0.142	0.001	1.2%
12	0.121	0.014	12.1%
13	0.106	0.028	26.5%
14	0.076	0.016	21.1%

* Todas las muestras se corrieron por duplicado.

En todas estas cuantificaciones se utilizó el método -
modificado de Curzon.



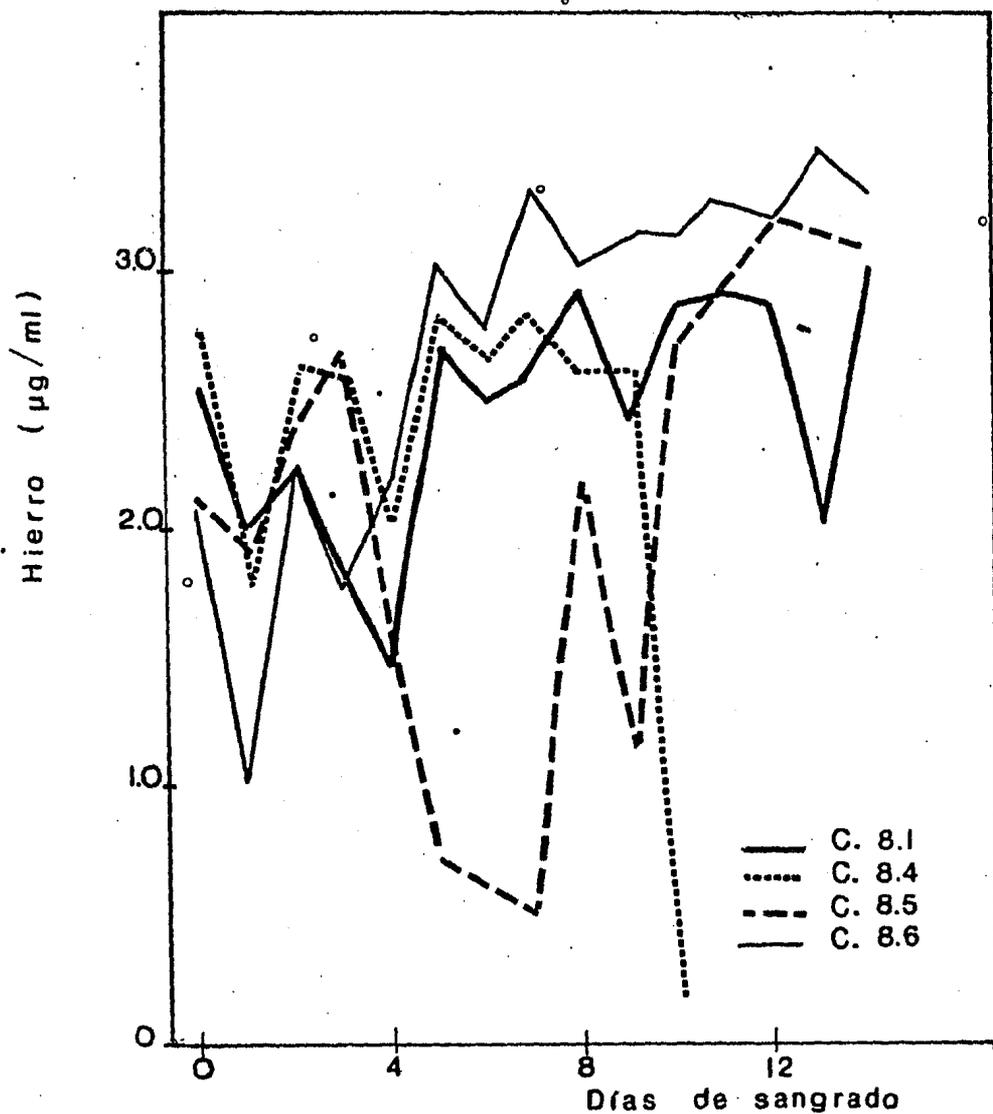
Gráfica 12.-Actividad de ceruloplasmina en el suero de conejos anémicos durante el sangrado. Se han promediado los valores de cuatro conejos. Se indican con \odot los valores significativamente diferentes al día cero con $p < 0.001$.

tiene intervalos de aproximadamente tres días.

Se puede ver que las desviaciones standard para cada punto de esta gráfica promedio son bastante grandes, y -- eso se debe a que los ciclos de ascenso y descenso en la concentración de ceruloplasmina van desfasados en los conejos y no tiene la misma duración. Sin embargo, algunos días en que la mayoría de los conejos coinciden en elevar su concentración de ceruloplasmina son significativamente diferentes del día cero con un $p < 0.001$ (Prueba de "t" - de student modificada para muestras pequeñas). Estos -- días son el 10 y el 11, en que hay el mayor pico de concentración de ceruloplasmina.

c.- Concentración de hierro sérico.

Se midió también la concentración de hierro sérico - para los cuatro conejos experimentales durante los días - de sangrado. Los valores individuales se muestran en la gráfica 13 y en promedio en la gráfica 14 y tabla IX.



Gráfica 13.-Concentración de hierro sérico en conejos hechos anémicos por sangrado. Se grafica individualmente a los cuatro conejos que participaron en el experimento.

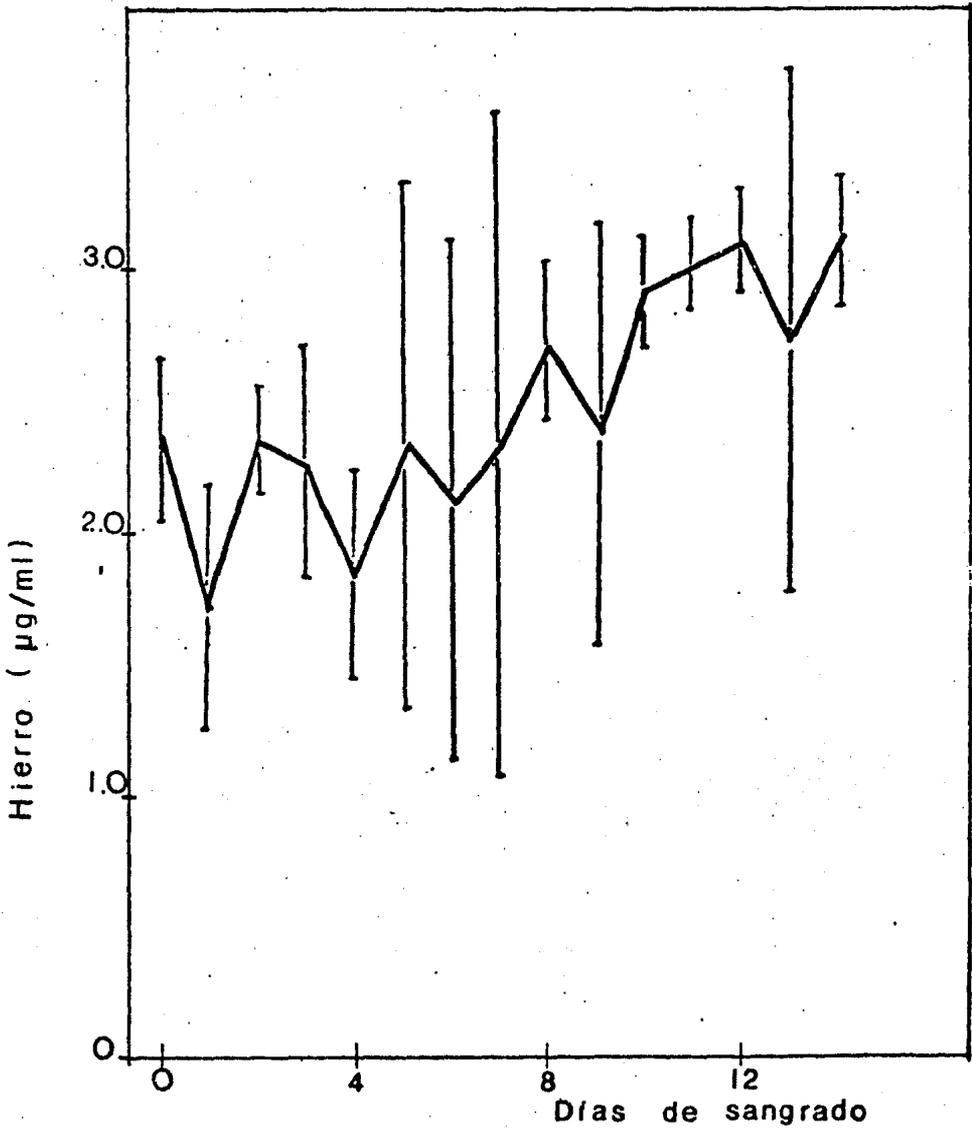
T A B L A I X

CONCENTRACION DE HIERRO EN SUERO DE CONEJOS DURANTE LOS -
DIAS DE SANGRADO.

