

00381
29



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE
LA CERULOPLASMINA DE CONEJO Y SU
PARTICIPACION EN EL METABOLISMO
DEL HIERRO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)**

**P R E S E N T A :
ALEJANDRA MAINERO DEL PASO**

Director de Tesis: Dr. Jaime Martínez Medellín

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
ÍNDICE.....	v
ABREVIATURAS.....	vi
INTRODUCCIÓN	1
A. PURIFICACIÓN.....	1
B. LA CERULOPLASMINA Y SUS FRAGMENTOS	2
C. ESTRUCTURA DE LA CERULOPLASMINA.....	3
D. CERULOPLASMINA EN OTRAS ESPECIES.....	4
E. METABOLISMO DE LA CERULOPLASMINA.....	5
F. EL COBRE EN LA CERULOPLASMINA.....	6
G. EL GEN DE LA CERULOPLASMINA.....	8
H. EVOLUCIÓN DE LA CERULOPLASMINA.....	9
I. FUNCIÓN DE LA CERULOPLASMINA.....	9
1. La ceruloplasmina como amino-oxidasa	10
2. Actividad de ferroxidasa	11
3. Actividad de superóxido dismutasa.....	12
4. Transporte de cobre.....	12
J. VARIACIONES DE LA CERULOPLASMINA	13
OBJETIVO	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
1. Purificación de la Ceruloplasmina	17
2. Determinación de la Concentración de Proteína.....	18
3. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (PAGE)	20
4. Inducción de Anticuerpos contra la Ceruloplasmina.....	20
5. Purificación de los Anticuerpos contra la Ceruloplasmina.....	21

6. Inducción de la Anemia	22
7. Determinación de hierro sérico.....	22
8. Determinación de la Concentración de Transferrina en Suero	23
9. Cuantificación de la Actividad de Ceruloplasmina	23
10. Determinación de la Concentración de Ceruloplasmina.....	24
11. Análisis Estadístico	24
RESULTADOS.....	25
1. Purificación de la Ceruloplasmina	25
2. Obtención de Anticuerpos contra la Ceruloplasmina.....	32
3. Anemia Experimental.....	33
4. Concentración y Actividad de la Ceruloplasmina.....	37
DISCUSION	44
CÓNCLUSIONES.....	50
REFERENCIAS.....	51

ABREVIATURAS

ACTH	Hormonas Adreno-Cortico-Tróficas
APR	Reactante de fase aguda
BSA	Albumina de suero bovino
Cp	Ceruloplasmina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
D.O.	Densidad Óptica
DPD	N,N-dimetil-1,4-fenilendiamina
DEAE	Dietilaminoetil
EDTA	Ácido etilendinitrilotetracético
EPR	Resonancia Paramagnética del Electrón
°C	grados Centígrados
kDa	kilodaltones
kg	kilogramo
µg	microgramo
mg	miligramos
ml	mililitro
nm	nanometros
pb	pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
p/v	peso/volumen
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
rpm	revoluciones por minuto
S	Svedberg
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Tris	Tris (hidroximetilamino)metano (Trometamo)
v/v	volumen/volumen

INTRODUCCIÓN

El cobre es probablemente el primer metal conocido por el hombre, ya que se han encontrado instrumentos de cobre en las tumbas egipcias que datan de 5000 A.C. Las antiguas minas de cobre se localizaban en la isla de Chipre y la palabra cobre se derivó originalmente de *cyprum* que se modificó después a *cuprum*. Sin embargo, la identificación del cobre en los seres vivos tiene únicamente 150 años (1, 2). Holmberg (3) reportó en 1944 por primera vez una proteína azul de la fracción de α_2 -globulinas del suero humano que contiene cobre y que posee actividad enzimática de oxidasa. Fue llamada ceruloplasmina (Cp) por Holmberg y Laurell en trabajos posteriores (4-7) en los que describieron la purificación y otras observaciones básicas acerca de sus propiedades químicas. En la actualidad se le ha asignado el nombre de ceruloplasmina [Cp; ferroxidasa; hierro(II): oxígeno oxidoreductasa, EC 1.18.3.1] (8-10).

A. PURIFICACIÓN

El trabajo original, en el cual Holmberg y Laurell (5) aislaron a la ceruloplasmina del suero de humano, mostró que el cobre presente en el suero puede precipitarse por saturación al 50% con sulfato de amonio obteniendo una fracción de color azul con un contenido de cobre de alrededor de 0.03%. Al tratar el sobrenadante con alcohol y cloroformo y fraccionar nuevamente con sulfato de amonio pudieron separar una proteína con un contenido de cobre de 0.35% a la que llamaron ceruloplasmina (Cp). Posteriormente Steinbuch (11) propuso un método que emplea el fraccionamiento del suero con rivanol y la extracción del precipitado con alcohol etílico. Estas primeras purificaciones de la Cp se lograron antes de que se dispusiera de los métodos cromatográficos, y dependían por tanto, de pasos de precipitación.

Más tarde Sanders *et al* (12) y Curzon y Vallet (13), describieron un procedimiento para aislar la Cp del plasma humano empleando la cromatografía de intercambio iónico. Broman (14) introdujo la cromatografía en hidroxilapatita reportando dos componentes de la Cp. Este hallazgo fue corroborado por Richterich (15) quien encontró que los dos componentes presentan diferentes propiedades fisicoquímicas: peso molecular, contenido de cobre y contenido de carbohidratos. Estos procedimientos parten en general de suero envejecido, de fracciones de Cohn (11-15) o bien de suero retroplacental (16) que es particularmente rico en ceruloplasmina.

En el primero de una serie de trabajos, Deutsch (17) describió la cristalización de la ceruloplasmina, y Deutsch y Fisher (23) utilizaron Cp aparentemente pura y encontraron tres fracciones al recromatografarla en hidroxilapatita. El 12% del total presentó propiedades físicas y químicas idénticas a las de la Cp, pero con movilidad que correspondía probablemente a agregados, mientras que la fracción que representa el 3% del total parecían ser subunidades. La característica sobresaliente del trabajo de Kasper (18) fue sin duda el establecimiento de la sensibilidad de la Cp al medio. Encontró que amortiguadores tales como el barbitol, Tris, EDTA o agentes quelantes o reductores, y aún la cromatografía prolongada en DEAE ocasionaban cambios notables en el patrón electroforético de la Cp. Observó también que las preparaciones viejas de Cp mostraban una pérdida del color azul y la presencia de componentes de alta movilidad iónica y que el proceso de pérdida del cobre no es reversible. La inestabilidad de la Cp quedó de manifiesto en varios estudios más que mostraron que agentes para la determinación de grupos tiol ocasionan la pérdida de color azul y de la actividad de oxidasa. Deutsch y su grupo publicaron después (19) un método para purificar a la Cp a partir de la fracción IV-1 de Cohn que contiene aproximadamente la mitad de la Cp presente en el plasma fresco. Las características fisicoquímicas y la inestabilidad de la Cp fueron reportadas por Kasper y Deutsch (18) que obtuvieron apoproteína por el método de diálisis contra soluciones de cianuro, método que luego fue modificado al reducir a la proteína con ácido ascórbico seguido por el tratamiento con el agente quelante N,N-diethylcarbamato (20) que sin embargo ocasiona la formación de agregados. También se reportó (21) que el almacenamiento a -80°C era mejor que a -20°C. El procedimiento descrito por Morell (22) para obtener cristales a partir de soluciones acuosas de Cp, ocasiona la formación de agregados proteicos después de 1 a 3 días a temperatura ambiente. Con estos an-

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

tecedentes, Broman y Kjellin (18) desarrollaron un método de separación "rápido, cíclico y semicon-
tinuo" en el cual se evitan los procedimientos destructivos para obtener un producto homogéneo.

Así, con el descubrimiento de que la ceruloplasmina es altamente sensible al ataque proteolítico, Rydén (24) propuso iniciar la preparación de la Cp a partir de suero o plasma fresco en presencia de un inhibidor de proteasas tal como el ácido α -amino caproico. A partir de este punto podemos encontrar un interés en el mejoramiento de las técnicas de preparación de la Cp utilizando las metodologías ya establecidas y que dan como resultado la obtención de la proteína sin degradar (25-28).

B. LA CERULOPLASMINA Y SUS FRAGMENTOS

Poulik (29) fue el primero en describir varias subunidades que conformaban a la molécula de la Cp, hallazgo que fue confirmado después por otros investigadores (30-33), quienes postularon que la Cp presenta una estructura octamérica $\alpha_4 \beta_4$ o bien una estructura tetramérica $\alpha_2 \beta_2$. En estos modelos se proponía la existencia de cadenas ligeras y pesadas con un peso molecular de 18,000 y 60,000 daltones respectivamente. El reporte de que la Cp porcina presenta una sola cadena polipeptídica (34) llevó a Rydén a reinvestigar a la Cp humana y a compararla con la estructura de la proteína aislada de otras tres especies de mamíferos (35-38). La Cp obtenida tanto de humano como de cerdo, caballo y conejo consiste de una cadena polipeptídica única con un peso molecular cercano a 120,000. Preparando una muestra de Cp de suero humano en presencia de un inhibidor de proteasas, ácido α -amino caproico, se obtuvo una cadena única y un fragmento de 17,000 típico de muestras degradadas, mientras que tratándola con tripsina, se obtuvieron fragmentos similares a los descritos como subunidades (24, 30, 37).

Hoy en día sabemos que la ceruloplasmina es una glicoproteína monomérica del suero que en el humano consiste de 1,046 residuos de aminoácidos, 0.3% de cobre que corresponde a 6-7 átomos de cobre de tres tipos diferentes y 7.8% de carbohidratos. Su pH isoeléctrico es de 4.4 y su coeficiente de sedimentación de 7.2 S (1-2, 8-9). Estas características se encuentran resumidas en la Tabla 1.

TABLA 1

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA CERULOPLASMINA HUMANA

M _r (Peso molecular relativo)	
Equilibrio de Sedimentación	134,000 ± 3,000
Electroforesis en SDS	123,000 - 135,000
Contenido de Cobre	0.30 ± 0.3%
Contenido de Carbohidratos	7 - 8%
E _{610nm} ^{1%}	0.69 ± 0.01
E _{280nm}	15.0 ± 0.4
pH Isoeléctrico	4.4
Constante de Sedimentación	7.2 S

Tomado de Frieden y Hsieh (9) y Rydén (8).

Por otro lado Carrico (38) y Holtzman (39) reportaron la presencia de una forma apo en el suero humano y en ratas, que presentaba un bajo contenido de cobre y sin actividad de oxidasa, hecho que ya había sido mencionado por Kasper (40) quien detectó la aparición de nuevos determinantes antígenicos como resultado de un cambio conformacional de la molécula en ausencia de cobre.

Basado en datos Inmunoquímicos Lowenstein (9) propuso que la ceruloplasmina humana contiene un enlace peptídico sensible a proteasas y cuya ruptura genera dos péptidos inactivos con pesos de 93,000 y 24,000. Asimismo, los estudios de Kingston (41) y de Moshkov (42) confirmaron la presen-

clia de la Cp *in vivo* como una cadena polipeptídica única con cuando menos 5 enlaces que son puntos específicos de fragmentación proteolítica.

Cabe mencionar, finalmente, la presencia de múltiples formas de la Cp humana con pesos moleculares aparentes de 200,000, 135,000 y 115,000. Estas tres formas se encuentran en circulación y presentan actividad de oxidasa, y aún cuando el entrecruzamiento de la Cp 135 resulta en dímeros con movilidad electroforética similar a la Cp 200, en el hígado se detectó la presencia de dos tipos de mRNA para Cp que codifican para Cp 135 y Cp 200 (43).

C. ESTRUCTURA DE LA CERULOPLASMINA

La proteólisis limitada de la Cp en condiciones controladas ha sido utilizada para determinar la estructura de la cadena polipeptídica de la Cp. Se ha determinado la presencia de tres fragmentos autolíticos principales: uno de 87,000 que corresponde al extremo amino de la cadena; uno de 50,000 que es el central y uno de 19,000 que es el extremo carboxilo, mientras que la degradación posterior produce fragmentos más pequeños. La determinación de la secuencia de aminoácidos en cada uno de estos fragmentos ha permitido determinar que la cadena polipeptídica consiste de tres segmentos homólogos covalentemente unidos (unidades de homología), cada uno de los cuales contiene 350 residuos de aminoácidos con un 30% de identidad en secuencia (44-49).

La cadena polipeptídica contiene además cuatro sitios de unión para los oligosacáridos, tres de ellos se encuentran en el fragmento de 87 kDa y uno en el de 50 kDa, en segmentos de la secuencia que presentan el mayor grado de identidad. Los oligosacáridos de la Cp humana están compuestos únicamente de N-glicanos bi y triantennarios, y el segundo oligosacárido no se encuentra en la Cp Tipo II. En la Cp humana se determinó la presencia de 9 moles de ácido siálico, 18 moles de glucosamina (como derivados N-acetil), 36 hexosas (manosa y galactosa en proporción 2:1) y 2 moles de fucosa (2, 50). La Cp Tipo I comprende alrededor del 85% de la cantidad total de la Cp y contiene alrededor de 52 residuos de carbohidratos, mientras que la Tipo II posee únicamente 33 residuos (8, 15, 20, 23, 100). Además, se encuentran otros tres sitios con la secuencia aceptora Asn-X-Thr/Ser no glicosilados en regiones de estructura β , cercanos o en regiones hidrófobas. Se presentan además cinco puentes disulfuro y cuatro grupos sulfhidrilo libres (45).

La secuencia de aminoácidos y el modelo de la ceruloplasmina se presentan en la Figura 1 (44-45) en la cual se puede observar que alrededor de dos terceras partes de los aminoácidos muestran doble o triple identidad. La determinación de la estructura primaria de la Cp reafirma el hecho de que la proteína se sintetiza y secreta como una cadena polipeptídica única que sin embargo, sufre un proceso de autoproteólisis durante su purificación y posiblemente también *in vivo*. El rompimiento espontáneo de la Cp genera tres fragmentos predominantes por la existencia de dos sitios susceptibles, uno entre los fragmentos de 87 y 50 kDa y el otro entre el de 50 y 19 kDa. Estos sitios se presentan en las regiones de identidad de secuencia más que en los límites entre las regiones. La proteólisis limitada con tripsina *in vitro* corta el fragmento de 50 kDa en dos fragmentos de tamaño similar (25 y 26 kDa) pero de diferente secuencia; y el de 67 kDa se corta en un fragmento de 49 y otro de 18 kDa. Estos dos cortes coinciden con los límites de los segmentos de identidad.

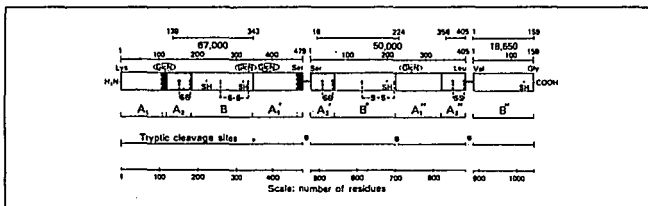
La información obtenida con estudios de dispersión de rayos X indica que la molécula de ceruloplasmina es una elipsoide con dimensiones de 6.5 X 6.5 X 13.0 nm (2, 8-9), que presenta tres dominios calorimétricos con una organización estructural similar al comparar las proteínas de tortuga, borrego y pollo (51). En cuanto a su estructura secundaria, se propone que la proteína presenta aproximadamente 30% de los residuos de aminoácidos en láminas β , 25% en 5 α hélices y 45% en estructuras al azar. Los residuos cargados predominan en tres sitios: el extremo amino, el extremo carboxilo, y las dos α hélices y la vuelta β en el segmento que va del Asp-34 a la Lys-51 (51).

FIGURA 1

Secuencia de aminoácidos de la CERULOPLASMINA humana.