DIA	HIERRO $\mu\text{g/ml}$	S	.CV
0	2.36	0.33	14.3%
1	1.68	0.46	27.3%
2	2.36	0.21	8.7%
3	2.24	0.44	20.0%
4	1.82	0.41	22.9%
5	2.31	1.07	46.5%
6	2.12	1.04	49.2%
7	2.32	1.23	53.0%
8	2.72	0.31	11.7%
9	2.35	0.78	33.5%
10	2.91	0.20	7.0%
11	3.02	0.17	5.9%
12	3.11	0.22	7.1%
13	2.76	0.97	35.2%
14	3.12	0.14	4.5%

*

Todas las muestras se corrieron por duplicado.



Gráfica 14.-Concentración de hierro sérico en conejos durante la anemia inducida. Se muestra el promedio de cuatro conejos.

Como puede observarse, hay una disminución en los niveles de hierro sérico después del primer día de sangrado (Día 1), seguida de una recuperación inmediata y de ciclos de ascenso y descenso de magnitud y amplitud diferentes para cada conejo.

En la gráfica promedio se ven estos ciclos de ascenso y descenso, y se ve un aumento general de alrededor de un 30% en la concentración de hierro sérico del día 10 en adelante con respecto al día cero. Las desviaciones standard para cada punto de la gráfica promedio son altas debido a la gran variabilidad individual y al desfase de los ciclos, y por esta razón la diferencia entre los puntos experimentales y el día cero no es significativa estadísticamente.

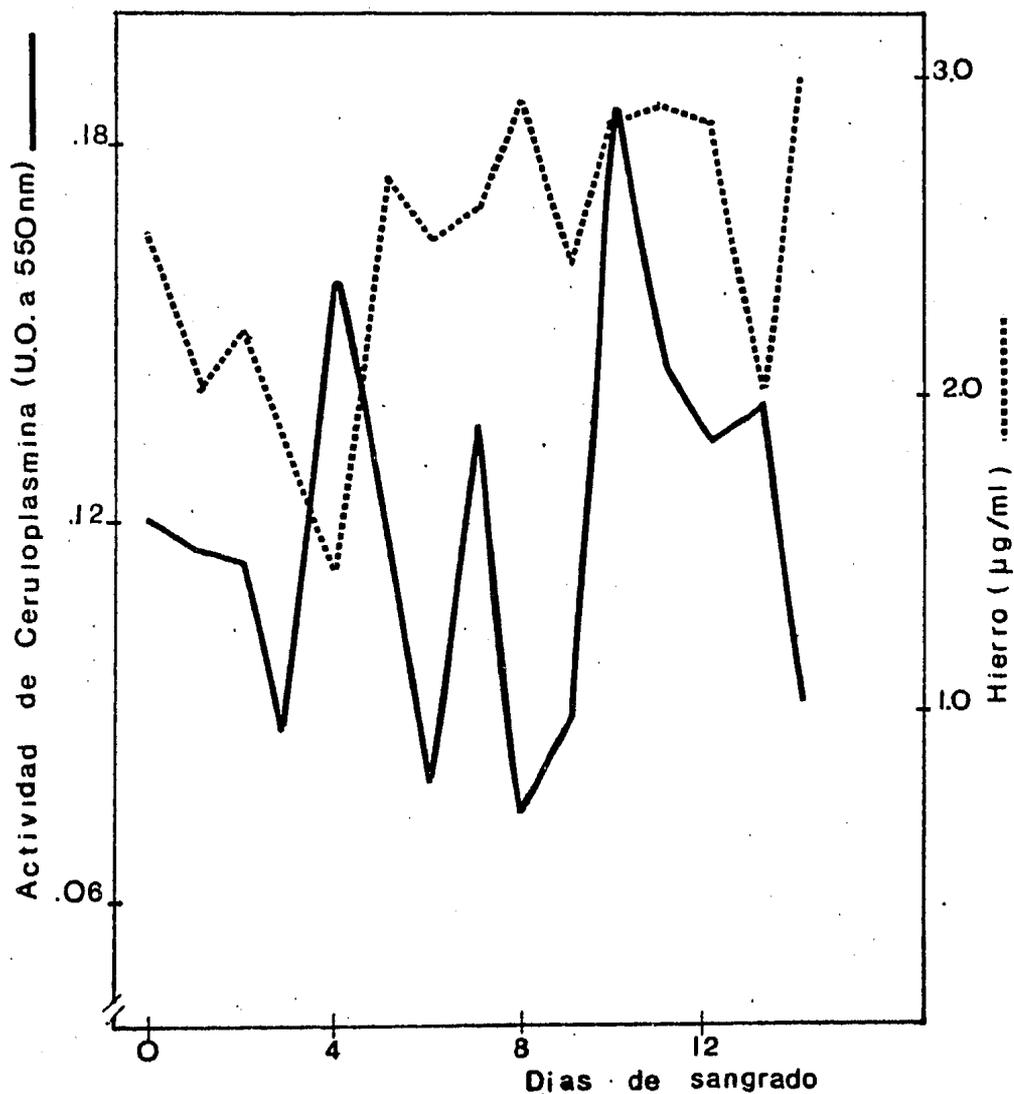
Sin embargo, y como se verá posteriormente, experimentos previos realizados por Gabriel Pulido (60), con 11 conejos a los que se midió entre otros parámetros la concentración de hierro sérico, demuestran que ésta varía durante la anemia en ciclos muy similares a los obtenidos -

para los cuatro conejos de este experimento.

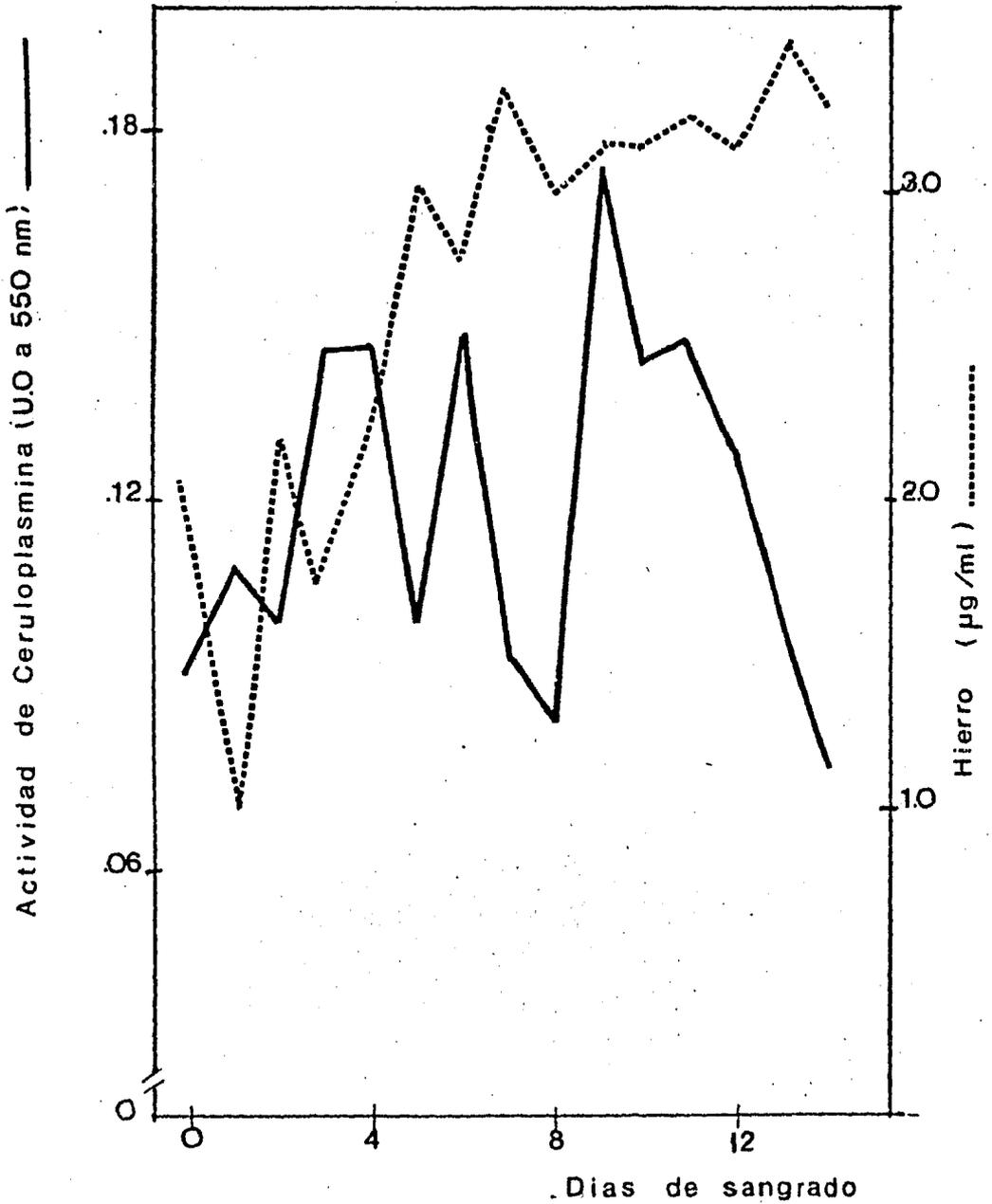
Si se relaciona la concentración de hierro en el suero con la de ceruloplasmina, se ve que existe cierto para-lelismo en el aumento en la concentración de hierro sérico con algunas horas de desfaseamiento.