KEKHYIYIGII ETTWDYASDH GEKKLISVDT EHSNIYLONG PDRIGRLYKK ALYLYQYDET
 FATTIEKPVV LGFLGPIIKA ETGDQVYVHL KNLASRPTFF HSHGITYYKE HEGAIYPDNT
 TDFQRADDKV YPGEQYTYML LATEEQSPGE GDGNCVTRII HSHIDAPKDI ASGLIGPLII
 CKKDSLDKEK EKHIDREFVV MFSVVDEFNS WYLEDNIKTY CSEPEKVDKD NEDFQESNRM
 YSVNGYTEFS LPGLSMCAED RVKWYLFMG NEVDVHAADF HGQALTNKNY RIDTINLFPA
 TLFDAYMVAQ NGEWMLSCQ NLNHLKAGLQ AFFQVQECNK SSSKDNIRGK HVRHYIAAE
 EIIWNYAPSG IDIFTKENLT APGSDSAVF EQGTRIGS YKLVYREYF DASFTNRKR
 GPEEHLGLL GPVIAEVDG TIRVTFHNKG AYPLSIIEPI VRFNKNNEG T YSPLNPNQS
 RSVPPSASHV APTEFTTYEW TVPKEVGP TH ADPVCLAKMY YSAVDPTKDI FTGLIGPMKI
 CKKGLSHANG RQKDVDFEY LFPTVDFENE SLLLEDNIRM FTTAPDQVDK EDEDFQESNK
 MHSMMNGFMYG NQPGLTCKG DSVVWYLFSA GNEADVHGII FSGNTYLWRG ERRDTANLFP
 QTSLLTHMWP DTEGTFNVEC LTTDHYTGGM KQKYTVNQR RQSEDSTFY L GERTYVIAAV
 EVEWDYSPQR EWEKELHHLQ EQNVSNAFLD KGEFYIGSKY KKVYVRYQYD STFRVPVERK
 AEEEHLGLG PQLHADVGDK VKIIFKMAT RPYSHAHGV QTESSTVTPT LPGETLTYVW
 KIPERSGAGT EDSACIPWAY YSTVDQVKLD YSGLIGPLIV CRRPYLKFVN PRRKLEFALL
 FLVDFENESW YLDNINIKYS DHPEKVNKDD EEPFESNKMH AINGRMFGNL QGLTMHVGD
 VNWYLMGMGN EIDLHTVHFH GHSFYKHRG VYSSDVFDF PGTYQTEMF PRTPGIWLLH
 CHVTDIHAG METTYTVLQN EDTKSG

Modelo estructural de la ceruloplasmina humana. Se muestran los tres fragmentos ($M_r = 67,000, 50,000$ Y $18,650$) en el orden propuesto así como la localización de los oligosacáridos (GlcN) así como de probables puentes disulfuro. Tomado de Takahashi (44-45).



D. CERULOPLASMINA EN OTRAS ESPECIES.

La mayoría de los estudios existentes se refieren a la ceruloplasmina humana, sin embargo, esta proteína se ha encontrado en muchas otras especies. Claramente la Cp de cerdo fue la primera muestra de esta proteína aislada por Holmberg y Laurell (4), y a partir de entonces se han descrito múltiples metodologías para la preparación de Cp de cerdo (34, 36, 52), vaca (53), rata (54), borrego (55-58), conejo (36) y caballo (36, 57) en el grupo de los mamíferos. Se ha aislado la Cp del suero de pollo (58-59) y ganso (60); y se tienen pruebas de la existencia de esta proteína en las tortugas (81) y en la rana toro (8). Asimismo existen evidencias de la presencia de esta proteína en el suero de elápidos y de salmónidos (8), de tal forma que resulta plausible concluir que la ceruloplasmina se encuentra presente en todos los vertebrados aún cuando pueden diferir su cantidad y propiedades enzimáticas.

La ceruloplasmina de tortuga (61) presenta una resistencia poco común a la proteólisis y al envejecimiento al compararla con la proteína de otras especies y grupos; sin embargo su actividad catalítica es también muy baja. Presenta un peso molecular cercano a 145,000 y un contenido total de cobre de 5.1 átomos por molécula.

La ceruloplasmina de pollo se presenta en concentraciones muy bajas en condiciones normales, sin embargo puede aumentar varias veces su concentración al inducir su síntesis en situaciones tales como la infección (58). La Cp de pollo es una cadena polipeptídica de peso molecular aparente de 124,000, y presenta una relación A_{610}/A_{280} de 0.07. Las hexosas, hexosaminas y ácido siálico representan el 7.2% del peso, y el ácido siálico es únicamente un tercio del que se presenta en la proteína humana; el cobre constituye el 0.20% lo que sugiere la presencia de 4 a 5 átomos por molécula. La composición de aminoácidos, muy parecida a la Cp humana, es más baja en metionina y tiro-sina y es inmunológicamente diferente (58-59).

La ceruloplasmina de ganso (60) comparte características con la proteína de pollo y con la humana. Tiene un peso molecular de 121,300, una relación A_{610}/A_{280} de 0.07; el cobre representa 0.32% lo que corresponde a 6 átomos de cobre por molécula y presenta un bajo contenido de tirosina, cisteína y aminoácidos ácidos. Los carbohidratos constituyen el 6.65% del peso y el contenido de ácido siálico es la mitad del de la Cp humana. Al igual que la proteína de pollo se presenta en baja concentración y posee actividad de superóxido dismutasa.

Las ceruloplasminas de cerdo (34,38,52), caballo (36,57), conejo (36), rata (54), vaca (53) y borrego (55-56), presentan características similares a las de la proteína humana aún cuando para cada especie estudiada se han encontrado algunas peculiaridades. El peso molecular varía alrededor de 124,000; el contenido de cobre equivale a 6 a 7 átomos por molécula, y la composición de aminoácidos presenta grandes homologías. Inmunológicamente, el suero de conejo anti Cp humana reacciona fuertemente con los sueros de venado, cabra, cerdo y perro de menos intensamente con los de rata y cobayo lo que implica que la Cp de todas estas especies presenta características estructurales comunes (30). Sin embargo, la comparación cinética de la actividad de ferroxidasa demostró que la Cp de rata es menos eficiente que sus contrapartes humana y de otros mamíferos (54), mientras que la Cp de ovino presenta una actividad enzimática específica mayor (55).

E. METABOLISMO DE LA CERULOPLASMINA

La ceruloplasmina representa más del 95% del cobre total en el plasma humano, y el 70% del cobre corporal total. En la rata, la Cp tiene una vida media de 13 h mientras que en el conejo es de 56 h y en el hombre de 2-3 días (2).

La ceruloplasmina es una proteína sintetizada en el hígado y los primeros estudios relacionados con su metabolismo se enfocaron principalmente a la determinación del papel de diferentes hormonas en su síntesis (62-64). Se detectó que la hipofisectomía, la adrenalectomía o la tiroidectomía provocan un incremento en el cobre hepático con el consecuente aumento en la Cp sérica; sin embargo, el estradiol induce la síntesis *de novo* independientemente del nivel de cobre hepático (65).

Otro tipo de estudios determinó que no existen diferencias estructurales entre la Cp del recién nacido y la del adulto, pero que los niveles de Cp del adulto se alcanzan hasta los seis meses de edad (66-67). Los cerdos recién nacidos no presentan Cp y su síntesis se inicia aproximadamente una semana después del nacimiento independientemente del nivel de cobre de la dieta (68), mientras que los estudios realizados en caballo (69) y rata han demostrado que la concentración de cobre y la actividad de la Cp se incrementan desde el momento del nacimiento hasta la 4a semana de vida. Durante el desarrollo fetal de la rata, la Cp se sintetiza predominantemente en los pulmones que son el principal sitio de síntesis extrahepática en este período, de tal manera que al nacimiento se encuentra el 60% de la Cp presente en el adulto (70-71, 176).

En cuanto a la síntesis de la ceruloplasmina se ha detectado que se lleva a cabo en ribosomas unidos a membrana, con un número de 16-18 monómeros por mRNA. Constituyen el 0.6% de los polisomas totales de hígado y el mensajero representa el 0.29% del RNA que contiene poliA; es decir se presentan entre 400 y 535 moléculas de mRNA de Cp por célula parenquimatosa del hígado (72). La Cp no sólo se produce en el hígado, sino también en otros tejidos tales como corazón, cerebro y riñón, siendo máxima la producción en el hígado que es además el único órgano que la secreta hacia la circulación (71). En el hepatocito, el cobre transportado en el sistema venoso-portal como complejo cobre-albúmina (154, 213), se incorpora a la Cp en su proceso de biosíntesis. La entrada del cobre a la molécula de Cp induce un cambio conformacional en una serie de eventos que ocurren en el retículo endoplásmico rugoso. Se ha propuesto que los niveles de cobre intracelular regulan la ingesta de cobre y los niveles del mRNA de Cp (74), sin embargo otros estudios demuestran que el contenido de cobre del hepatocito no tiene efecto en la expresión hepática del gen de la Cp ni en su biosíntesis. Asimismo, se propone que la incorporación del cobre a la proteína recién sintetizada no es el paso limitante en la biosíntesis o secreción de la proteína de hepatocitos de rata (212). Los oligosacáridos de la molécula parecen no tener papel en el mecanismo de incorporación de cobre a la molécula de Cp. Alrededor del 10% de la proteína circulante corresponde a la forma apoceruloplasmina que no presenta diferencias en su cinética de síntesis y secreción con la holoceruloplasmina (73), aún cuando no es claro si esta forma se secreta del hígado sin cobre o es el resultado del intercambio de cobre entre el plasma y los fluidos extracelulares (212).

La forma de transporte de la ceruloplasmina de regreso de la circulación hacia el hígado no se conoce con precisión, sin embargo una vez en el hígado la Cp se une a receptores de las células endoteliales (5.7×10^3 receptores/célula) con una constante de disociación de 1×10^{-7} M. Estas células, que se encuentran en el lado luminal, toman a la Cp por un mecanismo de endocitosis mediada por receptores; la molécula se mueve a través del endotelio en vesículas cubiertas por clatrina y se externalizan por el proceso de diacitosis, del lado abulminal del endotelio, en donde es reconocida por los hepatocitos. Este proceso de transporte transendotelial involucra la acidificación de la vesícula mediada por una bomba de protones ATP dependiente, la disociación del receptor y su reciclamiento y la remoción de los residuos de ácido silícico terminales de las cadenas de oligosacáridos para exponer a los residuos de galactosa (75-78).

Se han purificado los receptores del endotelio del hígado de rata que se describen como cadenas polipeptídicas únicas, sin puentes disulfuro externos que puedan ser removidos por β -mercaptoetanol, con un peso molecular aparente de 35,000, un 3% de carbohidratos y un punto isoeléctrico de 5.2. Dado el bajo peso molecular del receptor, y a la descripción de receptores para la Cp en eritrocitos con un peso molecular de 60,000, se ha postulado que esta cadena corresponde a un monómero de una molécula mayor capaz de funcionar como receptor en la célula intacta (79-80).

Por otro lado, en el hígado se postulaba la existencia de receptores para Cp únicamente en el endotelio, sin embargo, se ha descrito un proceso de unión específica de esta proteína en las células de Kupffer mediada por receptores que se suponen diferentes a los del endotelio (81). Otros tipos celulares tales como los eritrocitos, leucocitos, aorta y membranas del corazón también muestran la capacidad de interactuar específicamente con la Cp. Los receptores de las membranas de corazón y aorta de pollo presentan una Kd de 10^{-8} M, son más abundantes que en otros tejidos, saturables, reversibles, sensibles a tripsina e insensibles a neuraminidasa (82); existen 144 receptores por eritrocito humano con una Kd de 5×10^{-9} M y 294 receptores por eritrocito de conejo con una Kd de 4×10^{-9} M (80). La interacción de los eritrocitos humanos con la Cp depende de la concentración de calcio presente y se caracteriza porque no existe transporte de la proteína a través de la membrana (83).

F. EL COBRE EN LA CERULOPLASMINA

La ceruloplasmina, la lacasa y la ascorbato oxidasa constituyen el grupo de las oxidasas azules, que se caracteriza por la presencia de átomos de cobre en su molécula, y que catalizan la oxidación del sustrato con la transferencia simultánea de 4 electrones a una molécula de oxígeno (84-85). El con-

tenido de cobre en la Cp varía entre 0.27 y 0.32% lo que significa entre 6 y 7 átomos de cobre por molécula, presentando además, cobre unido laxamente que puede quelarse. Además se ha propuesto la existencia de múltiples sitios no sólo para la unión de más átomos de cobre sino también para Co (II), Ni (II) y Zn (II) (2, 8).

El espectro visible característico de la ceruloplasmina muestra una banda de absorción dominante a 610 nm, pero también se presentan bandas importantes alrededor de 330, 450 y 750 nm (2, 8).

El estudio de las características del cobre en la ceruloplasmina ha permitido establecer la presencia de tres tipos diferentes de cobre en esta proteína. El Tipo I se refiere a los iones de Cu (II) responsables del color azul de la proteína y presenta una banda de absorción cercana a 600 nm. Consiste de dos centros no equivalentes con potenciales redox (490 y 580 mV) y parámetros EPR (Resonancia Paramagnética del Electrón) diferentes. Cuando se reduce artificialmente a estos átomos de cobre, uno de los cobres se reoxida en presencia de O_2 , mientras que el otro requiere H_2O_2 para reoxidarse. El cobre Tipo II se conoce también como "Cu (II) no azul" debido a su baja absorción en la región visible del espectro, pero es detectable con la técnica de EPR. Este tipo de cobre cambia su simetría cuando se reduce el primer cobre Tipo I y se reduce posteriormente. La organización tridimensional teórica del sitio activo sugiere que los átomos de N del imidazol de los residuos de histidina son los ligandos del cobre Tipo II. Se encuentran en una relación Tipo I: Tipo II de 2:1, y representan el 44% del cobre de la ceruloplasmina. El cobre Tipo III se refiere a los átomos de cobre EPR inactivos responsables de una banda de absorción entre 310 y 350 nm, que forman sitios binucleares apareados antiferromagnéticamente. Se ha propuesto que para el funcionamiento de la Cp como oxidasa es muy importante el estado del cobre de estos dos últimos tipos, y que se presentan como un agregado trinuclear. Aún cuando todos los átomos de cobre no se encuentran contiguos en la molécula de la Cp, se propone que en el sitio catalítico se presentan los tres tipos para generar una cadena de transporte de electrones intramolecular en la cual los electrones van del cobre Tipo I al II y posteriormente al Tipo III (2, 9, 40, 85-90, 92-93).

Se ha encontrado un gran número de iones, particularmente aniones, que afectan la actividad de oxidasa de la ceruloplasmina. Los aniones inhibidores presentan la secuencia: $CN^- > N_3^- > OCN^- > SCN^- > SeCN^- > F^- > I^- > NO_3^- > Cl^- > Br^- > ClO_4^-$, tetraborato, borato, fosfato, sulfato, cacodilato). El análisis de los efectos de los inhibidores indican que la mayoría de los aniones interactúan con el sitio del cobre tipo II mientras que otros ejercen su acción con intermediarios enzimáticos. Las principales modificaciones detectables de la Cp son: cambios en el espectro de absorción, cambios en el EPR, decoloración de la proteína y pérdida de la actividad enzimática de oxidasa (94-99).

Por otra parte, se ha encontrado que parte del cobre unido a la ceruloplasmina puede removerse tratándola con Chelex sin pérdida de la absorción a 610 nm o de la actividad enzimática; mientras que algunos otros agentes tales como el EDTA, cianuro y el amortiguador de Tris, son capaces de extraer el cobre asociado fuertemente a la proteína (18, 40, 100-101). Sin embargo, la disociación total del cobre de la proteína y su reconstitución a Cp activa, reportada por primera vez por Scheinberg y Morell (102), y algunos otros estudios muestran resultados diferentes. Por una parte, la adición de cantidades de cobre menores a las requeridas para saturar a la proteína sin cobre, sugiere que la unión del cobre es un fenómeno de todo o nada (38, 92); mientras que otros resultados indican que puede formarse una molécula con el 50% del cobre bajo ciertas condiciones (18, 91). Así, la remoción del cobre genera la molécula de apoCp que difiere de la holoproteína en varios aspectos. Tiene un coeficiente de sedimentación menor, presenta algunos determinantes antigénicos nuevos y su estructura es más expandida (18, 38). En el suero humano la apoCp constituye entre el 10 y el 20% de la Cp total, y es más abundante en ratas con deficiencia de cobre y en pacientes con la enfermedad de Wilson (39, 103-104). Se ha propuesto que la apoceruloplasmina es el resultado de una diferencia entre la velocidad de síntesis de la cadena polipeptídica y la velocidad de incorporación del cobre a la molécula (38).

G. EL GEN DE LA CERULOPLASMINA

El gen de la ceruloplasmina se ha mapeado en la banda 3q 25 del cromosoma humano 3 en donde constituye un grupo génico junto con los genes que codifican para la transferrina, la pseudocolinesterasa-1 y la α_2 -HS glicoproteína. El gen codifica para una secuencia líder de 19 residuos de aminoácidos hidrófobos seguida por los dominios amino y carboxilo terminal. Se han obtenidos clones de cDNA que incluyen desde la secuencia del péptido líder hasta 114 nucleótidos antes del extremo carboxilo (105-108).

Se conoce un bajo nivel de polimorfismo genético de la ceruloplasmina en varias poblaciones humanas y las variantes se presentan con una frecuencia menor a la requerida por el análisis de frecuencia para su detección (>5%). En la población negra americana se han encontrado tres alelos, llamados CpA, CpC y CpNH además del alelo normal llamado CpB que se presenta con una frecuencia del 94%. En grupos de Europa, India y el Medio Oriente la frecuencia del alelo CpB es de alrededor del 99%, mientras que en algunas poblaciones Africanas el alelo CpA se presenta con una frecuencia del 10 al 15% (8).

En estudios de la expresión del gen de ceruloplasmina se detectó la presencia de dos clones diferentes con un patrón de expresión extra hepático diferente. Se propuso que el procesamiento diferente del RNA podría llevar a la producción de isoformas en los diversos tejidos, puesto que una secuencia de 12 nucleótidos presentes en el intrón adyacente contribuye con una secuencia para cuatro aminoácidos adicionales entre los residuos 1041 y 1042. Esta forma se presenta raramente en el plasma. Se han identificado también dos sitios aparentes de intercambio en la secuencia polipeptídica en las posiciones 79 y 449; ambas involucran un punto de intercambio de glicina y lisina (44-45, 109).

Por otra parte se ha encontrado un pseudogen procesado para la ceruloplasmina humana que contiene al DNA que corresponde a la secuencia del gen funcional y que codifica para los 563 aminoácidos del carboxilo terminal y la región 3' no traducida. No contiene a los intrones del gen funcional excepto por un intrón pequeño que marca el extremo 5' del pseudogen. Se localiza en el cromosoma 8 en la región 8q 21.13 - q 23.1. Presenta un 97% de identidad de secuencia con el gen silvestre lo que sugiere que la formación del pseudogen fue un evento evolutivo relativamente reciente que coincidió con la radiación de los mamíferos (100 millones de años). En cuanto a su origen se piensa que surgió como resultado de un transcrito aberrante que resultó de la iniciación dentro del gen ya que no se encuentran secuencias del pseudogen que correspondan al extremo 5' del gen silvestre o bien, que resultó de una especie de RNA que fue procesada por una transcriptasa reversa y luego fue insertada en el genoma (105, 110).

La comparación de la secuencia de nucleótidos del pseudogen con la del gen silvestre ha permitido detectar varias sustituciones de una base, una delección de 213 pb que corresponde al punto de unión de un intrón-exón y una duplicación de 4 pb que se presenta en el residuo 683 del gen silvestre y que resulta en un cambio del marco de lectura e introduce un codón de terminación prematura. El extremo 3' del pseudogen se caracteriza por un segmento de 62 pb compuesto principalmente por dinucleótidos TC repetidos. En el extremo 5' del pseudogen se encuentra una secuencia corta de nucleótidos que es homóloga a la de un intrón en el gen silvestre (110).

En la rata se han aislado clones de cDNA de ceruloplasmina que presentan una identidad de secuencia del 93% con la humana; y se ha reportado que el gen existe en una copia única en el genoma haploide (70-71, 115-118).

En cuanto a la expresión del gen de la ceruloplasmina en humano se ha detectado el mRNA de Cp en hígado, macrófagos, linfocitos T, saco vitelino, placenta, útero y testículos (107, 109). En el hígado, existen 2 especies de mRNA que sugieren que las ceruloplasminas de peso molecular de 200,000 y 135,000 son producto de diferentes mensajeros que codifican secuencias polipeptídicas comunes. El mRNA de Cp de 3800-3700 nucleótidos probablemente codifica a la Cp135, mientras

que el de 4400-4600 podría codificar a la proteína de 200,000 (43). En la rata, también se ha detectado un transcrito de 3700 nucleótidos en el hígado que se presenta desde el día 15 de gestación (71). En el útero se encontró en concentraciones de aproximadamente el 50% de las presentes en el hígado, mientras que en el saco vitelino y en la placenta los niveles de mensajero son muy bajos (115).

H. EVOLUCIÓN DE LA CERULOPLASMINA

La ceruloplasmina es una proteína perteneciente a la familia de proteínas con cobre en su molécula. Este grupo comprende proteínas que varían en tamaño desde 100 hasta más de 2,300 residuos en una sola cadena; contienen hasta 9 átomos de cobre en su molécula y realizan una amplia gama de funciones que incluye acarreadores de electrones y oxidasas y factores de coagulación sanguíneos. Así, en esta familia se encuentran las proteínas pequeñas que poseen un solo átomo de cobre tipo I (plastocianina y azurina); las oxidasas azules que se caracterizan por la presencia de los tres tipos de cobre (ceruloplasmina, ascorbato oxidasa, lacasa, superóxido dismutasa y citocromo oxidasa) y los factores de coagulación V y VIII (217). La evidencia de que la Cp consiste de tres dominios homólogos (111) y la comparación de la estructura primaria de las proteínas de cobre, ha permitido determinar que uno de los segmentos muestra alta identidad de secuencia en los sitios de unión del cobre independientemente del tipo de proteína (47).

La comparación de la estructura primaria de la lacasa aislada de *N. crassa* con la de las otras proteínas de cobre indica un alto grado de identidad de secuencia con el extremo carboxilo terminal de la Cp humana y en grado menor con las otras dos unidades de homología de la Cp y con la plastocianina y la azurina. Sin embargo, el arreglo quasimétrico de los dominios amino y carboxilo terminales sugiere la evolución por duplicación de un gen que codificaba un dominio proteico único de una proteína pequeña de cobre ancestral. La inserción de un tercer dominio como elemento genético pudo haber llevado a las oxidasas modernas y a la evolución de la Cp por triplicación (84,112). Sin embargo, Dwulet (47) propone que el gen primitivo de la Cp se formó por la fusión de dos genes que codificaban para proteínas de alrededor de 160 y 190 residuos de aminoácidos y que este precursor de 350 residuos se triplicó más tarde para formar el gen de la ceruloplasmina actual.

Por otro lado, los resultados de la comparación de la secuencia deducida del factor de coagulación VIII humano mostraron una identidad sorprendente entre esta proteína y la Cp, encontrándose repetida tres veces la secuencia semejante a ceruloplasmina (dominio A) en la región codificante del gen del factor VIII. Trabajando con el factor V de coagulación se encontró que la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera presenta una identidad del 40% con el fragmento carboxilo terminal del factor VIII. Asimismo se ha encontrado identidad de secuencia entre la Cp, el factor VIII porcino y el factor V bovino lo que permite postular que estos dos factores y la Cp constituyen una familia generada por la duplicación de un gen ancestral común correspondiente al dominio A, que ha sufrido un mínimo de 8 multiplicaciones y los segmentos generados han mutado independientemente para dar a las proteínas modernas de una familia cuyos genes se encuentran localizados cuando menos en dos cromosomas diferentes (44, 113-114).

I. FUNCIÓN DE LA CERULOPLASMINA

Con el descubrimiento de la ceruloplasmina en 1947 por Holmberg y Laurell se iniciaron los estudios acerca de las posibles funciones de esta proteína. En la actualidad, se ha reportado que esta proteína desempeña cuatro diferentes funciones: actividad de amino oxidasa; actividad de ferroxidasa; actividad de superóxido dismutasa y, transporte de cobre. Sin embargo, se desconoce si los sitios para los diferentes papeles se localizan en sitios diferentes a lo largo de la cadena polipeptídica o si es un solo sitio activo en la ceruloplasmina el que es capaz de tener diferentes actividades dependiendo del sustrato (45).

1. La ceruloplasmina como amino-oxidasas

Holmberg y Laurell (5,6) fueron los primeros en establecer las propiedades oxidativas de la Cp. Mostraron que la Cp puede catalizar la oxidación de una variedad de polifenoles, poliaminas aromáticas y otros sustratos reductantes; entre ellos, la p-fenilendiamina (PPD) mostró ser el mejor sustrato. En los primeros estudios de Young y Curzon se probaron 20 diferentes sustituciones de compuestos p-amino, algunos derivados de catecol y aminofenoles. Algunas de estas sustancias tales como la dopa (β -(3,4-dihidroxi-fenil)- α -alanina), adrenalina y serotonina son de importancia fisiológica, y la comparación de la cinética de todos estos compuestos ha permitido establecer que la K_m varía alrededor de seis ordenes de magnitud, mientras que la V_{max} varía únicamente en el rango de 1 a 10 e⁻⁷/Cu.min. Así, se propone que el paso limitante en la reacción es independiente de la naturaleza del sustrato, y que éste se une a la enzima a través de los electrones π del anillo. Al mismo tiempo se demostró que la Cp sigue la cinética de Michaelis-Menten y que todos los sustratos estudiados se caracterizan por una energía del orbital molecular ocupado más alto (EHOMO) excepcionalmente elevados lo cual permite proponer que la unión del sustrato a la enzima tiene lugar mediante la formación de un complejo de transferencia de carga. Estos datos sugieren que el valor de la K_m simplemente refleja la energía de ionización del sustrato y no tiene relación con la unión del sustrato a la enzima. La cinética indica también que la formación de un complejo enzima-sustrato no tiene relevancia en la reacción (117-121).

Utilizando específicamente como sustrato, no sólo de la ceruloplasmina sino también de sus fragmentos de 87,000 y 50,000, a la N,N-dimetil-1,4-fenilendiamina (DPD) se han realizado múltiples experimentos que nos indican que la actividad de la enzima se estimula en presencia de varios iones metálicos con el siguiente orden de efectividad: Fe(II) >> Co(II) > Mn(II) > Ni(II) > Mg(II) > Zn(II) \approx Cd(II). Los iones, mono o trivalentes, a excepción del Fe(III) que es reducido de nuevo a Fe(II), no presentan efectos de activación. Se ha determinado también que la oxidación del sustrato está mediada por la formación de un radical libre colorido estable, llamado rojo de Wunster, que presenta un máximo de absorción a 550 nm y cuya concentración se incrementa linealmente en el tiempo hasta alcanzar un máximo después del cual decrece hasta 0. En este proceso se proponen tres pasos: 1° la formación de un complejo de transferencia de carga entre el sustrato y el Cu²⁺ de la Cp, 2° el paso de un electrón del sustrato al cobre para la formación de un radical libre de color amarillo y 3° la transferencia de otro electrón al radical para generar un biradical que reacciona con más sustrato para dar el producto púrpura estable. Este paso de dismutación es de suma importancia en la reacción. Así, el poder catalítico de la Cp se debe principalmente al alto potencial redox del cobre Tipo-I aceptor de electrones y a la fuerte y específica interacción con el oxígeno (101, 122-128).

Por otra parte, los estudios acerca de la interacción que presenta la Cp con diversos compuestos demostró que los ácidos carboxílicos insaturados y aromáticos tienen un efecto inhibitorio; la inhibición por planuro es reversible y competitiva, mientras que la unión de una molécula de azida por molécula de Cp causa la inhibición completa de la enzima. Cambios de pH y temperatura así como la irradiación con UV de la Cp resultan en la pérdida de la banda de 810 nm, y en la agrogación de la proteína así como la pérdida de inmunoreactividad y alteraciones en la conformación de la proteína. Hoy en día sabemos que la actividad catalítica de la Cp puede ser inhibida por una amplia gama de compuestos que pueden agruparse en siete categorías que incluyen: aniones inorgánicos, carbonatos, compuestos con grupos -SH, agentes quelantes, hidrazinas, iones metálicos y 5-hidroxiindoles (84, 88-89, 129-131).

La Cp tiene también como sustratos dos tipos importantes de aminas biogénicas: la epinefrina y la serie de 5-hidroxiindol, y la serie de la fenotiazina (tranquilizantes). Barrass y Coult en una revisión han postulado que la Cp juega un importante papel en la regulación de la concentración relativa de noradrenalina y de 5-hidroxitriptamina (serotonina) en el suero y en el cerebro en donde estos compuestos actúan como neurotransmisores. Así, la Cp al regular la vida de estas aminas biogénicas regularía la química del cerebro necesaria para una función mental adecuada, y la interferencia con esta enzima llevaría a la aparición de estados mentales anormales. Se observaron también los efectos de múltiples drogas entre las cuales los alucinógenos aceleran la oxidación catalizada por Cp de

la noradrenalina pero inhiben la de 5-hidroxitriptamina. Propusieron también la posible participación de la Cp en la enfermedad de Parkinson, ya que el compuesto 3-hidroxi-4-metoxifenetil-amina es una de las toxinas que se acumulan en los Parkinsonianos ocasionando temblores e hipoquinesia. *In vitro* se ha mostrado que este compuesto incrementa la oxidación de la dopamina (3-hidroxi-tiramina) catalizada por la Cp, y ya que esta enfermedad se ha asociado a una disminución en los niveles de catecolaminas y un aumento en la Cp y en la serotonina, se ha postulado a la Cp como la base sistémica para la etiología de la enfermedad (9, 132-134).

Otro tipo de estudios ha determinado que la ceruloplasmina presenta actividad de ascorbato oxidasa; y que enzimas tales como la lisil oxidasa dependiente de cobre afecta la actividad de la Cp y la concentración de cobre (135-136). Sin embargo, puede decirse que las metodologías para la determinación de la actividad de la Cp no sólo utilizan como sustratos al PPD y al DPD, sino que en el tiempo, se ha ido incrementado la precisión de las técnicas con el uso de sustratos atóxicos tales como la o-dianilina y con la introducción de métodos inmunquímicos para tratar de determinar las alteraciones de la Cp en diferentes condiciones tanto normales como patológicas (137-140).

2. Actividad de ferroxidasa

En 1960, Curzon y O'Reilly reportaron por primera vez el hecho de que el hierro (II) es oxidado por la ceruloplasmina y que en su presencia se forma un sistema acoplado de oxidación que estimula a su vez la oxidación del DPD (141). La gran eficiencia de este proceso permitió postular a la Cp como una ferroxidasa es decir, el vínculo entre el metabolismo del cobre y el del hierro, hecho que se ha confirmado con múltiples experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* aún cuando hay que enfatizar que la Cp no representa el único componente molecular de cobre involucrado en el metabolismo y/o función de la célula roja.

Los estudios realizados han permitido calcular que la oxidación del Fe(II) catalizada por la Cp es de 10 a 100 veces más rápida que la oxidación no enzimática y que esta reacción presenta las características de activación por sustrato (101,142). Existen también datos que permiten usar la velocidad de captación del Fe(III) por la apotransferrina para determinar cuantitativamente la actividad de oxidasa de la Cp. Por otro lado, los estudios relacionados con la formación de transferrina férrica en el suero humano con y sin Cp a pH 7.4 a partir de Fe(II), indican que se generan más de 60 mg/día de Tf-Fe(III) en presencia de la Cp, cantidad suficiente para cubrir los requerimientos diarios de hierro (35-40mg) (9, 28, 143).

Los estudios de perfusión del hígado demostraron que en presencia de Cp existe movilización del hierro almacenado hacia el plasma. La velocidad de formación de transferrina-Fe(III) alcanza su máximo cuando la concentración de Cp es de un décimo de la cantidad presente en plasma, sin embargo, para observar defectos en la movilización del hierro los niveles de Cp deben ser extremadamente bajos (menos del 1%). Así, en estas condiciones, los niveles normales de Cp permitirían una velocidad de transporte de hierro de 5.2 mg/kg por día. Los estudios con cerdos mostraron que la administración de Cp a animales deficientes en cobre y con almacenes de hierro adecuados, induce un aumento en la concentración de hierro sérico. Esta movilización, sin embargo no se relaciona con la capacidad de unir hierro (TIBC) y en estas condiciones no se alcanza la saturación total de la transferrina a menos que exista una fuente adecuada de hierro movilizable. La asialo-ceruloplasmina, molécula que es rápidamente removida de la circulación, no presenta actividad de movilización de hierro. Finalmente hay que mencionar que tanto la Cp como la transferrina se incrementan durante la recuperación de hipoferrémia por síntesis *de novo*. Estos estudios en conjunto se han interpretado como una demostración directa del papel fisiológico de la Cp en circulación en el control del hierro sérico (144-153).