Para el conejo 8.1 (gráfica 15), parece haber 24 horas de desfaseamiento entre la salida de ceruloplasmina y la salida de hierro a la circulación, aunque no se nota la proporcionalidad entre la magnitud del aumento en ceruloplasmina y el del hierro.

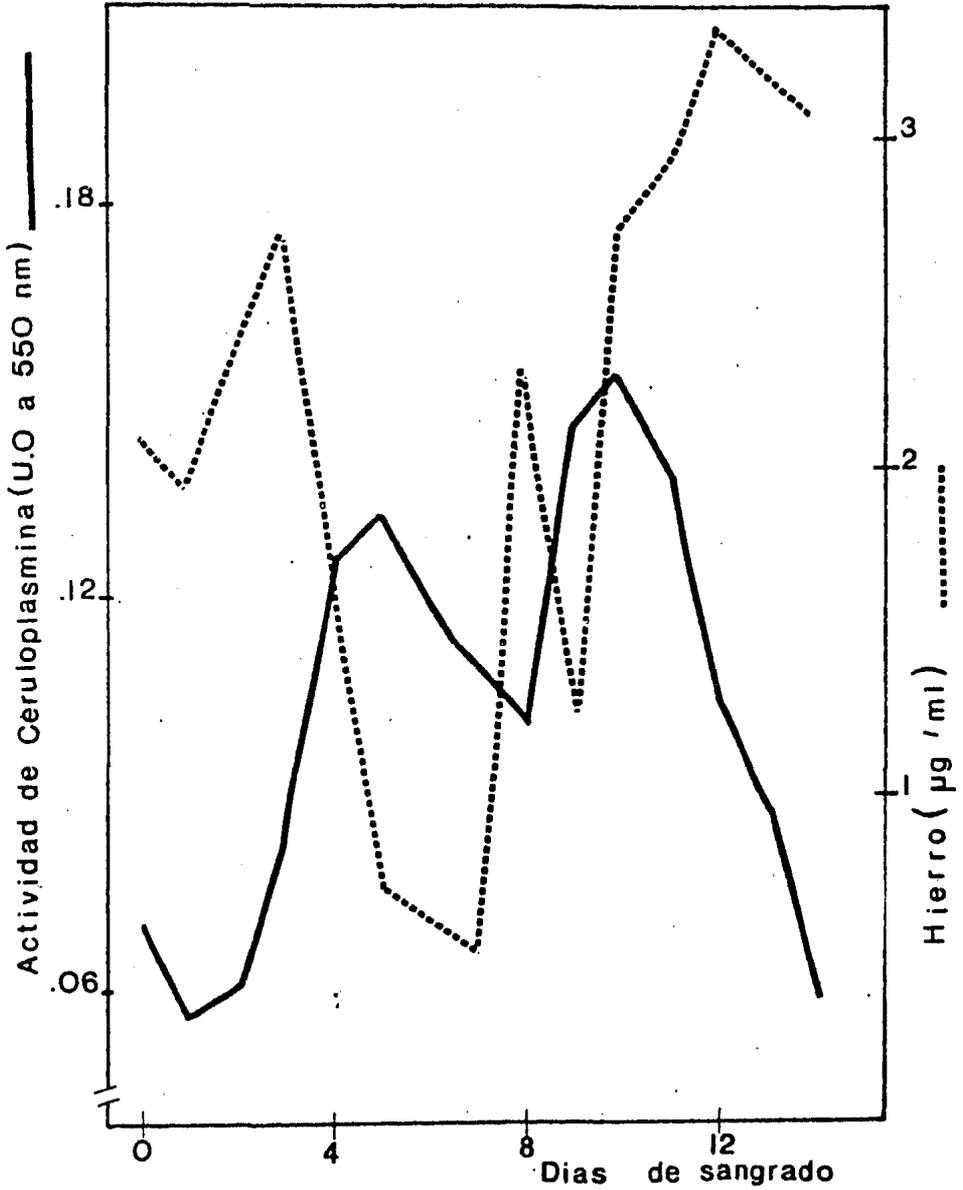
Para el conejo 8.6 (gráfica 16), la salida de hierro ocurre de 24 a 48 horas después del aumento en ceruloplasmina, mientras que para el conejo 8.5 (gráfica 17), el desfaseamiento es de 72 horas, excepto para el primer pico de hierro, que no se ve relacionado con un pico de ceruloplasmina.



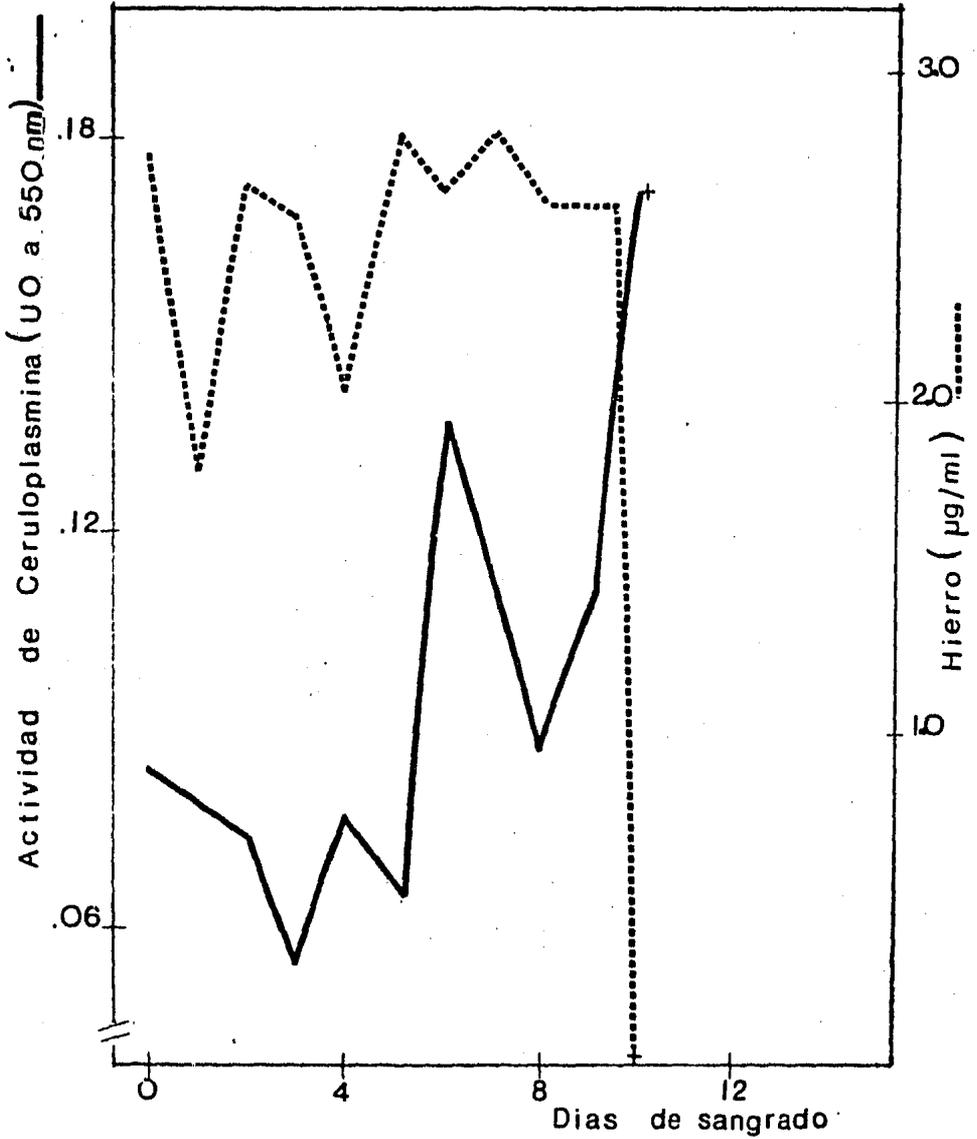
Gráfica 15.-Actividad de ceruloplasmina y concentración de hierro sérico en el conejo 8.1 durante la anemia inducida.