3. Actividad de superóxido dismutasa

El radical libre aniónico superóxido (O_2^-) es altamente reactivo y se origina de la reducción univalente del oxígeno. Las células y tejidos de los organismos están protegidos de los efectos nocivos de este radical por la superóxido dismutasa, enzima intracelular con cobre, que cataliza su transformación a H_2O_2 y O_2 . La Cp es capaz de transformar este radical, por lo que se le ha asignado el papel de "atrapador" circulante. Hoy en día sabemos que esta capacidad no es exclusiva de la Cp humana, ya que cuando menos en el ganso esta proteína presenta la actividad de superóxido dismutasa (154, 155, 80).

La ceruloplasmina, pero no la apoproteína, es un inhibidor muy efectivo de la peroxidación de lípidos y liposomas de fosfolípidos así como de la degradación del DNA. La autooxidación de lípidos inducida por ácido ascórbico, fierro inorgánico o catecolaminas se reduce en presencia de Cp. Este efecto decrece grandemente en condiciones de alta temperatura y es inhibido por cianuro. En lo que se refiere a la efectividad de la reacción, se ha encontrado que la relación $O_2^-:H_2O_2$ es cercana a 2:1 y son aparentemente los iones de cobre Tipo I los responsables del transporte de un electrón de la Cp hacia el radical en una reacción que es alrededor de 1,500 veces mas lenta que la catalizada por la Cu, Zn-superóxido dismutasa (SOD) (155-163, 165-166).

La Cp también presenta efecto protector en la lisis de eritrocitos estimulada por cobre o por fierro. La concentración fisiológica de Cp permite que los receptores específicos de la célula roja estén saturados, por lo que en presencia de cobre, la lisis de los eritrocitos se inhibe en un 78%. Este efecto se debe no sólo a la actividad "atrapadora" de radicales, sino también a la oxidación enzimática de los complejos formados (154, 164).

La función antioxidante de la ceruloplasmina es una hipótesis atractiva, ya que la generación de los productos de oxidación se asocia generalmente, con condiciones que incrementan los niveles de Cp en el plasma. La reactividad de fase aguda de esta proteína se asemeja al de otras α_2 -globulinas, y en condiciones de inflamación se puede asignar a la Cp dos papeles antioxidantes diferentes: 1° impide que el hierro liberado actúe como catalizador en la formación del superóxido y 2° inactiva directamente los radicales libres generados. Si estas actividades son de importancia fisiológica, uno no puede dejar de preguntarse por qué la Cp sigue siendo un catalizador tan poco eficiente a pesar de millones de años de evolución (8, 157, 167).

4. Transporte de cobre

Debido a que la ceruloplasmina representa más del 95% del cobre sérico, podría esperarse que fuera una fuente primaria de cobre para los tejidos extrahepáticos. Broman fue uno de los primeros en proponer que la Cp actúa como un sistema acarreador específico para transportar cobre del hígado a las células. Sin embargo, el medio de transporte de cobre en la sangre es la albúmina y complejos de albúmina-Cu(II)-histidina, Cu(II)-histidina y posiblemente complejos ternarios de cobre con otros aminoácidos, y no la Cp ya que no existe intercambio entre el cobre unido a Cp y el Cu iónico *in vivo*. Las primeras evidencias que permitieron asignar un papel de transporte de cobre a la Cp provienen de resultados de la distribución de ^{64}Cu en ratas; de la observación de que la Cp puede aceptar electrones de la cadena respiratoria, en particular del citocromo c, y del hecho de que la Cp puede donar el cobre requerido para la citocromo c oxidasa. También se ha observado la transferencia de cobre a la superóxido dismutasa. Finalmente, Hsieh y Freiden concluyen que la evidencia existente lleva a postular que la Cp tiene un papel fisiológico como forma de transporte que lleva cobre a las enzimas intracelulares, mientras que el complejo albúmina-cobre de la sangre está involucrado en el transporte del cobre absorbido en el intestino hacia el hígado (2, 9, 154, 168-170, 213).

Otros estudios muestran que la ceruloplasmina doblemente marcada es catabolizada al liberar Cu en las células, y que el cobre no permanece unido a los fragmentos catabolizados de la Cp. Así, el

mecanismo molecular del metabolismo de cobre, es desconocido, pero se ha propuesto que las metalotioneínas actúen como proteínas de almacén y/o transporte de cobre (2, 9, 171-172).

Ahora bien, el transporte de cobre por la Cp probablemente requiere de mecanismos de receptores específicos en los diferentes tejidos blanco. Se han propuesto varios mecanismos para explicar la incorporación del cobre de la Cp a enzimas de cobre o proteínas de cobre intracelulares. El primero, implica la reducción del Cu(II) de la Cp en el receptor de membrana, y subsiguientemente el Cu(I) es transferido a un aceptor intracelular X no identificado. La otra alternativa es que la Cp intacta sea internalizada a través de mecanismos de endocitosis, y el Cu(I) sea entonces liberado por proteólisis o por un mecanismo que recicle después a la proteína a la membrana plasmática para ser liberada (173-175).

J. VARIACIONES DE LA CERULOPLASMINA

La cantidad de ceruloplasmina presenta variaciones no sólo en situaciones patológicas, sino también debidas a cambios fisiológicos de las condiciones normales y en condiciones experimentales. En la Tabla 2 se presenta un resumen de factores que modifican los niveles de ceruloplasmina (1, 2).

TABLA 2

FACTORES QUE ALTERAN LOS NIVELES DE CERULOPLASMINA

FISIOLÓGICAS	EXPERIMENTALES
Enfermedad de Wilson	ACTH
Nefrosis	Cobre
Inflamación	Carragenina
Embarazo	Endotoxinas
Ejercicio físico	Epinefrina
Infecciones	Glucocorticoides
Anticonceptivos orales	Trementina
Esquizofrenia	Interleucina-1
Artritis reumatoide	Ácido retinoico
Neoplasias	
Leucemia	
Anemia aplásica	
CreCIMIENTO y desarrollo	

La Cp en adultos humanos normales presenta en el suero una concentración de 30-35 mg/100 ml independientemente del sexo, sin embargo, existe una gran variación interindividual (1). En la rata, los niveles de Cp encontrados son iguales a los del hombre, y se ha detectado que el parénquima hepático secreta $1.6 \mu\text{g Cp}/5 \times 10^5$ células/ 24 h (137). También se ha determinado la cantidad de Cp en otros líquidos corporales humanos en condiciones normales; se encontraron 2.8 mg/100 ml en líquido amniótico, 0.22 mg/100 ml en el líquido cerebro-espinal, 3.3 mg/100 ml en las lágrimas y 120 mg/100 ml de bilis (1).

La concentración de Cp se eleva por efecto de las infecciones agudas y crónicas debidas a una gran variedad de agentes virales, bacterianos y parasíticos; este incremento se bloquea parcialmente en presencia de cicloheximida, y se ha sugerido que inicialmente existe una liberación de la proteína sintetizada en las células hepáticas seguida de una fase de síntesis *de novo* (58, 153). Por otra parte, se ha postulado que la Cp forma parte de las proteínas reactantes de fase aguda, y como tal, se eleva cuando existe daño tisular, inflamación aguda localizada, y en enfermedades inflamatorias crónicas tales como la artritis reumatoide. La evidencia de una mayor cantidad de esta proteína en estas condiciones, se deriva del aumento en la actividad de oxidasa en el suero; sin embargo, el uso

Roeser (152) encontró incrementados el cobre sérico y la actividad de ferroxidasas de la Cp en pacientes con artritis reumatoide. Tanto en ratas jóvenes como viejas (176) se han detectado elevaciones similares en la inflamación inducida por trementina, así como por carragenina (178). Por otra parte, metales antagonistas del cobre (Cd y Ag), influyen diferentes sitios del metabolismo de la Cp con un resultado neto de estímulo de la actividad de la Cp (179). También el ácido 13-cis-retinoico tiene efectos en la reducción de la inflamación modificándose la Cp, efectos que parecen ser independientes de la vitamina A (182), mientras que el ácido ascórbico no afecta la cantidad de Cp pero sí su actividad de oxidasa (181, 183). En la actualidad, los efectos antiinflamatorios de la Cp se atribuyen a su función de "atrapadora" de radicales libres (187) y el aumento en la actividad de la Cp durante estos procesos será proporcionalmente inversa a la cantidad de cobre disponible (180).

Existen numerosos datos experimentales que muestran la regulación hormonal de la síntesis y secreción de la Cp. La epinefrina, el estradiol, la hidrocortisona, el glucagón y la ACTH incrementan los niveles de Cp, lo cual llevó a proponer que, cualquier cambio en la Cp relacionado con el stress involucra a los esteroides adrenales (58, 187, 177). Los niveles de Cp están elevados en el recién nacido humano (66) lo que podría relacionarse con cambios en los niveles de hormonas de crecimiento, ya que la hipofisectomía eleva el cobre hepático y la Cp (153). El ejercicio físico en humanos y en ratas también incrementa a la Cp sérica (184), y podría esperarse que la actividad física incrementara los niveles de epinefrina y la producción de interleucina-1. Esta última también ocasiona una elevación de los niveles de Cp a través de una combinación de señales hormonales o en conjunción con ellas (185-188).

Desde hace varios años se sabe que la Cp así como el cobre se incrementan durante el embarazo gradualmente hasta duplicarse a las 22 semanas, disminuyen y alcanzan nuevamente sus niveles máximos cerca del término. Teóricamente los niveles de Cp en el embarazo son función del estradiol, y se ha encontrado que la administración de algunos anticonceptivos orales semejan estos efectos. Otros estrógenos presentan la misma acción que el estradiol, pero la progesterona no sólo no es capaz de evocar aumento en la Cp sino que se ha reportado una ligera disminución en sus niveles después de usarse un progestágeno durante 8-9 meses. Los niveles normales de Cp se alcanzan 5 semanas después de discontinuarse su uso o bien 6 semanas después del parto. Sin embargo, la lactancia mantiene elevadas la actividad de oxidasa y de ceruloplasmina inmunoreactiva (1, 187).

En cuanto a las modificaciones en la cantidad de ceruloplasmina que se presentan en diversas patologías, no cabe duda que una de las más estudiadas es la enfermedad de Wilson o hepatolenticular en la cual existen depósitos de cobre en cerebro, hígado, riñón y cólea que resultan de una excreción biliar disminuida y una concentración muy baja de Cp sérica. En estos enfermos la apoceruloplasmina es más abundante, no presenta actividad de ferroxidasas, se une fácilmente a los eritrocitos pero protege menos de la hemólisis estimulada por cobre. El mRNA para Cp se encuentra en un 33% de los niveles normales en estos pacientes y se ha detectado que existe una disminución en la transcripción del gen de la Cp (1, 104, 183, 187-188).

En una gran variedad de neoplasias se han detectado elevaciones sustanciales de la Cp. Se desconoce si las células tumorales contribuyen a este aumento *in vivo* pero se ha detectado que algunas líneas embrionáricas son capaces de producir Cp (138, 189-191). Por otro lado, el líquido cerebroespinal de pacientes con leucemia linfocítica aguda presenta disminuido su contenido tanto de Cp como de transferrina, sin embargo, en el suero se encuentra elevada (192). El fluido del lavado broncoalveolar de pacientes con neumonía y con asma bronquial muestra un incremento en la Cp, sin embargo, éste se debe a un filtrado anormal de proteínas de la sangre más que a una síntesis local. En el caso del lavado de fumadores se detectó también un aumento en la Cp que podría estar funcionando como protectora contra los oxidantes del humo del cigarró y de los contaminantes del aire (193-194). En algunas enfermedades dermatológicas como la psoriasis también se ha detectado un aumento en la Cp y una disminución en la superóxido dismutasa de células polimorfonucleares (195). En ratas, se ha generado una cepa que presenta un bajo nivel de Cp, heredable en forma autosómica recesiva (196), y se cuenta con numerosos modelos experimentales que semejan patologías humanas y que permiten su estudio detallado. Entre éstos, cabe mencionar el modelo del sín-

drome nefrótico en el cual existe una disminución en la Cp sérica probablemente debida a la pérdida de proteína por orina (197).

En conclusión, podemos decir que la ceruloplasmina es una proteína con múltiples posibles funciones que sufre constantes modificaciones a consecuencia de alteraciones en las condiciones normales y por supuesto en respuesta a patologías que alteran el bienestar del individuo.

OBJETIVO

La ceruloplasmina es en la actualidad una proteína que a pesar de haber sido estudiada muy ampliamente y desde diversos puntos de vista, presenta todavía grandes incógnitas. Para poder realizar las investigaciones, se ha purificado de múltiples fuentes, sin embargo, la Cp de conejo ha resultado difícil de obtener (38). Por otra parte, la actividad de ferroxidasa de la Cp ha permitido postularla como el vínculo molecular entre el metabolismo del cobre y el del hierro.

En el laboratorio de Biología Molecular, se cuenta con un modelo experimental en conejos de inducción de anemia crónica por sangrado. Este sistema nos permite una aproximación a los fenómenos que ocurren en el proceso de eritropoyesis, tanto en sangre como en médula, así como en lo que se refiere a algunos parámetros séricos involucrados en el metabolismo del hierro (198-199). Asimismo, existe un estudio preliminar del laboratorio en el cual se determinó la actividad de oxidasa de la ceruloplasmina durante la anemia (200).

El objetivo de este trabajo es el purificar la ceruloplasmina de conejo y buscar la posible relación que existe entre esta proteína y los cambios que se presentan en el metabolismo del hierro en el sistema de anemia experimental por sangrado.

El primer paso consistirá en utilizar las metodologías de purificación de proteínas para obtener pura la Cp de conejo, con la cual se inducirán anticuerpos en cobayo. Esto nos permitirá contar con una técnica de cuantificación de la Cp independiente de la actividad de oxidasa que presenta en el suero. Para relacionar los metabolismos de cobre y hierro, se sangrará a los conejos para hacerlos anémicos y se determinarán tanto los parámetros hematológicos clásicos (RBC, Hemoglobina, Hematocrito, MCV), como factores séricos directamente relacionados con el hierro (transferrina y hierro sérico). Así, el uso de dos sistemas diferentes nos permitirá iniciar el estudio de la esquiua proteína azul del suero, la ceruloplasmina.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Purificación de la Ceruloplasmina

La Cp se purificó a partir de suero de conejo colectado en presencia de ácido ϵ -amino caproico 2 M para dar una concentración final de 0.02 M (24). El suero se mantuvo a -20°C hasta su utilización. Todo el proceso se realizó en frío y las soluciones se prepararon con agua desionizada la cual se obtuvo pasando agua destilada a través de un desmineralizador Coming LD 2A, alcanzando una pureza de 1 megohm/cm.

El primer paso consistió en el fraccionamiento del suero utilizando la precipitación con sulfato de amonio sólido (Merck de México) para llevar al suero a una saturación del 35% (p/v) que en ensayos previos demostró ser la adecuada para eliminar componentes séricos tales como las inmunoglobulinas sin perder una fracción considerable de la Cp. Se mantuvo el suero en un baño de hielo-agua y se agregó lentamente el sulfato de amonio manteniéndose en agitación durante 24 horas. Se centrifugó a 15,000 rpm durante 30 minutos a 4°C en un rotor de ángulo fijo (33° rotor 870) en una centrífuga refrigerada Damon/IEC modelo B2DA.

El precipitado se redisolvió en una solución de NaCl (Merck de México) 0.9% y se congeló para determinaciones posteriores. El sobrenadante se reprecipitó con sulfato de amonio sólido para llevarlo ahora a 60% (p/v) de saturación. Con este corte se logra concentrar la mayor cantidad de la Cp presente en el suero. La precipitación y centrifugación se llevaron a cabo en las condiciones ya descritas, recuperándose el precipitado que se redisolvió en un volumen aproximadamente 10 veces menor que el volumen inicial de suero, en el amortiguador de fosfatos de sodio (Merck de México) 0.05M en NaCl 0.1M pH 6.8 con ácido ϵ -amino caproico 0.02 M (Sigma) (amortiguador de purificación). El precipitado redisoluelto se transfirió a una bolsa de diálisis Spectrapor y se dializó exhaustivamente contra agua desionizada, y luego contra el amortiguador de purificación.