Gráfica 16.-Actividad de ceruloplasmina y concentración de hierro sérico en el conejo 8.6 durante la anemia inducida.



Gráfica 17.-Actividad de ceruloplasmina y concentración de hierro sérico en el conejo 8.5 durante la anemia inducida.



Gráfica 18.-Actividad de ceruloplasmina y concentración de hierro sérico en el conejo 8.4 durante la anemia inducida.

El conejo 8.4 (gráfica 18), se comportó de manera -- diferente a los demás, ya que a lo largo del sangrado no elevó sus niveles de hierro sérico con respecto al día ce ro. Se observan subidas leves en los niveles de hierro, y éstas se dan 24 horas después de aumentos en ceruloplasmina de diversas magnitudes. El día 10, este conejo bajó su concentración de hierro sérico a cero y murió al día - siguiente.

Se obtuvieron coeficientes de correlación para la ce ruloplasmina y hierro de cada conejo desfañado los valo-- res de hierro 1, 2 y 3 días con respecto a la ceruloplasmina.

Como se puede ver en la tabla X, los coeficientes de correlación no son muy altos. Esto puede deberse a que - el aumento en la concentración de hierro sérico que se da después de un aumento en la actividad de ceruloplasmina - no es siempre proporcional a este último.

T A B L A X

CORRELACION ENTRE LA ACTIVIDAD DE CERULOPLASMINA Y LA CONCENTRACION DE HIERRO EN SUERO DE CONEJOS DURANTE EL SANGRADO.

CONEJO	COEFICIENTE DE CORRELACION.		
	1 día desf.	2 días desf.	3 días desf.
8.1	0.421	0.140	
8.4	0.506	0.072	
8.5	0.049	0.030	0.429
8.6	0.378	0.387	

El promedio de actividad de ceruloplasmina y de concentración de hierro séricos para cada día de sangrado de los cuatro conejos nos da valores que se pueden correlacionar. Se calcularon los coeficientes de correlación -- desfasando 0, 1, 2 y 3 días los valores de hierro con respecto a los de ceruloplasmina y se obtuvieron los datos - que se muestran en la Tabla XI.

Se encontró que para 1 día de desfasamiento el coeficiente de correlación es significativamente diferente de cero, es decir, que hay una $p < 0.01$, de que la correlación se deba al azar.

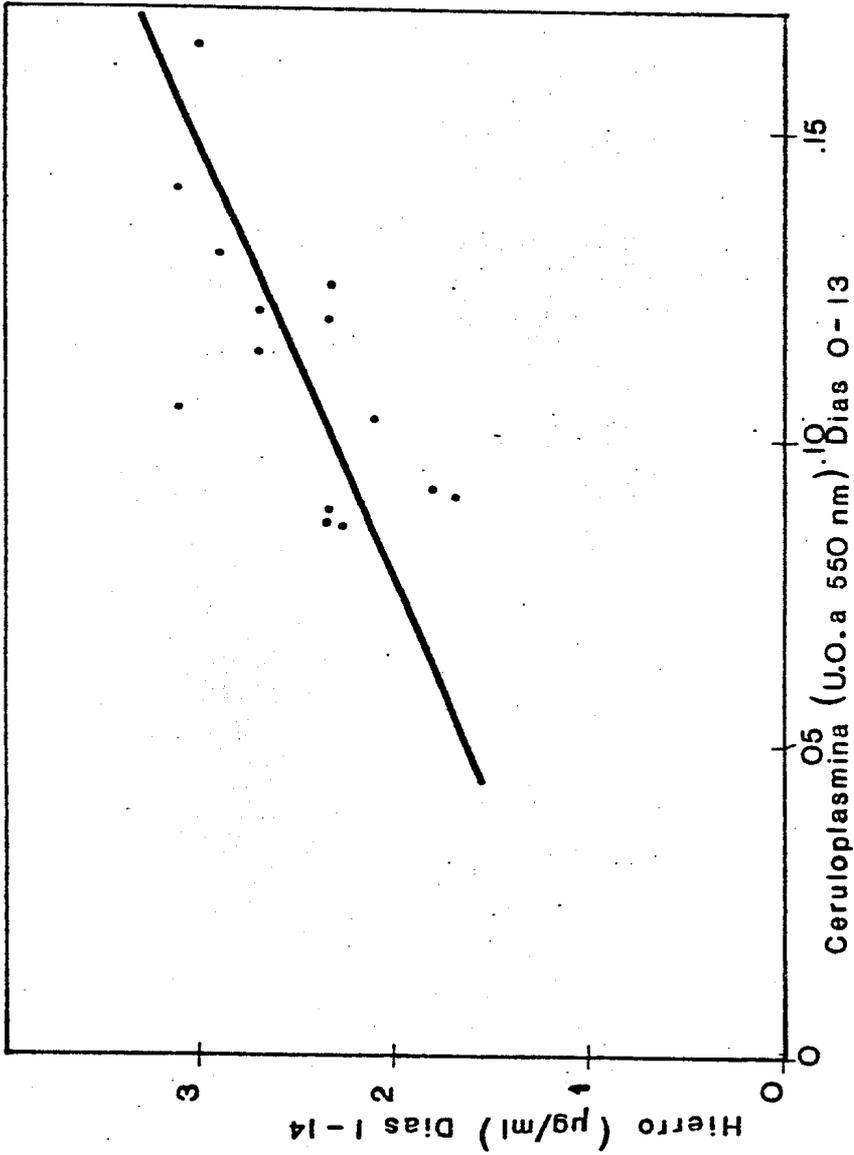
Por otra parte, es experimentos previos realizados - en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias UNAM por el Biól. Gabriel Pulido Cejudo (60), se tienen datos acerca de la variación en los niveles de hierro sérico en los conejos sujetos a anemia crónica inducida por la extracción diaria de 10 ml de sangre por kilogramo de peso. Se tienen los datos para 11 conejos machos o hembras durante 15 días de sangrado, y éstos se --

T A B L A X I

CORRELACION ENTRE LOS VALORES DE HIERRO Y DE CERULOPLAS--

MINA PARA LOS CONEJOS HECHOS ANEMICOS POR SANGRADO.

Días de desfasamiento	Coficiente de correlación
0	0.192
1	0.684
2	0.596
3	0.502



Gráfica 19.-Correlación entre la actividad de ceruloplasmina y la concentración de hierro en el suero de conejos hechos anémicos por sangrado. Los datos de hierro se han desfasado un día con respecto a los de ceruloplasmina.

muestran en promedio en la gráfica 20 y en la Tabla XII.

Nuevamente vemos que las desviaciones standard para cada punto de la gráfica son muy grandes y ésto se debe a que los conejos elevan su concentración de hierro sérico en ciclos de duración diferente y desfasados unos con respecto a otros. Sin embargo, algunos días en que hay mayor concentración de hierro sérico son significativamente diferentes al día cero debido al mayor número de datos -- promediados en cada día. Los días significativamente diferentes al día cero con una $p < 0.01$ son el 8, 12 y 13.

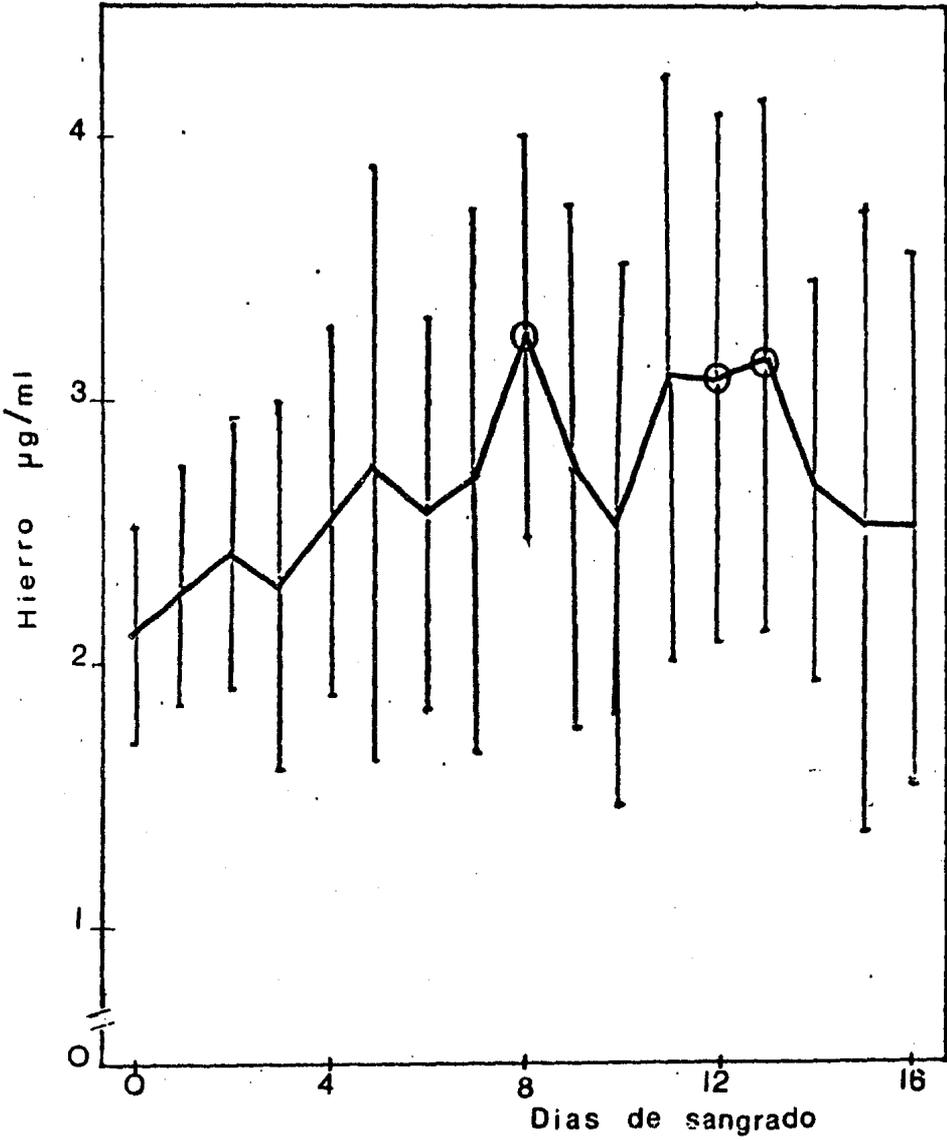
Se tomaron los promedios en la concentración de hierro sérico para estos 11 conejos durante los 15 días de sangrado y se correlacionaron con los promedios de actividad de ceruloplasmina de los 4 conejos con que se trabajó en esta ocasión. La correlación se obtuvo tomando los datos directamente, es decir, sin desfasarlos y también desfasando 1, 2 y 3 días los datos de hierro con respecto a los de ceruloplasmina. Los resultados se muestran en la Tabla XIII.

T A B L A X I I

CONCENTRACION DE HIERRO SERICO DURANTE LA ANEMIA INDUCIDA EN CONEJOS.

DIA	Mg Fe/ml \bar{X}^*	s	CV
0	2.09	0.40	19.2%
1	2.31	0.45	19.5%
2	2.39	0.48	20.2%
3	2.37	0.67	28.2%
4	2.60	0.71	27.5%
5	2.75	1.14	41.4%
6	2.57	0.75	29.2%
7	2.73	0.99	36.5%
8	3.26	0.74	22.7%
9	2.74	1.06	38.6%
10	2.54	1.03	40.5%
11	3.10	1.13	36.4%
12	3.07	0.98	32.1%
13	3.14	1.01	32.3%
14	2.69	0.78	28.9%
15	2.54	1.18	46.5%
16	2.55	1.00	39.2%

* Se muestra el promedio de 11 conejos.



Gráfica 20.-Concentración de hierro sérico en conejos durante la anemia inducida. Se marcan los días significativamente diferentes del día cero con una $p < 0.01$ (⊙).

T A B L A X I I I

CORRELACION ENTRE HIERRO SERICO PARA 11 CONEJOS Y CERULO-
PLASMINA SERICA DE 4 CONEJOS DURANTE LA ANEMIA INDUCIDA.

Días de desfasamiento	Coefficiente de correlación
0	0.106
1	0.640
2	0.731
3	0.367

La correlación para 1 y 2 días de desfaseamiento es -
significativa, con una $p < 0.01$.

Tomando en cuenta los datos obtenidos tanto de los -
conejos tratados en este experimento, como de experimen--
tos anteriores, se puede pensar en una posible relación -
entre el incremento en los niveles de ceruloplasmina y la
salida de hierro al suero 24 horas después.

D I S C U S I O N

En la primera serie de experimentos realizados como parte de este trabajo, se intentó caracterizar la reacción de oxidación del DPD (dimetilparafenilendiamina) por la ceruloplasmina, reacción que es utilizada en la cuantificación de la actividad enzimática de esta proteína.

Se pudo constatar que el Fe^{++} es un activador de la ceruloplasmina que se une a ella aumentando su afinidad por sus sustratos, en este caso el DPD. La ceruloplasmina se comporta así como una enzima alostérica que es regulada por el Fe^{++} que parece ser su principal sustrato.

Cabe entonces la posibilidad de que hormonas como -- noradrenalina, adrenalina y serotonina, que in vitro han probado ser susceptibles de oxidación por ceruloplasmina y que parecen estar reguladas por ella, como lo demuestran experimentos en los que drogas o tranquilizantes -- afectan la actividad catalítica de la ceruloplasmina sobre ellas, vendrían a ser indirectamente reguladas por la

concentración de Fe^{++} que pudiera activar a la ceruloplasmina.

Esto, claro, tendría que basarse en la suposición de que hubiera Fe^{++} libre o disponible en el suero para llevar a cabo esta regulación. Habría que demostrar entonces la existencia de Fe^{++} "libre" o no unido a transferrina en el suero en situaciones que exigieran un aumento en la actividad catalítica de la ceruloplasmina sobre estas hormonas, como por ejemplo al elevarse sus niveles debido a situaciones de alarma.

Por otra parte, se vió que el Fe^{+++} , contrariamente a lo sugerido por Curzon, no es capaz de oxidar directamente al DPD, y no es un activador de la ceruloplasmina - como lo es el Fe^{++} . El Fe^{+++} difícilmente se encuentra libre en solución, ya que es susceptible de formar hidróxidos insolubles por lo que es poco probable que cumpla con la función de activador de la ceruloplasmina en condiciones fisiológicas.

Con respecto al Cu^{++} , los resultados expuestos anteriormente demuestran que no tuvo efecto sobre la reacción de ceruloplasmina con DPD. El Cu^{++} , como se había mencionado antes, es incorporado a la ceruloplasmina en el hígado, que es el sitio donde se sintetiza esta enzima. Varios experimentos demuestran que la ceruloplasmina es incapaz de incorporar cobre a su molécula después de salir a la circulación.

El cobre por sí solo es capaz de oxidar al DPD, pero únicamente en muy altas concentraciones y aún así no logra una oxidación completa de este sustrato, lo cual demuestra que la oxidación del DPD es debida a una reacción enzimática específica en la que interviene tanto la parte peptídica de la enzima como el cobre unido a ella en su centro activo.

El EDTA, reportado como inhibidor de la ceruloplasmina, parece funcionar como quelante del cobre unido a esta enzima, disminuyendo así su actividad enzimática hasta en un 82%. Cabe mencionar que este efecto se da únicamente-

a muy altas concentraciones del EDTA, lo cual implica que el cobre removido de la ceruloplasmina se encuentra firmemente unido a ella y que no es fácilmente dissociable. Esto concuerda una vez más con la idea de que la ceruloplasmina no libera su cobre fácilmente al salir a la circulación y que si es que tiene la función de transportar cobre a ciertos tejidos, lo entrega incorporándose totalmente a ellos. La vida media de la ceruloplasmina es de 54 horas, lo cual es bastante corto comparado con el de otras enzimas y podría ser así debido a su rápida incorporación a los tejidos en los que libera cobre.