La muestra dializada se incubó con 3 g de DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia) previamente hinchada en el amortiguador de purificación, durante 4 horas con agitación lenta y manteniéndose en un baño de hielo-agua. La resina se dejó sedimentar y se decantó el sobrenadante. Se agregó más amortiguador a la resina, se agitó durante 10 minutos y se decantó el amortiguador, reemplazándose este lavado tres veces más. Después de la última lavada la resina a la cual se unieron diferentes proteínas, entre ellas la ceruloplasmina, se resuspendió en un volumen pequeño del amortiguador y se vació en una columna de cromatografía (Pharmacia) de 1.64 cm de diámetro y 30 cm de largo. La columna se lavó con un volumen de cama del amortiguador de purificación (aproximadamente 100 ml) con un flujo de 24 ml/h utilizando una bomba Micro Perpex (LKB).

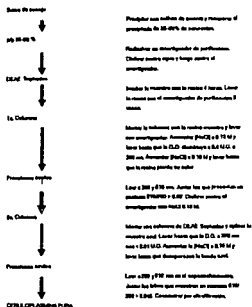
Para despegar las proteínas unidas a la resina se aumentó la concentración de NaCl del amortiguador a 0.13 M, manteniendo el mismo flujo y colectándose 4 ml/tubo en un colector de fracciones Fractomete 200 (Buchler) hasta pasar un volumen aproximado de 300 ml del amortiguador. Nuevamente se aumentó la concentración de NaCl ahora a 0.16 M y se mantuvieron las condiciones de operación hasta que el color azul de la resina desapareció.

Se determinó la absorbancia de los tubos colectados tanto a 280 como a 610 nm en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II. Se calculó la relación 810/280, y todos aquellos tubos que presentaron un cociente mayor a 0.02 se juntaron. Esta muestra se concentró por ultrafiltración con una membrana PM30 y 50 psi de presión de N_2 . Una vez que el volumen se redujo a 15 - 20 ml, se transfirió a una bolsa de diálisis y se dializó contra el amortiguador de purificación con una concentración de 0.13 M de NaCl.

Se montó nuevamente la columna de cromatografía con 3 g de DEAE-Sephadex A-50 hinchados en el amortiguador 0.13 M NaCl y se lavó con el mismo amortiguador con un flujo de 20 ml/h. Se aplicó la muestra y se siguió lavando con 150 ml aproximadamente del amortiguador. Se cambió la con-

centración de NaCl del amortiguador a 0.16 M y se siguió lavando en las mismas condiciones hasta que eluyó la banda azul que corresponde a la Cp. Los tubos se leyeron en el espectrofotómetro a 280 y 610 nm. Se calculó la relación 610/280 y aquellos con cociente de 0.045 se juntaron y se concentraron por ultrafiltración. En la figura 2 se muestra el diagrama de purificación.

FIGURA 2
DIAGRAMA DE PURIFICACION DE LA CP



En algunas ocasiones la Cp obtenida aparentemente no estaba totalmente pura por lo que fue necesario utilizar otra columna, en este caso de filtración molecular. Para ello, se hincharon 2 g de Sephadex G-150 en el amortiguador de purificación y se montó una columna de 1.64 cm de diámetro y 22.5 cm de altura lo cual nos dio un volumen de aproximadamente 50 ml. La columna se lavó con 2 volúmenes de cama del amortiguador con un flujo de 30 ml/h, y se aplicó la muestra directamente sobre la resina utilizando una jeringa con manguera de látex en la punta. Se lavó la columna y se colectaron 2 ml en cada tubo. Se leyó la absorbancia a 280 y 610 nm y se juntaron las fracciones con un cociente 610/280 de 0.045, que se concentraron por ultrafiltración.

El grado de pureza de la Cp obtenida se verificó por electroforesis en acrilamida con y sin SDS, así como por criterios espectrofotométricos y su actividad de oxidasa.

2. Determinación de la Concentración de Proteína

Entre los diversos métodos espectrofotométricos para la determinación de la concentración de proteína en una muestra, se encuentra el Microbiuret de Goa. Este método mide químicamente la concentración de enlaces peptídicos, formando un complejo azul cuya intensidad se determina en el espectrofotómetro, es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente. Este método permite determinar cantidades entre 0.1 y 4.0 mg/ml de proteína (201).

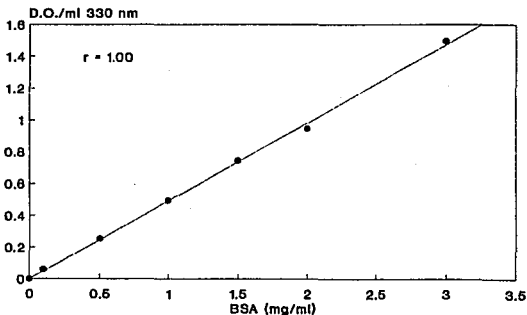
Se utilizó la solución de Biuret modificada por Benedict que se preparó disolviendo 173 g de citrato de sodio (Merck) y 100 g de carbonato de sodio en 500 ml de agua destilada. Se disolvieron 17.3 g de sulfato de cobre pentahidrato en 100 ml de agua y se añadieron a la primera solución, aforando a 1 l con agua destilada.

TABLA 3
CURVA PATRÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

Tubo	BSA (ml)	NaOH 3% (ml)	Concentración (mg/ml)
1	0.01	3.99	0.1
2	0.05	3.95	0.5
3	0.10	3.90	1.0
4	0.15	3.85	1.5
5	0.20	3.80	2.0
6	0.30	3.70	3.0

Se preparó un blanco con 4 ml de NaOH 3% y las muestras problema se prepararon agregando 2 ml de NaOH 6% a 2 ml de la solución proteica a determinar. Se agregó 0.2 ml del Biuret a todos los tubos, se agitaron y se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se leyeron los tubos a 330 nm contra un blanco de agua destilada y se sustrajo el valor del tubo blanco de reactivos de todas las lecturas. Se graficó la absorbancia de los tubos de la curva patrón contra la concentración de proteína, y es esta gráfica la que nos permitió determinar ya sea por interpolación o por métodos matemáticos calculando la ecuación de la recta, la cantidad de proteína presente en las muestras problema (figura 3).

FIGURA 3
DETERMINACION DE PROTEINA



Para las determinaciones se estableció una curva patrón con BSA a partir de una solución con una concentración de 10 mg/ml:

3. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (PAGE)

La electroforesis en geles de poliacrilamida se ha convertido en una herramienta muy importante para la separación e identificación de proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y glicoproteínas. La electroforesis en SDS ha sido muy utilizada desde que se publicaron los primeros hallazgos por Shapiro en 1967 y por Weber y Osborn en 1969. La utilidad de este método para la determinación del peso molecular de diferentes compuestos, depende de la capacidad del detergente dodecil sulfato de sodio para interactuar con y desnaturalizar una amplia gama de proteínas en forma similar. Las proteínas nativas con diferentes características de carga, tamaño y forma, se convierten en complejos de proteína-SDS que presentan una carga constante por unidad de masa y conformaciones idénticas que varían en tamaño directamente en relación con el peso molecular. En condiciones electroforéticas determinadas, i.e. pH, voltaje, tiempo y concentración del gel, los complejos SDS-proteína se mueven dependiendo de su tamaño ya que la densidad de carga y la forma son idénticas. Así, puede determinarse el peso molecular de una proteína al comparar su movilidad electroforética con la de marcadores de peso conocido, obteniéndose una relación lineal al graficar el logaritmo del peso molecular contra la movilidad relativa (201-203).

Para realizar la electroforesis de la proteína purificada se utilizó el sistema discontinuo de Laemmli tanto en placa como en disco, con SDS. La electroforesis se hizo en geles al 6 y 7% con acrilamida-bisacrilamida en una proporción de 30:0.8 en amortiguador tris-HCl 1.5 M pH 8.8, al cual se agregó SDS 10% p/v. Las muestras para estos geles con SDS se prepararon diluyendo la proteína 1:5 en tris-HCl 0.5 M pH 6.8 con SDS 10% y β -mercaptoetanol y se calentaron en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos. El amortiguador de electroforesis fue tris-glicina pH 8.3. En la electroforesis en placa se utilizó como marcadores de peso molecular a la albúmina de suero bovino (66,000 PM) y fosforilasa b (97,000 PM), mientras que en el caso de la electroforesis en disco se utilizaron los marcadores de peso molecular del estucho de Pharmacia que contiene tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalasa (232 kDa), deshidrogenasa láctica (140 kDa) y albúmina (67 kDa). Los geles se corrieron a 80 V hasta que la muestra entrara al gel y a 120 V hasta que el frente migrase a 1 cm del extremo del gel. Se tifaron con azul de Coomassie 0.25% ácido acético 9% en metanol durante 15 minutos y se dejaron destintando en ácido acético 7% metanol 5% en agua.

4. Inducción de Anticuerpos contra la Ceruloplasmina

El antisuero contra la Cp se obtuvo inmunizando a tres cobayos por vía intraperitoneal, con una emulsión que contenía 2.5 mg de la ceruloplasmina purificada diluida 1:2 con NaCl 0.9% (p/v) y un volumen igual de adyuvante completo de Freund (Difco). Este adyuvante consiste de 17 ml de aceite 17 Shell Ondina, 3 ml de Ariacel A y 8 mg de *Mycobacterium* seco; incrementa la antigenicidad de las sustancias al convertirlas a formas particuladas, influenciando por tanto la captación del antígeno por los fagocitos aumentando la persistencia del antígeno en el organismo. La emulsión se preparó en un homogenizador Polytron (Brinkman Instruments, Canadá). Se requiere de la emulsificación completa de la solución para que la emulsión se rompa lentamente y libere al antígeno durante un tiempo prolongado. Para probar si la emulsificación está completa, se deja caer una gota en agua; si está lista, el material forma una gota esférica.

Después de 21 días se inoculó una mezcla de 1.5 mg de Cp y adyuvante incompleto de Freund. Quince días después se inició el sangrado de los cobayos (10 ml/kg de peso) cada tercer día, para colectar la fracción de globulinas del suero. El título del anticuerpo se mantuvo inoculando con una periodicidad de 15 días, una emulsión de 1 mg de proteína en adyuvante incompleto de Freund.

Todo el material que se utilizó para este proceso se esterilizó para evitar la contaminación de los cobayos con organismos patógenos.

El título del anticuerpo presente en el suero se verificó por el método de Ouchterlony que es una técnica cualitativa bidimensional (201). En una placa de agar antígeno y anticuerpo se colocan en pozos separados. Conforme los reactantes difunden uno hacia el otro, se forma una línea de precipitación en el punto de equivalencia de cada sistema antígeno anticuerpo. Para ello se preparó una solución de agar al 3% p/v en PBS calentando hasta obtener una solución transúcida de la cual se pipetearon 4 ml en placas de plástico y se dejaron solidificar sobre una superficie nivelada. Una vez gelificado el agar se perforaron las placas con un pozo central y 5 pozos equidistantes distribuidos en forma de pentágono alrededor del centro, teniendo cuidado de que las distancias entre los pozos periféricos y el pozo central sea la misma. En el pozo central se aplicaron 5 µl de Cp purificada con una concentración de 0.5 mg/ml y en los pozos periféricos 5 µl de suero total de cuyo y diluciones desde 1:2 hasta 1:128. También se hizo otro tipo de placa perforando de igual manera pero en el pozo central se utilizó el suero inmune de cuyo mientras que en los pozos de alrededor se aplicaron diluciones de Cp de 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/ml.

Las placas se transfirieron una cámara húmeda durante 48 hrs y transcurrido este tiempo se lavaron exhaustivamente con PBS, se tiñeron con amido negro 0.1% en ácido acético 7% y se dejaron desliñando en ácido acético 7%. La posición de la línea de precipitación formada está en función de las concentraciones relativas de antígeno y anticuerpo además de otros factores tales como la especificidad del anticuerpo.

5. Purificación de los Anticuerpos contra la Coruloplasmina

La purificación de la fracción de globulinas del plasma de cuyo se realizó por precipitación con sulfato de amonio. Para ello se preparó una solución sobresaturada de sulfato de amonio, disolviendo 400 g de sulfato de amonio (Merck de México) en un volumen final de 500 ml de agua destilada a 70°C y ajustando el pH de la solución a 7.4 con hidróxido de amonio concentrado. El plasma de cuyo se diluyó 1:2 en amortiguador de fosfatos salino (PBS) pH 7.4 y se llevó a un 40% v/v de saturación que se calculó de la siguiente manera:

$$V = \frac{x (S_2 - S_1)}{1 - S_2}$$

donde

V = volumen a agregar

X = volumen de la muestra

S₂ = saturación final de sulfato de amonio expresado como fracción de 1

S₁ = saturación inicial

Se agregó el volumen de sulfato de amonio calculado y se dejó agitando en frío toda la noche. El precipitado se recuperó por centrifugación a 10,000 rpm durante 15 minutos a 0°C (DAMON-IEC B 20A) en un rotor de ángulo fijo; se redisolvió en PBS y se reprecipitó a una saturación de 35% v/v con la solución saturada de sulfato de amonio. Se repitió el proceso de colección del precipitado y saturación una vez más y el precipitado final se disolvió nuevamente en un volumen pequeño de PBS. Se preparó una bolsa de diálisis (Spectrapor) y se dializó contra varios cambios de PBS durante 24 h y luego exhaustivamente contra una solución de NaCl 0.85%. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 0°C para eliminar cualquier precipitado presente y se determinaron tanto su absorbancia a 280 nm como el título del anticuerpo por medio del método de Ouchterlony después de lo cual la solución se congeló a -20°C.

6. Inducción de la Anemia

Se utilizaron 5 conejos Nueva Zelanda de la misma edad (4-4.5 meses) y del mismo peso (3-3.5 kg), alimentados *ad libitum* con Conejina (Purina de México) suplementada con lechuga y zanahorias. Se sangró a los conejos cada 24 hrs por punción cardiaca durante 16 días removiéndose un volumen de 10 ml/kg peso. La sangre se colectó en jeringas de vidrio enjuagadas con una solución de NaCl 0.85% p/v y se tomó una alícuota de 2 ml que se transfirió a un tubo enjuagado con ácido etilenditriilo tetracético sal disódica (Titriplex III, Merck de México) al 20% p/v en NaCl 0.15 M pH 7.4 como anticoagulante. La sangre restante se transfirió a matraces de vidrio que contenían la cantidad necesaria de ácido α -amino caproico 2 M para dar una concentración final en la sangre de 0.02 M y perlas de vidrio. Se agitó hasta la formación del coágulo y se centrifugó en una centrífuga clínica (Clay Adams) a 2,000 rpm durante 30 minutos. Se separó el suero que se congeló a -20°C hasta su utilización.

Con la alícuota de sangre se determinaron el número de células rojas (RBC), volumen corpuscular medio de células rojas (MCV), número de células blancas (WBC), Hematocrito (Ht) y la concentración de hemoglobina (Hb) en un Coulter Counter modelo ZF y en un Hemoglobímetro (Coulter Electronics, Inc. Hialeah, Fla.). Con estos datos se calcularon la concentración media de hemoglobina (MCH) y la concentración corpuscular media de hemoglobina (MCHC).

7. Determinación de hierro sérico

La concentración de hierro en el suero de los conejos se determinó espectrofotométricamente, utilizando una modificación del método de Shade (204) preparado por Merck de México (Merckotest para hierro).

La técnica consiste en la remoción del hierro unido a proteínas siderófilas, principalmente el ligado por la transferrina, a través de un cambio brusco en el pH del suero por la adición de HCl 1N. Después se precipitan las proteínas séricas con ácido tricloroacético 20% con el objeto de eliminar cualquier interferencia por dispersión y se centrifuga para recuperar el sobrenadante en el cual se encuentra el hierro libre, que es entonces reducido con ascorbato de sodio. El hierro reducido se hace reaccionar con batofenantrolina a un pH de 5.5 aproximadamente, por lo cual se adiciona al sobrenadante acetato de sodio al 30% y se determina la absorbancia a 535 nm que corresponde al máximo de absorción del compuesto colorido. El cálculo de hierro se hace en función del cambio de coloración en el sobrenadante con respecto a la coloración de una solución patrón de hierro cuya concentración es de 1 μ g/ml de Fe.

Para la determinación de hierro se procedió primero a lavar el material de vidrio calentándolo en una solución de etirán al 10% v/v a 95°C durante una hora. En seguida se enjuagó con agua destilada y luego con agua desionizada, para evitar cualquier residuo de hierro. Las soluciones se prepararon empleando, en todos los casos, agua desionizada.