Por otra parte, el experimento en el que se indujo anemia crónica a conejos, condujo a una serie de resultados que se discutirán a continuación.

En primer lugar, se obtuvieron los valores hematológicos para cada día del sangrado, y éstos concuerdan con resultados previamente reportados (59), a diferencia de otros experimentos similares, se observa una menor dispersión en los datos individuales debido quizás a la homoge-

neidad de los conejos utilizados en este experimento.

Estos conejos, nacidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM, provenían de una madre que se había -- comportado como buena productora de sangre en experimen-- tos anteriores de inducción de anemia crónica, y, al pare-- cer, heredaron esta característica, ya que respondieron - a la anemia produciendo más hemoglobina y células rojas - que el promedio de conejos hasta entonces analizados. -- Puede observarse, sin embargo, que el aumento en la pro-- ducción de hemoglobina no se da en la misma proporción -- que el aumento en el número de eritrocitos, por lo que al combinar ambos parámetros para obtener la cantidad de he-- moglobina por célula (MCH), se ve que ésta aumenta consi-- derablemente durante todo el experimento.

Esto nos indica que hay factores limitantes en la - producción acelerada de sangre, y que estos factores ac-- túan a distintos niveles. En este caso, tal parece que - la producción de células, que depende del número de célu-- las progenitoras que se están multiplicando y de la sínte

sis de ácidos nucleicos, está más limitada que la producción de hemoglobina que depende del aporte de hierro y de la síntesis de las cadenas de globina.

Con respecto a la ceruloplasmina, pudimos ver que el estímulo de la eritropoyesis producido por el sangrado -- provocó un cambio en los niveles de esta enzima.

Como se observa en la gráfica 12, no hubo un cambio en la actividad de ceruloplasmina durante los primeros -- cuatro días de sangrado (0:3), lo cual apoyaría la idea -- de que la ceruloplasmina no es una proteína reactante de fase aguda (APR), porque si lo fuera se habría notado un aumento inmediato en su concentración.

A partir del quinto día de sangrado (día 4), se ob-- serva el aumento en la actividad de ceruloplasmina en forma cíclica, es decir, que hay aumento y descenso en la actividad de ceruloplasmina en ciclos que en promedio duran de dos a tres días.

Esta variación en la actividad de ceruloplasmina es comparable a los cambios en concentración de hierro sérico durante la anemia, los cuales se dan también de manera cíclica. Como se mencionó anteriormente, el aumento en la concentración de hierro sérico parece darse en promedio un día después del aumento en la concentración de ceruloplasmina circulante, y estadísticamente la correlación para un día de desfase entre la salida de ceruloplasmina a la circulación y el aumento en la concentración de hierro sérico es significativa, tanto para los cuatro conejos con los que se trabajó en este experimento y a los que se midió ceruloplasmina y hierro séricos, como para once conejos utilizados en experimentos previos a los que se midió únicamente hierro sérico.

El cambio en la actividad de ceruloplasmina y de hierro de manera cíclica y con un día de desfase podría deberse a la siguiente serie de eventos:

- a) El sangrado diario estimula la eritropoyesis y con ello la síntesis de hemoglobina.

b) El incremento en la síntesis de hemoglobina hace que se requiera de un mayor aporte de hierro por parte de la transferrina a los sitios hemotopoyéticos.

c) Disminuye entonces la cantidad de hierro en la - circulación y se produce una señal que indica la necesidad de un aumento en la tasa de liberación de hierro de - los sitios de almacenamiento para su incorporación a la - transferrina.

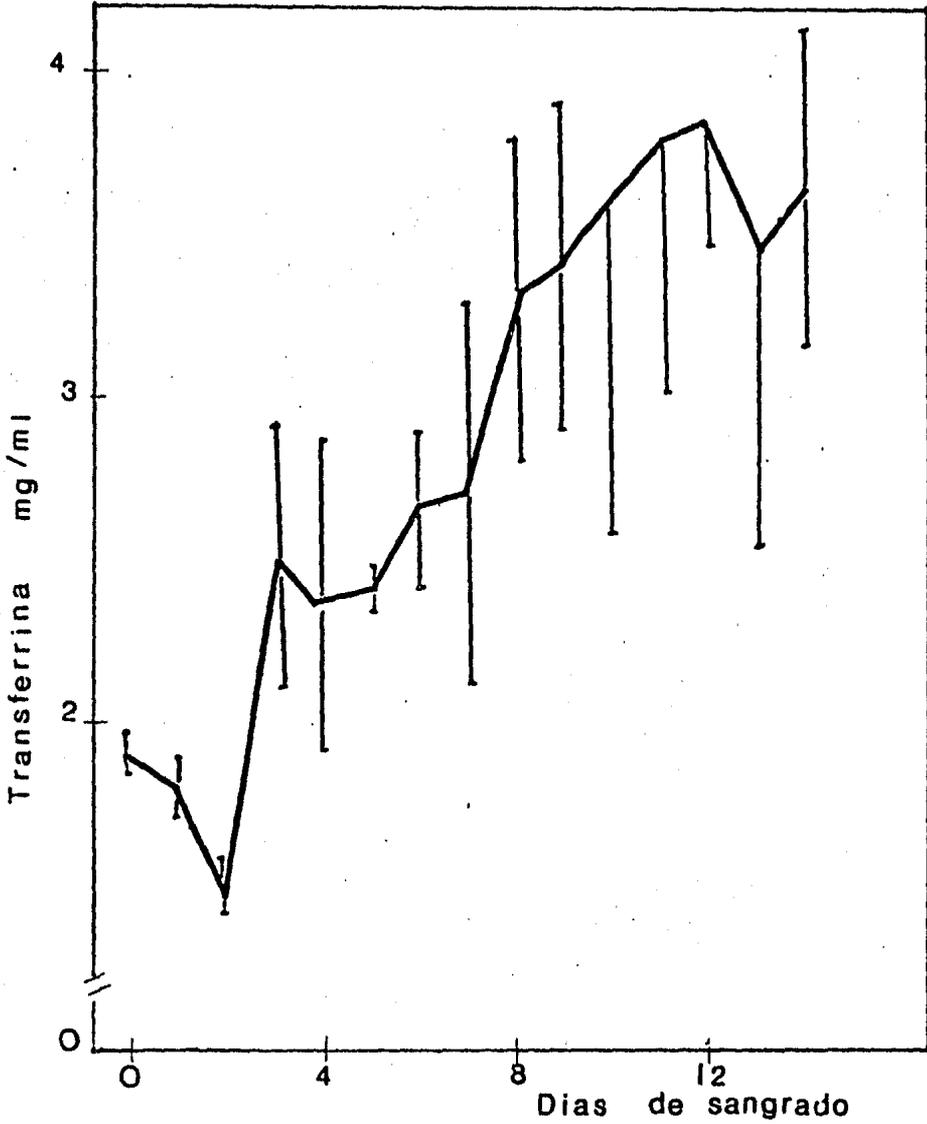
d) La señal estimula la salida de ceruloplasmina a la circulación o de alguna manera hace más activa a la ce ruloplasmina circulante, y al aumentar la actividad de es ta enzima en el suero se libera más hierro de los sitios- de almacenamiento, con lo que aumenta la concentración de hierro en el suero llegando a un máximo 24 horas después.

e) Cesa entonces la señal que provocó el aumento en actividad de ceruloplasmina y disminuye la actividad de - ella en el suero.