Para cada determinación se pipeteó 0.5 ml del suero y 0.5 ml de agua a los que se agregó 0.5 ml de HCl 1N agitando brevemente en un Vórtex. Se dejó reposar durante 45 minutos a temperatura ambiente y se agregó 0.5 ml de ácido tricloroacético 20%. Se mezcló y se centrifugó durante 30 minutos a 2500 rpm a 4°C para compactar el precipitado. Se pipeteó 1 ml del sobrenadante a un tubo limpio al que se agregó 0.5 ml de acetato de sodio 30% y aproximadamente 5 mg de ascorbato de sodio. Esta mezcla se agitó para disolver completamente el ascorbato, se añadió 0.5 ml del reactivo de coloración y se leyó la extinción de la mezcla a 535 nm en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II contra un blanco y un patrón preparados con el mismo procedimiento sustituyendo el suero por agua o la solución patrón de hierro respectivamente.

La concentración de hierro se expresa como μ g de Fe/ml de suero y se calcula a partir de la siguiente expresión:

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

8. Determinación de la Concentración de Transferrina en Suero

Utilizando los anticuerpos de borrego contra la transferrina de conejo, la técnica de Mancini permite obtener datos cuantitativos de la concentración de esta proteína en muestras de suero (205).

Para realizar estas determinaciones, se prepara una solución al 3% p/v de agar (Bacto-agar, Difco) en amortiguador de tris-barbituratos pH 8.6, $I = 0.02$ (LKB) y se deja fundir el agar a 70°C hasta obtener una solución translúcida. Esta última se incuba a 57°C durante 10 minutos en un baño de temperatura constante junto con una solución concentrada de anticuerpo antitransferrina en el mismo amortiguador para obtener una concentración final de 3 mg/ml una vez hecha la mezcla. Sobre una superficie nivelada, se vacían 4 ml de la solución en placas de plástico y se deja solidificar la mezcla agar-anticuerpo. En cada placa se perforan 10 pozos de 3 mm de diámetro aproximadamente, con una capacidad de 5 µl. Los restos de gel del pozo se retiran por succión, el interior se seca, y se aplican las muestras de suero a las que se va a determinar la concentración de transferrina. Las placas se transfieren a una cámara húmeda durante 24 horas, y transcurrido este tiempo se lavan con PBS. Se tifen con amido negro 10 B 0.5% en metanol-ácido acético glacial 9:1 durante 10 minutos. Se destiñen con ácido acético al 7% y se miden los halos de precipitación formados.

9. Cuantificación de la Actividad de Ceruloplasmina

La ceruloplasmina es capaz de oxidar algunos compuestos aminados, entre ellos a la parafenilendiamina, en una reacción que es un reflejo directo de su actividad de ferroxidasa. A través de una secuencia de reacciones oxidativas, la Cp convierte al DPD (N,N-dimetil-parafenilendiamina) en una base de Brandowskí, identificada por Rice como el último producto de oxidación y que presenta color rosa fácilmente detectable en el espectrofotómetro.

Curzon (141,206) utilizó esta característica como base para establecer un método de cuantificación de la actividad de Cp en el cual pueden usarse muestras de suero o bien, de Cp parcial o totalmente purificada. La Cp reacciona con el sustrato DPD en un amortiguador de acetatos 0.2M pH 5.5 en el que la reacción es óptima incubando 15 minutos a 37°C; ya que las condiciones son de exceso de sustrato, la aparición de producto oxidado es lineal en el tiempo hasta los 25 minutos y por tanto, con el tiempo de incubación usado, pueden observarse las diferencias debidas a la concentración de enzima presente. La reacción se detiene con una solución helada de azida de sodio 0.3 mM que es potente inhibidora de la Cp. Cuando se trabaja con suero o muestras poco puras de la proteína es conveniente agregar la azida en una solución de cloruro de sodio 10% (p/v) para evitar la aparición de turbidez en las muestras, y leer la absorbancia a 550nm rápidamente, ya que ésta decrece con el tiempo.

Es importante que el material utilizado esté libre de hierro, para lo cual se hirvió a 95°C durante 1 hora en Exdrán MA-03 exento de fosfatos (Merck de México) enjuagando después con agua desionizada.

Se hizo necesario modificar el método de Curzon sin embargo, ya que se sabe que es de suma importancia eliminar trazas de hierro que aumentan la reacción y conducen a resultados mas elevados que los reales en la actividad de Cp del suero (207,208). Para ello se tomó una de las modificaciones propuestas por Lovstad (209), que consiste en agregar un quelante específico para hierro, la or-tofenantrolina en una concentración 1 mM al amortiguador de acetatos que se utiliza para preparar la mezcla de incubación del método de Curzon. La adición del quelante debe hacerse al momento de utilizar la solución, ya que un agente oxidante, posiblemente H_2O_2 , se forma al almacenarla.

La mezcla de incubación se prepara de la siguiente forma:

1. 2 ml de amortiguador de acetatos 0.2 M pH 5.5 ortofenantrolina 1mM
2. 1 ml de agua desionizada
3. 1 ml de la dilución de suero 1:10 en cloruro de sodio 0.1 M
4. 1 ml de cloruro de N,N-dimetil parafenilendiamina (DPD) 1.7 mM

Se incuba 15 minutos a 37°C en un baño de temperatura constante (Grant Instruments, Ltd. England), tomando como tiempo cero el momento en el que se agrega el sustrato (DPD) a la mezcla de incubación. La reacción se para agregando 2 ml de azida de sodio 0.3 mM en NaCl 10% helada. Se lee la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II descontando a cada lectura la absorbancia de un tubo blanco que contiene todos los reactivos excepto el suero.

10. Determinación de la Concentración de Ceruloplasmina

Este parámetro fue calculado utilizando la técnica de inmunodifusión radial descrita por Mancini (205), que consiste en incluir una concentración constante de anticuerpo en una matriz de agar, en la cual se coloca el antígeno correspondiente lo cual permite llevar a cabo un análisis cuantitativo del mismo.

En este sistema se utilizó el anticuerpo anticерuloplasmina obtenido en cobayos a partir de la Cp de conejo purificada.

Para realizar la cuantificación, se prepara una solución al 3% p/v de agar (Bacto-agar, Difco) en amortiguador de tris-barbituratos pH 8.6, $I = 0.02$ (LKB) y se deja fundir el agar a 70°C hasta obtener una solución translúcida. Esta última se incuba a 57°C durante 10 minutos en un baño de temperatura constante junto con una solución concentrada de anticuerpo anti-Cp en el mismo amortiguador para obtener una concentración final de 2.5 mg/placa una vez hecha la mezcla. Sobre una superficie nivelada, se vacían 3.5 ml de la solución en placas de plástico y la mezcla agar-anticuerpo se deja solidificar. En cada placa se perforan 10 pozos de 3 mm de diámetro aproximadamente, con una capacidad de 5 μ l. Los restos de gel del pozo se retiran por succión, el interior se seca, y se aplican las muestras de suero a las que se va a determinar la concentración de Cp. Las placas se transfieren a una cámara húmeda durante 48 horas, y transcurrido este tiempo se lavan con NaCl 0.9% durante 24 horas haciéndose 3 cambios de la solución; se repite este proceso de lavado de las placas pero ahora con agua destilada para eliminar las sales. Se tiñen con amido negro 10 B 0.5% en metanol-ácido acético glacial 9:1 durante 10 minutos. Se destiñen con ácido acético al 7% y se miden los halos de precipitación formados.

Para poder calcular la concentración de Cp en el suero problema, se hizo una curva patrón con concentraciones conocidas de la proteína. A partir de una solución de Cp pura de conejo con una concentración de 8.5 mg/ml se hicieron diluciones desde 1 hasta 0.0625 mg/ml, ya que con estas cantidades se obtienen bandas de precipitación con el método de Ouchterlony y un comportamiento lineal al graficar la concentración de Cp contra el cuadrado del diámetro de los halos de precipitación.

11. Análisis Estadístico

Se hizo el análisis de varianza de una vía (ANOVA) utilizando el programa Statgraphics 2.1 seguidas de la prueba de Dunnett de una cola para comparaciones múltiples (210). Se considera una $p < 0.05$ como significativa. Las gráficas se presentan como la media de las determinaciones por duplicado de los 5 conejos \pm error estándar.

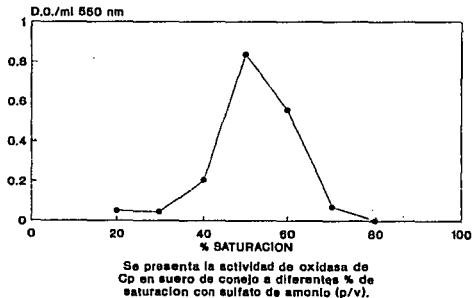
RESULTADOS

1. Purificación de la Ceruloplasmina

El proceso de purificación de la Cp se inició con la recolección de suero de conejo en presencia de ácido α -amino caproico 2 M para dar una concentración final en el suero de 0.02 M sin alterar significativamente el volumen. Este compuesto actúa como inhibidor de la plasmina, enzima presente en el suero, y que degrada a la Cp. El suero se mantuvo congelado a -20°C hasta el momento de su utilización.

En la literatura se encuentran numerosos reportes relacionados con la purificación de la Cp a partir de diversas fuentes, que utilizan diferentes compuestos tales como el etanol-cloroformo para precipitar a la Cp del suero; sin embargo en el presente trabajo se eligió al sulfato de amonio sólido para este fin. Así, el primer paso que se realizó, fue determinar el porcentaje de saturación óptimo que nos permitiera recobrar la mayor cantidad de la Cp del suero (medida como actividad de oxidasa) con el menor número de contaminantes. Se tomaron alícuotas de suero que fueron precipitadas a 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80% p/v de saturación y se determinó su actividad de oxidasa como se muestra en la figura 4. Con estos resultados se estableció el límite inferior de corte en 35% p/v de saturación y se probaron dos diferentes cortes en el límite superior: 55 y 60% p/v de saturación. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4. Con el corte 35-60 se recupera más de un 65% de la actividad de oxidasa en el precipitado por lo que se decidió utilizar este rango de saturación con el cual eliminamos la mayor parte de proteínas como transferrina y albúmina que quedan en el sobrenadante.

FIGURA 4
ACTIVIDAD DE OXIDASA DE LA CP



Asimismo, hubo que modificar las condiciones de la cromatografía que se encuentran reportadas para la purificación de la Cp. Por una parte existen autores que utilizan columnas de hidroxapatita, mientras que otros trabajan con resinas tales como el Sephadex; y por otra parte la variedad de

amortiguadores que utilizan en el proceso es muy grande. Así, primero hubo que determinar en qué tipo de amortiguador se podía unir la Cp a la resina elegida que fue el DEAE-Sephadex A-50, seleccionándose el amortiguador de fosfatos 0.05 M NaCl 0.1 M pH 6.8, al cual se agregó ácido α -amino caproico en una concentración final de 0.02 M. Por otro lado, existen dos métodos para montar las columnas de cromatografía; el primero consiste en cargar la columna con la resina previamente hinchada en el amortiguador de trabajo y aplicar la muestra que se desea separar directamente sobre la resina. El segundo aprovecha las características del amortiguador al incubarse la resina con la muestra antes de montar la columna. De esta manera, las proteínas con punto isoeléctrico mayor al pH del amortiguador no se unen a la resina permitiéndose así la eliminación de proteínas contaminantes aún antes de montar la columna. Después de probar los dos métodos se decidió trabajar con el segundo ya que nos permite eliminar contaminantes tales como transferrina, hemopexina y albúmina de la muestra, disminuyendo el tiempo de trabajo, factor muy importante dada la inestabilidad de la ceruloplasmina.

TABLA 4

RECUPERACIÓN DE CERULOPLASMINA EN FUNCIÓN DEL PORCENTAJE DE SATURACIÓN CON SULFATO DE AMONIO UTILIZADO

Muestra	Ceruloplasmina* (mg)	Recuperación (%)
Suero	89.57	100
p/p 0-35	6.85	7.65
s/n 0-35	80.63	90.02
p/p 35-55	39.79	44.42
s/n 35-55	43.64	48.72
Suero	137.48	100
p/p 0-35	6.15	4.47
s/n 0-35	112.4	81.76
p/p 35-60	89.87	65.37
s/n 35-60	25.35	18.43

* Cantidad de Cp total de la muestra calculada en función de su actividad de oxidasa.

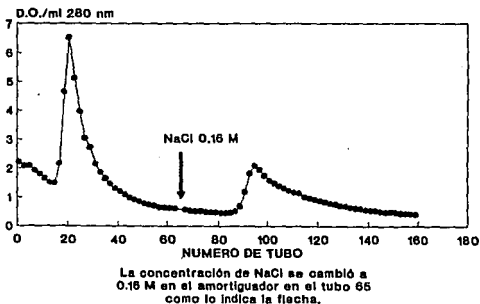
También tuvo que determinarse la concentración de NaCl requerida para despegar a la Cp de la resina. Inicialmente se trabajó con un gradiente de NaCl de 0.1 a 0.5 M, que luego se redujo de 0.1 a 0.3 M. La reproducibilidad de los resultados nos llevó a buscar dos concentraciones de NaCl que permitieran despegar diferencialmente proteínas contaminantes y a la Cp. Se encontró que a 0.13 M de NaCl se separa parte importante de la proteína contaminante mientras que la Cp queda unida aún a la resina. La segunda concentración que se probó, fue de 0.2 M de NaCl, concentración que no sólo despegó a la Cp, sino también la mayoría de las proteínas que aún quedaban en la columna. Así, se bajó la concentración a 0.18 M y finalmente a 0.16 M de NaCl lo que permitió despegar a la Cp de resina sin desprender la mayoría de las proteínas contaminantes presentes.

Una vez que se establecieron las condiciones óptimas con las cuales se trabajaría, se partió de un volumen promedio de suero de 500 ml que se había mantenido congelado a -20°C . Se agregó la cantidad necesaria de sulfato de amonio para llevar al suero a una saturación de 35% p/v cuidando de mantener el suero en un baño de hielo-agua con agitación constante. Una vez disuelto el sulfato de amonio se mantuvo durante 24 horas a 2°C con agitación. Se centrifugó 30 minutos a 15,000 rpm a 2°C y el precipitado (p/p 0-35%) se redisolvió en NaCl 0.9% y se congeló, mientras que el sobrenadante (s/n 0-35%) se precipitó con sulfato de amonio ahora a 60% p/v de saturación. Al igual que en el paso anterior, el sulfato se agregó manteniendo fría la solución y se dejó en agitación 24 horas. De esta muestra se recuperó el precipitado (p/p 35-60%) por centrifugación 30 min a 15,000 rpm a 2°C , y se redisolvió en un volumen pequeño del amortiguador de fosfatos de sodio 0.05 M

NaCl 0.1 M pH 6.8 (amortiguador de purificación) que contiene 0.02 M de ácido ϵ -amino caproico. Se pasó a una bolsa de diálisis y se dializó exhaustivamente contra varios cambios de agua destilada durante 24 horas y por último contra el amortiguador de purificación. Se sacó de la bolsa de diálisis y se midió el volumen guardando una alícuota.

El p/p 35-80% se incubó con 3 g de DEAE-Sephadex A-50 previamente hinchados en el amortiguador de purificación. Se agitó lentamente durante 2 horas manteniendo el vaso en un baño de hielo-agua y la resina se dejó sedimentar. Se decantó el sobrenadante que presentó un color naranja turbio, y se agregó nuevamente amortiguador para lavar la resina de las proteínas que no estaban unidas. Se agitó durante 10 minutos, se dejó sedimentar y se recuperó un sobrenadante de color blanco. Se repitió el lavado otras dos veces hasta obtener un sobrenadante claro. Esta resina con la proteína unida muestra un color azul-grisáceo y se utilizó para llenar una columna de cromatografía LKB de 1.64 cm de diámetro. Se lavó inicialmente con un volumen de 75 ml amortiguador de purificación con un flujo de 24 ml/hora. Este volumen es equivalente al volumen de la resina empacada en la columna y una vez lavada se llevó la concentración de NaCl en el amortiguador de purificación a 0.13 M manteniendo el mismo flujo. Se colectaron fracciones de 4 ml que se leyeron en el espectrofotómetro a 280 nm. Una vez que la absorbancia disminuyó a 0.4 U.O./ml (aproximadamente 60 tubos), se aumentó nuevamente la concentración de NaCl del amortiguador a 0.16 M y la columna se lavó hasta que la resina quedara nuevamente sin color. Estas fracciones se leyeron no sólo a una longitud de onda de 280 nm, sino también a 610 nm, lo que nos permite detectar el color azul de las muestras debido a la presencia de Cp. En la figura 5 se muestra el perfil cromatográfico de esta primera columna.