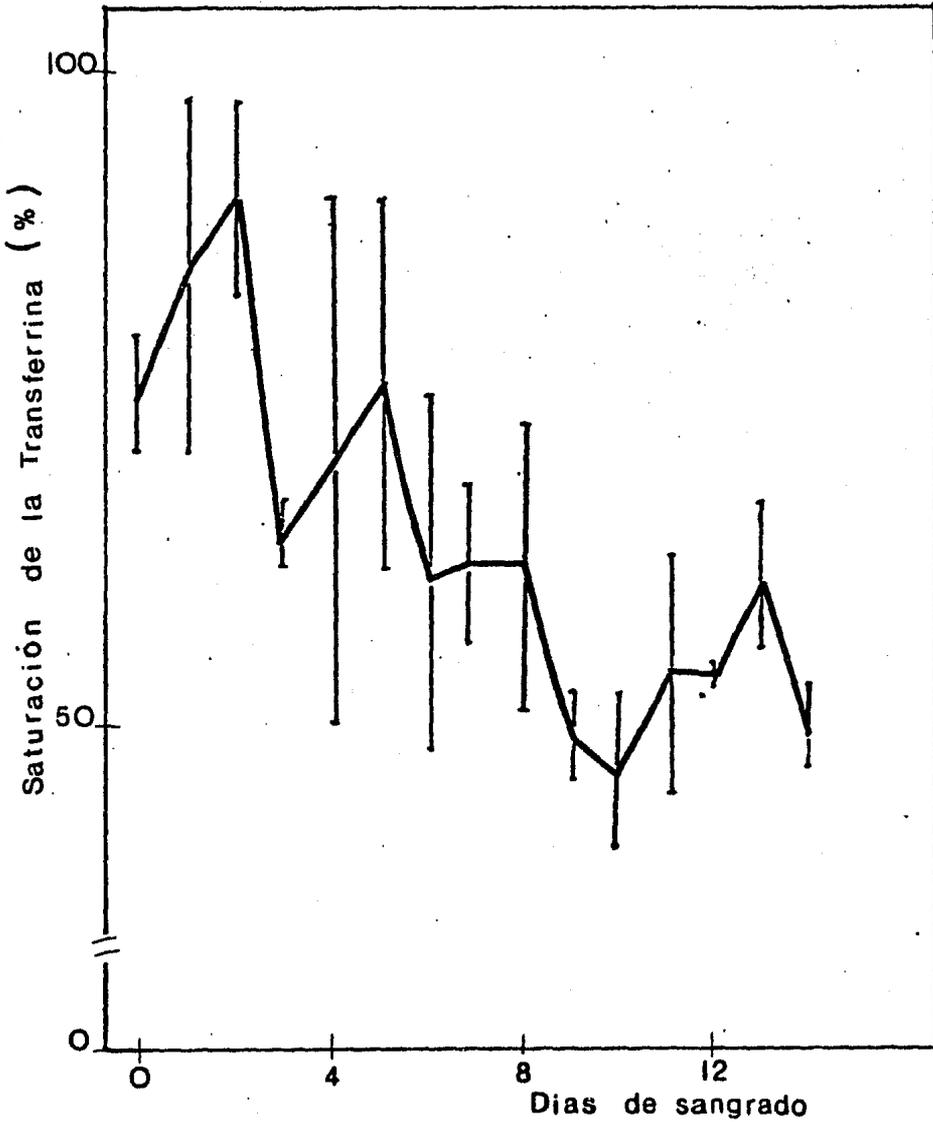
f) La disminución en la actividad de ceruloplasmina hace que baje la tasa de liberación de hierro de los sitios de almacenamiento, y, al mantenerse el estímulo de la eritropoyesis por el sangrado, sigue habiendo una alta incorporación de hierro en hemoglobina, por lo que disminuye de nuevo la concentración de hemoglobina en suero y se produce la señal para el aumento en la actividad de ceruloplasmina, iniciándose así un nuevo ciclo.

La señal que provoca el aumento en la actividad de ceruloplasmina podría ser el aumento en los niveles de apotransferrina, ya que, en experimentos previos al descrito en este trabajo se ha medido la cantidad de transferrina y de hierro séricos en conejos durante la anemia, y se observan cambios cíclicos en la saturación de transferrina, lo cual podría indicar que durante la anemia la concentración de apotransferrina varía. (Gráficas 21 y 22)

Durante los tres primeros días de sangrado, la saturación de la transferrina aumenta debido a la disminución en la concentración de esta proteína en el suero, mien---



Gráfica 21.-Concentración de transferrina del suero de conejos durante la anemia inducida por sangrado diario. Se muestra el promedio de once conejos.



Gráfica 22.- Saturación de la transferrina del suero de conejo durante la anemia inducida por sangrado diario. Se muestra el promedio de once conejos.

tras que los niveles de hierro no varían apreciablemente. Esto podría explicar el que los niveles de ceruloplasmina se mantengan constantes durante estos primeros días.

Posteriormente, la saturación de la transferrina comienza a disminuir debido a un aumento desproporcionado en la concentración de transferrina y de hierro en el suero, es decir, que aumenta en mayor medida la concentración de transferrina que la de hierro. Posiblemente la baja saturación de la transferrina, que podría considerarse con un aumento en los niveles de apotransferrina, estimula la salida de ceruloplasmina a la circulación.

La saturación de la transferrina varía a lo largo del sangrado en forma cíclica, observándose una tendencia a alcanzar niveles bajos que se mantienen aproximadamente en un 50% de saturación hacia los últimos días del sangrado. La ceruloplasmina, en respuesta, se incrementa en mayor medida hacia los últimos días del sangrado.

Si se correlacionan los valores de saturación de la

transferrina con los de actividad de ceruloplasmina durante la anemia desfasando estos últimos un día con respecto a los primeros, se obtiene un coeficiente de correlación de -0.590 , con una $p < 0.01$. Esto parece indicar que -- hay una relación inversa entre la saturación de la transferrina y la concentración de ceruloplasmina, y apoya la hipótesis de que la disminución en la saturación de la -- transferrina es la señal que provoca el aumento en la actividad de ceruloplasmina del suero durante la anemia.

Cabe mencionar que en el experimento descrito en este trabajo no se midió la concentración de transferrina en el suero a los conejos a los que se indujo la anemia, por lo que la estimulación de la actividad de ceruloplasmina debida a una disminución en la saturación de la -- transferrina debe tomarse con reservas, mientras no se haga un experimento en el que se induzca anemia crónica a conejos por sangrado diario y se mida actividad de ceruloplasmina y concentración de hierro y transferrina séricos para cada día.

Por otra parte, se puede decir que los datos obtenidos para cada uno de los parámetros que se midieron en este experimento muestran una gran dispersión al promediarse, es decir, que se tienen desviaciones standard muy altas en todas las gráficas promedio, lo cual se debe a la variabilidad biológica que se da en experimentos con bajo número de muestras.

Estas desviaciones podrían quizás disminuir si se hacen experimentos que abarquen un mayor número de individuos aunque para ello deban salvarse ciertas dificultades técnicas, como lo es la obtención de los valores hematológicos para cada día de sangrado.

R E S U M E N

Los experimentos que se describen en este trabajo -- nos permitieron conocer un poco acerca de las características de la enzima ceruloplasmina, la cual es una ferroxidasa que es activada por su propio sustrato principal, el Fe^{++} , para actuar sobre otros sustratos como el DPD. Esta activación no se da con el Fe^{+++} ni con el Cu^{++} . La apotransferrina no causó efecto alguno sobre la actividad de la enzima, lo cual indica que en las condiciones en -- que se trabajó la enzima no contenía Fe^{++} pegado a su molécula; el EDTA, en cambio, a muy altas concentraciones -- inhibió la actividad de la enzima, posiblemente quelando -- parte del cobre de su centro activo.

Durante la anemia se dan ascensos y descensos en la actividad de ceruloplasmina en el suero a partir del cuarto día de sangrado, en respuesta quizás a una mayor necesidad de salida de hierro de los sitios de almacenamiento. La ceruloplasmina, al parecer, provoca la salida de hierro a la circulación 24 horas después de haber aumentado su -

actividad en el suero.

Se propone a la apotransferrina como un posible factor que induce el aumento en la actividad de ceruloplasmina en el suero.

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

- 1.- Frieden E. (1968). The biochemistry of copper. - Scientific American. Mayo. 103-114.
- 2.- Cass A. (1980) Copper and copper enzymes in "Biological Roles of Copper". Ciba Foundation Symposium. 71-93.
- 3.- Frieden E. (1971). Ceruloplasmin: A link between copper and iron metabolism. Bioinorganic Chemistry. Advances in Chemistry Series. ACS 100. 292-321.
- 4.- Evans (1973). Copper homeostasis in the mammalian system. Physiologica Review. Vol. 53 No.3. 535-570.
- 5.- Frieden E. (1965). Copper proteins and oxygen. - Journal of General Physiology. Vol. 49. 213-252.
- 6.- Hassan H. (1980) Superoxide dismutases in "Biological Roles of Copper". Ciba Foundation Symposium. 125-243.
- 7.- Harris E.D. (1980) Copper and the synthesis of -- elastin and collagen in "Biological Roles of Copper". Ciba Foundation Symposium. 163-183.
- 8.- Holmberg C., C. Laurell (1948) Investigations in serum copper. Acta Chemica Scandinavica. Vol. 2. 550-556.
- 9.- Frieden E., H. Hsieh. (1976). Ceruloplasmin: the copper transport protein with essential oxidase activity.- Advances in Enzymology. Vol. 44. 187-236.
- 10.- Frieden E. (1980) Multifunctions of ceruloplasmin in "Biological Roles of Copper". Ciba Foundation Symposium. 93-125.
- 11.- Handbook of Biochemistry and Molecular Biology - Proteins Vo. II. Fasman CRC Press. (1976).