FIGURA 5
CROMATOGRAMA DE LA 1a COLUMNA



Se calculó la relación 610/280 de las fracciones obtenidas, y aquellas que presentaron un cociente mayor a 0.02 se juntaron. Se midió el volumen y se dializó contra el amortiguador pero ahora con una concentración de NaCl de 0.13 M. Después de dializar contra varios cambios del amortiguador, la muestra se sacó de la bolsa de diálisis y se midió nuevamente el volumen.

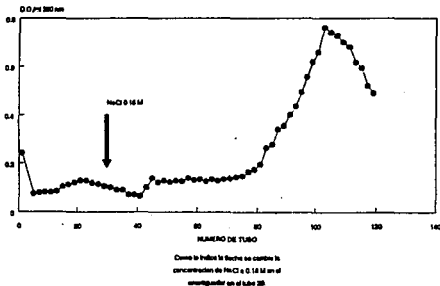
Se montó nuevamente la columna de cromatografía llenándose ahora con 3 g de DEAE-Sephadex en amortiguador con NaCl 0.13 M y se lavó con un volumen de aproximadamente 150 ml con un flujo de 20 ml/hora. Se aplicó la muestra dializada observándose la formación de una banda de color azul intenso en la parte superior de la columna. Una vez que entró toda la proteína a la resina, se lavó con el mismo amortiguador colectando fracciones de 4 ml hasta que la absorbancia a 280 nm disminuyó a 0.1 U.O./ml (aproximadamente 35 tubos). Nuevamente se cambió la concentración de NaCl del amortiguador a 0.16 M, manteniendo iguales las condiciones de operación de la columna. Con esto se pudo observar la migración de la banda azul hacia el extremo inferior de la columna hasta ser eluida en los tubos que se leyeron en el espectrofotómetro a 280 y 610 nm. En la figura 6 se muestra el perfil de esta segunda cromatografía. Las fracciones que presentaron una relación 610/280 de 0.045 se juntaron y concentraron por ultrafiltración utilizando una membrana PM-30, a un volumen menor de 5 ml. Esta muestra se centrifugó, y se leyó nuevamente a 280 y 610 nm, encontrando los siguientes resultados:

610 nm = 0.603 U.O./ml y 280 nm = 12.68 U.O./ml por tanto:

610/280 = 0.0475 y 280/610 = 21.03

que corresponden a los cocientes que se obtienen para la proteína humana pura.

FIGURA 6
CROMATOGRAMA DE LA 2a COLUMNA



Se sabe que para la Cp humana los coeficientes de extinción son $E_{610}^{1\%} = 0.68$ y $E_{280}^{1\%} = 14.9$. Estos datos se utilizaron para calcular la cantidad de Cp presente en la muestra purificada. Así, la lectura a 610 nm corresponde a una concentración de 8.87 mg/ml y a 280 nm a 8.51 mg/ml; resultados que corroboran la presencia de la Cp pura en la muestra.

Pocos autores en la literatura hacen referencia a la absorbancia a 330 nm de la Cp que está relacionada con el cobre tipo 3 no detectable por EPR. La Cp de conejo purificada en este trabajo presentó una absorbancia a 330 nm = 0.645 U.O./ml.

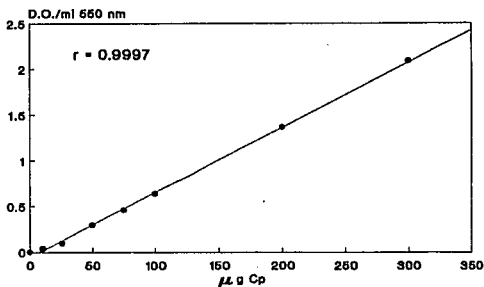
Por otro lado, con la Cp purificada se hizo una curva de actividad ya que se encuentra reportado en la literatura que para la proteína humana la actividad medida por oxidación del DPD es lineal hasta $E_{1cm} = 0.5$. La Cp purificada se diluyó con NaCl 0.9% a una concentración de 1 mg/ml y se determinó la actividad de oxidasa en muestras que se prepararon a partir de esta solución y que contenían 10, 25, 50, 75, 100, 200 y 300 μ g. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7. Si utilizamos el dato reportado de que 1 mg de Cp = 63.0 unidades de actividad y 1 unidad de actividad = 0.1 unidades de absorbancia a 550 nm, se puede calcular la cantidad de Cp en la muestra (Tabla 5).

TABLA 5

ACTIVIDAD DE OXIDASA DE LA CERULOPLASMINA PURIFICADA

Absorbancia a 550 nm (U.O./ml)	Cantidad calculada (μ g)	Cantidad agregada (μ g)
0.04	6.3	10
0.1545	24.5	25
0.2975	47.2	50
0.46	73.0	75
0.638	101.3	100
1.365	216.7	200
2.089	331.6	300

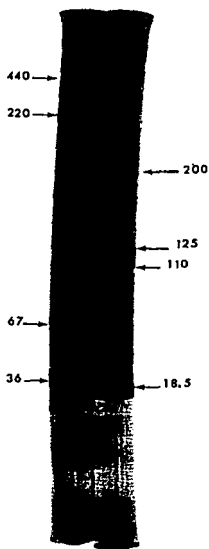
FIGURA 7
ACTIVIDAD DE OXIDASA DE LA CP



Asimismo, la muestra de Cp se sometió a electroforesis en disco con SDS en geles al 6% usando el estuche de marcadores de peso molecular (Pharmacia) (figura 8). En esta electroforesis se pueden observar varias bandas: una de alto peso molecular cercana a 200,000 daltones; una banda principal de 125,000 daltones que corresponde a la Cp y dos bandas con pesos de 110,000 y 18,500 daltones respectivamente. Estas dos últimas corresponden a la Cp que se ha fragmentado durante el procedimiento de purificación. Sin embargo la banda de alto peso molecular presente nos hizo pensar en la presencia de algún contaminante por lo que se pasó nuevamente la muestra por una co-

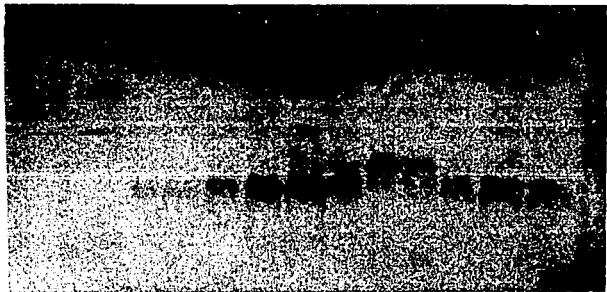
lumna de exclusión molecular. Esta última cromatografía nos permitió eliminar el componente de 200 kDa que representa aproximadamente el 8.2% de la muestra. Las fracciones azules colectadas se leyeron en el espectrofotómetro a 280 y 610 nm y se juntaron los tubos que presentaron cocientes de 610/280 y 280/610 \geq 0.045 y 22.0 respectivamente. Se hizo electroforesis en placa con SDS en geles al 7% usando como marcadores de peso molecular albúmina de suero bovino (66,000 daltones) y fosforilasa b (97,000 daltones) y el resultado se muestra en la figura 9. En esta electroforesis se pueden observar dos bandas, una de 110,000 y otra de 18,500 daltones que corresponden a la Cp en la cual se ha hidrolizado un enlace peptídico como resultado del procedimiento de cromatografía, mientras que la banda de alto peso molecular ya no se presenta. Así, podemos concluir que el resultado de la purificación es una muestra de Cp que por criterios espectrofotométricos, por cantidad de proteína, por actividad de oxidasa y por electroforesis se encuentra pura. Aún cuando en relación a la cantidad de proteína presente en el suero, la Cp representa únicamente el 0.12% recuperado, en cuanto a la cantidad de Cp del suero, calculada en función de su actividad de oxidasa, se tuvo una recuperación del 20.25% (Tabla 6).

Figura 8



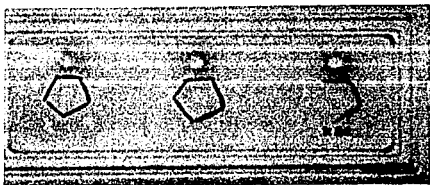
El gel de la izquierda muestra marcadores de peso molecular, el de la derecha señala la presencia de Cp nativa de 125 y 200 kDa y fragmentos de la molécula con 110 y 18.5

Figura 9



Se muestra en los dos primeros carriles marcadores de peso molecular, en los restantes aparecen los fragmentos de la molécula de Cp.

Figura 10



Placa de Ouchterlony con el antisuero anti-Cp a diferentes concentraciones.

TABLA 6

RECUPERACION DE CERULOPLASMINA DEL PROCESO DE PURIFICACION

	SUERO TOTAL	P/P 0-35	S/N 0-35	P/P 35-60	S/N 35-60	CERULOPLASMINA
D.O/ml 280 nm	56.3	147.2	40-58	88.4	23.7	12.68
PROTEINA (mg/ml)	43.08	61.96	31.22	55.46	21.06	8.51
VOLUMEN (ml)	540	67	550	70	540	3.2
PROTEINA TOTAL (mg/ml)	23,263	4,151	17,171	3,982	11,372	27.23
CERULOPLASMINA (mg/ml)	0.252	0.078	0.221	0.994	0.058	8.61
RECUPERACION DE PROTEINA(%)	100	17.84	73.81	16.67	48.88	0.12
RECUPERACION DE CERULOPLASMINA (%)	100	3.04	89.32	51.13	23.01	20.25

* Calculada en función de su actividad de oxidasa

2. Obtención de Anticuerpos contra la Ceruloplasmina

Para la obtención de los anticuerpos contra la Cp de conejo se trabajó con cobayos. Se hizo un primer intento para obtener el antisuero inyectando la proteína purificada, sin embargo no se obtuvieron resultados debido a que la proteína fue inyectada en adyuvante incompleto de Freund desde la primera inmunización. Con estos resultados, se hizo patente la necesidad de utilizar el adyuvante completo en esta primera inyección por lo que se inició nuevamente el protocolo de inmunización usando cobayos diferentes que no habían sido inmunizados con anterioridad.

Se preparó la primera inyección usando 2.5 mg de Cp disuelta en NaCl 0.9% y un volumen igual del adyuvante completo de Freund cuidando que todo el material empleado y la solución salina estuvieran estériles. Se inoculó a cada cobayo intraperitonealmente repartiendo la dosis en cuatro sitios. A los 21 días se puso un primer refuerzo con 1.5 mg de Cp en adyuvante incompleto de Freund y 15 días después de tomó una muestra de sangre para obtener el suero y determinar la existencia de anticuerpos anti-ceruloplasmina con el método de Duchterlony.

Se prepararon placas de plástico con 4 ml de bacto-agar al 3% en PBS, se dejaron solidificar y luego se perforaron con un horador de 2 mm de diámetro distribuyendo los pozos en forma de pentágono equidistantes al pozo central. Se prepararon diluciones del antisuero de cobayo de 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 y se pusieron 5 µl de estas diluciones y el mismo volumen del suero sin diluir en los diferentes pozos. En el centro se agregaron 5 µl de Cp con una concentración de 0.5 mg/ml. Paralelamente se hicieron placas de agar que contenían en el pozo central 5 µl del antisuero y en los pozos exteriores el mismo volumen de diluciones de Cp cuya concentración fue de 2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/ml. Se dejaron correr durante 48 horas en cámara húmeda y a temperatura ambiente y los resultados se muestran en la figura 10. Puesto que se encontró en estas placas la formación de líneas de precipitación a todas las concentraciones usadas, se decidió iniciar la recolección del suero inmune de cuyo. Para ello, se sangró cada tercer día a los animales un volumen de 10 ml/kg de peso, manteniendo activa la formación de anticuerpos mediante la inyección de 1 mg de Cp en adyuvante incompleto de Freund cada quince días.

El suero inmune de cobayos se juntó y se utilizó para purificar la fracción de inmunoglobulinas. Se partió de un volumen de 53 ml que se diluyó 1:2 con PBS y se precipitó a 40% v/v de saturación con una solución saturada de sulfato de amonio; con la fórmula se calculó el volumen necesario y estos 71 ml se agregaron lentamente al suero manteniéndole en un baño de hielo-agua. Se dejó agitando

toda la noche a 2°C y se centrifugó a 10,000 rpm 15 minutos a 2°C. El sobrenadante se descartó y el precipitado se redisolvió en PBS para dar un volumen de 50 ml, que fueron precipitados nuevamente a 35% v/v de saturación con la solución saturada de sulfato de amonio. Se agitó durante 24 horas en frío y se recuperó el precipitado por centrifugación, que nuevamente se redisolvió en 50 ml de PBS y se reprecipitó a 35% v/v de saturación. Se recuperó el precipitado por centrifugación y se redisolvió en un volumen final de 25 ml que se pasaron a una bolsa de diálisis. Se dializó contra varios cambios de PBS durante 24 horas y posteriormente contra NaCl 0.9% otras 24 horas. Se sacó de la bolsa de diálisis y se centrifugó durante 15 minutos a 12,000 rpm a 2°C. Con las inmunoglobulinas purificadas nuevamente se hicieron placas de Ouchterlony con diluciones de suero que van desde 1:2 hasta 1:128. Se obtuvieron líneas de precipitación para el suero total, y las diluciones de 1:2 a 1:64; esta última la consideramos como el título del anticuerpo obtenido.

Se determinó la absorbancia a 280 nm de las inmunoglobulinas obtenidas que fue de 27.03 U.O./ml. Si consideramos que a esta longitud de onda 1 mg/ml absorbe 1.5 U.O., la cantidad de proteína que tenemos es de 18.02 mg/ml, concentración que fue corroborada con la determinación de proteína presente por el método de Microbiuret de Goa. Con este último método se obtuvo una lectura que corresponde a 18.46 mg/ml.

3. Anemia Experimental

Para incluir la anemia se sangró diariamente por vía intracardiaca, 10 ml/kg de peso corporal durante 16 días a 5 conejos Nueva Zelanda. Se midieron diariamente los valores hematológicos y consideramos el primer día de sangrado como día 0 y a los valores hematológicos de este día como los parámetros normales de los conejos. En la figura 11 se muestran los cambios en el número de células rojas (RBC), cantidad de hemoglobina (Hb) y Hematocrito (Htc) a lo largo del estudio. Tomando como base esta figura puede dividirse al proceso en varias etapas: fase aguda que comprende del día 1 al 5 en la cual los parámetros considerados alcanzan sus valores más bajos; fase de recuperación que va del 6° al 10° día de sangrado y que se caracteriza por el aumento en los valores hematológicos y; finalmente, fase de equilibrio, del día 11 al 15, en los cuales el número de células y la hemoglobina producidas diariamente igualan a la cantidad removida por lo cual no se observan cambios significativos en los valores de estos parámetros.

La fase de equilibrio de la anemia nos permite calcular tanto la producción diaria de células rojas como la de hemoglobina. Los valores obtenidos son de 2.55×10^{10} células/kg de peso y 0.85 g de hemoglobina/kg. Asimismo, se calculó que se requieren 9.6 mg de hierro (3.35 mg Fe/g Hb) (214) para sintetizar la hemoglobina que produce diariamente cada conejo.

Se midió además el volumen corpuscular medio (MCV) y se calcularon la hemoglobina corpuscular media (MCH) y la concentración corpuscular media de hemoglobina (MCHC) como se muestra en la figura 12. Los cambios observados en estos parámetros nos indican que las células tienden a presentar un mayor tamaño con una mayor cantidad de hemoglobina por célula por lo cual se puede incluir a esta anemia experimental entre las anemias macrocíticas.