- 12.- Putman (1976) The plasma proteins.
- 13.- Deinum et al. (1973) The stoichiometry of the paramagnetic copper and the oxidation-reduction potentials of Type I copper in human ceruloplasmin. *Biochemical and Biophysical Acta*. Vol. 310. 321-330.
- 14.- Calabresse L. et al. (1981) Purification and properties of bovine ceruloplasmin. *Biochemical Journal* Vol. 199. 667-673.
- 15.- Ryden L. (1976) Reinvestigation of some physico-chemical and chemical properties of human ceruloplasmin. - *Biochemistry*. Vol. 15. No.16. 3411-3417.
- 16.- Magdoff-Fairchild et al. (1969) *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 241. No.3497. Cited in 9.
- 17.- Ryden L. (1972) Comparison of polypeptide chain-structure of four mammalian ceruloplasmins by gel filtration. *European Journal of Biochemistry*. Vol. 28. 46-50.
- 18.- Kaya T. (1964) Isolation and analysis of multiple forms of ceruloplasmin. *Journal of Biochemistry*. -- Vol. 56. No.2. 122-127.
- 19.- Richterich R. (1962) Die heterogenität des ceruloplasmins. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 56. 240-251.
- 20.- Ryden L. (1971) Evidence for proteolytic fragments in commercial samples of human ceruloplasmin. *FEBS Letters*. Vol. 18, No.2. Nov. 321-325.
- 21.- Kenett C. (1970) Human plasminogen and plasmin. *Methods in enzymology*. Vol. 19. 184-199.
- 22.- Kenneth C. (1975) Plasminogen and Plasmin. *Methods in enzymology* Vol. 45-B. 257-273.

23.- Alkjaersig No. (1959) Epsilonaminocaproic acid: an inhibitor of plasminogen activation. Journal of Biological Chemistry. Vol. 234: 832-837.

24.- Ryden L. (1972) Single chain structure of human ceruloplasmin. European Journal of Biochemistry. Vol. 26. p. 380-386.

25.- Lwenstein H. (1975) Int. J. Peptide Protein Res. Vol. 7 No.1. Cit. en 9.

26.- Holtzman N A et al (1970) J. Biol. Chem Vol. -- 245. P 2354 cit. en 9.

27.- Hickman et al (1970) Physical and Chemical studies on ceruloplasmin. Journal of Biological Chemistry.- Vol. 245 No.4 p. 759-766.

28.- Linder M.C. et al. (1979) Enzyme. 24. p 23-25 - cit. en 49.

29.- Bush J. (1955) Studies on copper metabolism. J. Clin. Inv. Vol. 34. p 1766-1782.

30.- Gregoriadis G. et al (1970) Regulation of hepatic copper in the rat by the adrenal gland. Canadian - - Journal of Biochemistry. Vol. 48. p 160-163.

31.- Meyer B. et al (1958) Factors influencing serum copper and ceruloplasmin oxidative activity in the rat. - American Journal of Phisyology. Vol. 194. p 581-584.

32.- Dowdy R. et al. (1972) Effect of training and - exercise on serum ceruloplasmin in rats. Proceedings of the Society of Experimental Biology Medicine. Vol. 139. - p 489-491.

33.- Gordon A. (1970) The effects of trauma and partial hepatectomy on the rates of synthesis of plasma proteins by the liver in Plasma Protein Metabolism. Roths--- child M. editor. Academis Press.

34.- Mc Dermott (1968) Role of iron in the oxidase - activity of ceruloplasmin. Biochem et Biophys Acta Vol.- 151. p 544-557.

35.- Osaki S. et al (1966) The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum. J. Bio Chem. Vol. 241 No.12 p. 2746-2751.

36.- Lovstad R. (1969) A comparative study of the -- two different activities of ceruloplasmin in human sera.- European Journal of Biochemistry. Vol. 8 p 303-306.

37.- Huber C. et al (1970) Substrate activation and the kinetics of ferroxidase. Journal of Biological Chemistry Vol. 245 No. 15 p 3973-3978.

38.- Huber C. et al (1970) The inhibition of ferroxidase by trivalent and other metal ions. Journal of Biological Chemistry. Vol. 245 No.15 p 3879-3984.

39.- Topham K. et al (1970) Identification and purification of a non-ceruloplasmin ferroxidase of human serum. Journal of Biological Chemistry. Vol. 245 No.24 -- p 6698-6705.

40.- Garnier A. et al (1981) Ferroxidase II. The -- essential role of copper in enzymatic activity. Biochem - Biophys Res Comm. Vol. 98 No.1 p 66-71.

41.- Lee R. (1969) The contribution of citrate to -- the ferroxidase activity of serum. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Vo. 131. p. 918-923.

42.- Kojima N., G. Bates (1981). The formation of -- Fe^{3+} -Transferrin- CO_3^{2-} via the bonding and oxidation of -- Fe^{2+} . Journal of Biological Chemistry. Vol. 256 No.23 -- p 12034-12039.

43.- Rama J., R. Chrichton. (1980) The role of ceruloplasmin in Fe (III)-Transferrin formation in vitro. - - FEBS Letters Vol. 110 No.2 p268-279.

44.- Harris D. (1973) Facilitation of Fe (II) autoxidation by Fe (III) complexing agents. *Biochemical et Biophysical Acta*. Vol. 329 p 156-158.

45.- Curzon G. (1960) The purification of human ceruloplasmin. *Biochemical Journal*. Vol. 74.

46.- Curzon G. et al (1960) a coupled iron-ceruloplasmin oxidation system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* Vol. 2 No.4 p 284-286.

47.- Curzon G. (1961) Some properties of coupled -- iron-ceruloplasmin oxidation systems. *Biochemical Journal*. Vol. 79 p 656-663.

48.- Young S. (1972) A method for obtaining linear - reciprocal plots with caeruloplasmin and its application - in a study of the kinetic parameters of caeruloplasmin -- substrates. *Biochemical Journal*. No.129. p 273-283.

49.- Roeser H. et al (1970) The role of ceruloplasmin in iron metabolism. *J. Clin. Inv.* Vol. 49 p 2408-3417.

50.- Osaki et al. (1971) The mobilization of iron -- from the perfused mammalian liver by a serum copper enzyme, Ferroxidase I. *J. Biol. Chem.* Vol. 246 No.9 p 3018-3023.

51.- Sarkar B. (1967) Evidence for albumin-Cu (II)-amino acid ternary complex. *Can. J. Biochem.* Vol. 46 p 601-607.

52.- Linder M. (1977) Plasma ceruloplasmin. Evidence - for its presence in and uptake by heart and other organs - of the rat. *BiochemBiophys. Acta*. Vol. 449 p 329-336.

53.- Campbell C. et al (1981) Circulating ceruloplasmin is an important source of copper for normal and malignant animal cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 678 p 27-38.

54.- Hsieh H. (1975) Evidence for ceruloplasmin as a copper transport protein. *Biochem Biophys Res Comm* Vol. 67 No.4 p 1326-1331.

55.- Barrass B. (1972) Effects of some centrally -- acting drugs on cerul plasmin. Progress in Brain Research. Vol. 36. p 97-104.

56.- Johnson, D.A. et al (1967) J. Biol. Chem. Vol.- 13, 142. cit. en 3.

57.- Rice, E.W. (1962) Anal Brochem. Vol. 3, 542. -- Cit. en 9.

58.- Wintrobe M. (1961) Clinical Hematology. Ed. Lea and Febiger. U.S.A.

59.- Valdes V. (1977) Estudios sobre la dinámica de formación de sangre en conejos hechos anémicos por sangrado. Tesis Profesional. U.N.A.M.

60.- Pulido G. (1982) Estudio de los mecanismos involucrados en el transporte de hierro en conejos hechos anémicos por sangrado. Tesis Profesional. U.N.A.M.

22 B.- Feeny R. (1969) Inhibition of human trypsin, plasmin and trombin by naturally occurring inhibitors of proteolytic enzymes. J. Biol. Chem. Vol. 224 No.8.