FIGURA 11

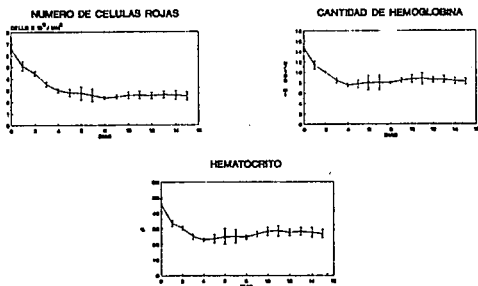
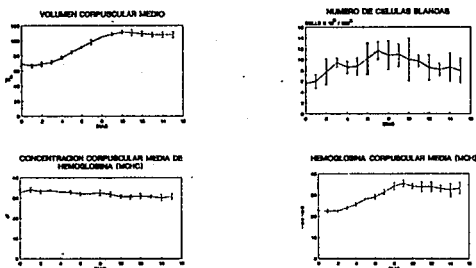
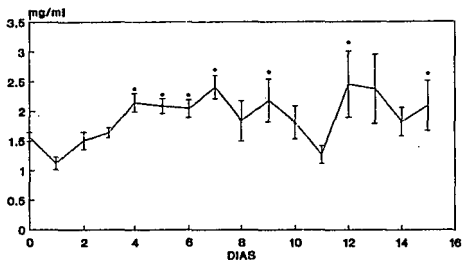


FIGURA 12



Ya que nos interesaba conocer más ampliamente los principales componentes del suero involucrados en el metabolismo del hierro, se determinaron algunos de los parámetros que reflejan el estado del organismo. Así, en la figura 13 se muestran los cambios en la concentración de hierro sérico a lo largo del sangrado. El valor inicial de 1.545 $\mu\text{g/ml}$ se ha incrementado para el día 7 a 2.401 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.01$) encontrándose la tendencia a mantener los niveles de hierro por arriba de los niveles normales hasta el final del período de estudio.

FIGURA 13
CAMBIOS DEL HIERRO SERICO EN LA ANEMIA



* p < 0.05
Se presenta la media \pm S.E. n = 6

La transferrina, fue cuantificada a lo largo del periodo de sangrado, por medio del método de inmunodifusión radial. Para poder calcular la concentración de transferrina en el suero problema, se hizo una curva patrón con concentraciones conocidas de la proteína. A partir de una solución de transferrina de conejo pura con una concentración de 10 mg/ml se hicieron diluciones desde 1:2 hasta 1:32, lo cual nos da un comportamiento lineal en una gráfica de cuadrado del diámetro del halo vs. concentración.

CURVA PATRÓN DE CONCENTRACIÓN DE TRANSFERRINA

Dilución	Transferrina (mg/mL)	Diámetro (mm)	Área (mm ²)
1:2	5.0	9.55	91.20
1:4	2.5	8.5	72.25
1:8	1.25	7.25	52.57
1:16	0.625	5.7	32.49
1:32	0.313	4.7	22.09

La ecuación de la recta, que se ajustó por regresión lineal es:

$$S = S_0 + K [Ag]$$

donde:

S = cuadrado del diámetro del halo (área en mm²)

S₀ = ordenada al origen

K = pendiente de la recta

[Ag] = concentración de transferrina (mg/ml)

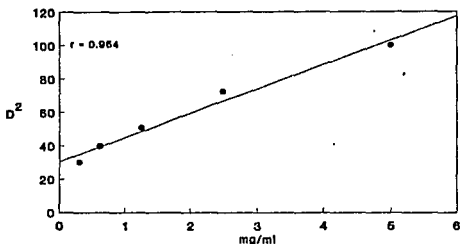
La ordenada al origen no es 0 y está dada por la capacidad del pozo seco mas el volumen de muestra aplicado.

La pendiente de la recta es independiente del tamaño del pozo, pero es inversamente proporcional a la concentración de anticuerpo presente.

Así tenemos que para las concentraciones de transferrina utilizadas la ecuación de la recta es (figura 14):

$$S = 26.751 + 14.126[Ag]$$

FIGURA 14
CURVA PATRON DE TRANSFERRINA



Se presenta el promedio de 12 determinaciones para cada punto con el método de Mancini.

La variación en la transferrina sérica a lo largo del periodo de sangrado se muestra en la figura 15. La concentración inicial de 2.48 mg/ml tiende a incrementarse lentamente de tal manera que en el día 7 existen 2.99 mg/ml ($p < 0.02$). En el día 9 la concentración se ha elevado a 3.47 mg/ml ($p < 0.05$) y se mantiene por encima de los niveles iniciales hasta el día 15 en el cual la concentración (3.89 mg/ml, $p < 0.02$) refleja un incremento de aproximadamente el 50% por arriba del valor del día 0.

La combinación de los valores de transferrina y de hierro se utilizaron para calcular la saturación de la transferrina. En la tabla 7 se presentan tanto los cambios en la concentración de transferrina como los cambios en la saturación agrupados en las diferentes fases en las que se dividió a la anemia. Como puede observarse, no existen modificaciones significativas en la saturación de la transferrina aún cuando su concentración varía significativamente en las fases de recuperación y equilibrio. Este fenómeno puede explicarse puesto que la concentración de hierro también se modifica a lo largo del sangrado incrementándose a partir del día 7 y por tanto la saturación de la proteína no sufre cambios.

FIGURA 15
CAMBIOS EN LA TRANSFERRINA SERICA
DURANTE LA ANEMIA

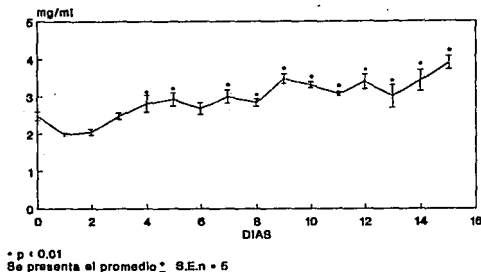


TABLA 7

CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN Y SATURACIÓN CON HIERRO DE LA
TRANSFERRINA SÉRICA EN LAS DIFERENTES FASES DE LA ANEMIA

Fase	Transferrina (mg/ml)	Saturación (%)
Inicial	2.48 \pm 0.12	45.58 \pm 3.06
Aguda	2.45 \pm 0.19	48.91 \pm 2.35
Recuperación	3.06 \pm 0.15*	48.56 \pm 3.25
Equilibrio	3.36 \pm 0.16**	39.33 \pm 3.11

* p < 0.02;

** p < 0.001 al comparar los valores obtenidos contra los valores iniciales.

La concentración de transferrina en el suero se determinó diariamente, promediando los valores para las diferentes fases: días 1 - 5 para la fase aguda; días 6 - 10 para la de recuperación y días 11 - 15 para el equilibrio. La saturación de la transferrina se calculó asumiendo que todo el hierro presente en el suero está unido a esta proteína.

4. Concentración y Actividad de la Ceruloplasmina

La cuantificación de la Cp presente en suero de los conejos a lo largo del periodo de sangrado se llevó a cabo por medio del método de inmunodifusión radial. Esta técnica empleada para la cuantificación de la transferrina requiere el uso de 12 mg de anticuerpo en la placa para obtener una relación lineal entre el cuadrado de los halos de precipitación obtenidos y la concentración de transferrina empleada (0.313 - 5 mg/ml). Por consiguiente, al iniciar el trabajo para establecer las condiciones

óptimas para obtener una curva patrón con el anticuerpo purificado, se decidió probar la misma concentración de anticuerpo empleada para la transferrina. En esas condiciones, no pudo obtenerse halos de precipitación con la cantidad de Cp usada, debido probablemente a que la reacción se dio en o muy cerca del pozo. Se hicieron nuevos ensayos disminuyendo la cantidad de anticuerpo hasta lograr obtener una relación lineal al utilizar 2.5 mg de anticuerpo diluidos en 3.5 ml de agar al 3% en amortiguador de tris-barbituratos pH 8.6 y concentraciones de Cp que van de 0.063 a 1.0 mg/ml.

CURVA PATRÓN DE CONCENTRACIÓN DE CERULOPLASMINA

Ceruloplasmina (mg/ml)	Diámetro (mm)	Área (mm ²)
1.0	6.67	44.44
0.5	5.07	25.67
0.25	4.375	19.14
0.125	3.925	15.41
0.0625	3.5	12.25

La ecuación de la recta, que se ajustó por regresión lineal es:

$$S = S_0 + K [Ag]$$

donde:

S = cuadrado del diámetro del halo (área en mm²)

S₀ = ordenada al origen

K = pendiente de la recta

[Ag] = concentración de ceruloplasmina (mg/ml)

La ordenada al origen no es 0 y está dada por la capacidad del pozo seco mas el volumen de muestra aplicado.

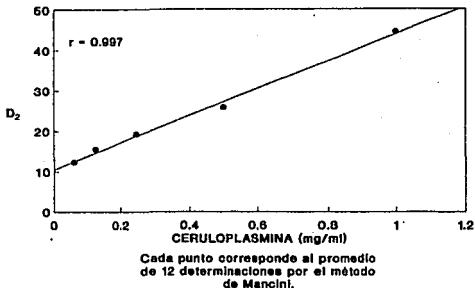
La pendiente de la recta es independiente del tamaño del pozo, pero es inversamente proporcional a la concentración de anticuerpo presente.

Así tenemos que para las concentraciones de Cp utilizadas la ecuación de la recta es (figura 16):

$$S = 10.416 + 33.46 [Ag]$$

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la cuantificación de la Cp presente en el suero de los conejos, se hicieron las determinaciones correspondientes al periodo de sangrado como se muestra en la figura 17. En la figura 18 se muestran las variaciones en la concentración de Cp a lo largo de la anemia. La concentración inicial que fue de 0.140 mg/ml se incrementa significativamente para el día 4 de sangrado (0.222 mg/ml p < 0.01) y tiende a mantenerse por arriba de los valores del día 0; el máximo incremento significativo que presenta esta proteína durante la anemia es de aproximadamente un 75% para el día 11. En la Tabla 8 se resumen las variaciones en la concentración de Cp en la anemia agrupando los días en las distintas fases en las que se ha dividido este proceso.

FIGURA 16
CURVA PATRON DE CERULOPLASMINA



Se determinó la actividad de la Cp presente en el suero de los conejos a lo largo del período de anemia. El método propuesto por Curzon modificado por Lovstad requiere de la adición de ortofenantrolina (quelante específico para el hierro) puesto que es de suma importancia eliminar trazas de hierro que incrementan la reacción y conducen a resultados más elevados que los reales. Ya que tanto el material como los reactivos fueron preparados en condiciones en las cuales suponemos queda eliminado el hierro presente, la determinación de la actividad de oxidasa de la Cp se hizo en presencia y ausencia de ortofenantrolina 1 mM. Aún cuando existen pequeñas diferencias entre los dos métodos, no son estadísticamente significativas, lo cual nos permite suponer que no existe hierro libre en el suero que sea capaz de incrementar la actividad de oxidasa de la Cp presente. En la figura 19 se muestran las variaciones en la actividad de oxidasa de la ceruloplasmina.

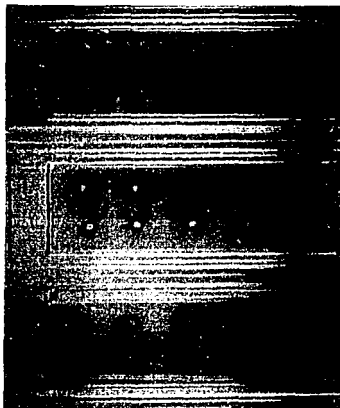
TABLA 8

CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE CP EN LAS FASES DE LA ANEMIA

Fase	Cp (mg/ml)
Inicial	0.141 ± 0.004
Aguda	0.190 ± 0.014*
Recuperación	0.223 ± 0.007*
Equilibrio	0.239 ± 0.013*

* p < 0.05

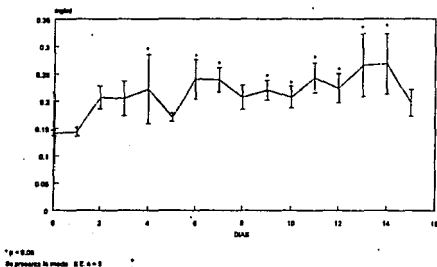
Figura 17



Inmunodifusión radial para la determinación de la Cp. El panel superior corresponde a la curva patrón con concentraciones que van de 0.063 a 1 mg/ml. Se muestran las determinaciones de Cp para los días 0 (panel intermedio) y 12 de anemia, que corresponde a la fase de equilibrio (panel inferior).

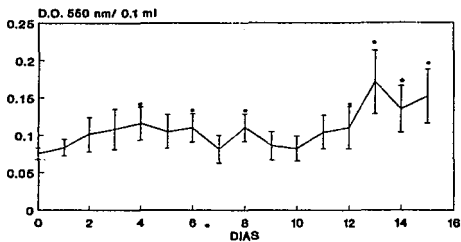
El método de determinación de la actividad de oxidasa de la Cp nos permite calcular la cantidad de la proteína presente en el suero ya que toma en cuenta la relación que existe entre la actividad y la absorbancia obtenida a 550nm y el contenido de cobre de la Cp. Así, se calculó la concentración de Cp en las muestras de suero durante la anemia y los resultados se comparan en la figura 20 con los datos de concentración que se obtuvieron por el método de inmunodifusión radial para este mismo periodo. Como puede observarse no existen diferencias significativas en la concentración de la Cp calculada por los dos métodos, a excepción del día 7 en el cual existe una diferencia de 0.11 mg/ml ($\approx 50\%$, $p < 0.05$). Se buscó además si existía correlación entre las variaciones en la concentración de la Cp y su actividad a lo largo del periodo de sangrado y se encontró una $r = 0.530$ ($p = 0.04$).

FIGURA 18
CP INMUNOREACTIVA DURANTE LA ANEMIA



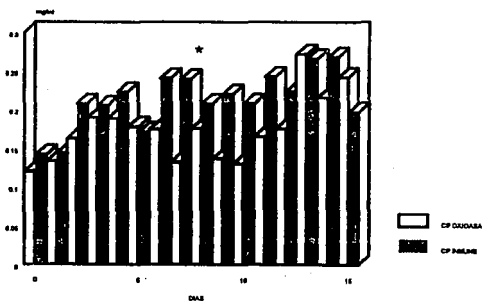
En la literatura se menciona como una de las funciones de la Cp su actividad de ferroxidasa por lo cual se le involucra en el metabolismo del hierro. En la búsqueda de posibles relaciones de esta proteína con el hierro se calculó el coeficiente de correlación entre las variaciones en la concentración de la Cp a lo largo del sangrado y la cantidad de hierro sérico durante este mismo periodo. Se encontró que desfasando un día las variaciones en el hierro con respecto a la Cp existe un coeficiente de correlación de $r = 0.543$ ($p < 0.02$). Cuando se compararon las dos proteínas, transferrina y Cp desfasando los cambios observados un día, pudo observarse que la correlación es de 0.826 ($p = 0.002$) lo cual nos indica que las variaciones en la concentración de Cp se reflejan en cambios en la concentración de transferrina un día después.

FIGURA 19
ACTIVIDAD DE OXIDASA DE LA CP
DURANTE LA ANEMIA



* $p < 0.05$
 Se presenta la media \pm S.E. n = 5

FIGURA 20
CP INMUNOREACTIVA VS. CP POR ACTIVIDAD
DE OXIDASA



* $p < 0.05$

DISCUSIÓN

La purificación de la ceruloplasmina es un proceso que requiere de precauciones extraordinarias para obtener una muestra pura de esta proteína utilizando bien suero humano o de alguna de las especies de vertebrados de donde comúnmente se parte. En forma cotidiana se trabaja con Cp obtenida de suero humano, de cerdo, vaca o borrego, sin embargo no existe más que una mención en la literatura (36) en la que se intenta purificar la proteína de conejo y se hace hincapié en que los resultados son desalentadores ya que debido a su baja concentración se obtuvo con un 60% de pureza. Por otro lado, en el laboratorio se cuenta con un modelo experimental en conejo que nos permite contar con un sistema experimental en el cual estudiar el posible papel de esta proteína en el metabolismo del fierro, así como con una fuente de suero para la purificación de la Cp. Con estos antecedentes, se decidió iniciar el protocolo de purificación de la Cp a partir de suero de conejo tomando como precaución el empleo de ácido α -amino caproico desde la colecta del suero para evitar en lo posible la degradación por plasmina.

Se utilizaron las metodologías que comúnmente se emplean para la obtención de muestras puras de proteína aún cuando, como ya se mencionó, hubo que establecer primero las condiciones óptimas para trabajar con la Cp. El suero de conejo se fraccionó utilizando sulfato de amonio sólido, y el precipitado obtenido se cromatografió en resinas de intercambio iónico. Como resultado se obtuvo Cp de conejo pura. En las distintas ocasiones en que se procesaron muestras de suero para purificar la Cp, la metodología empleada mostró resultados reproducibles, y aún cuando la recuperación de Cp del suero es del 20%, éste representa una purificación de 168 veces.

La proteína purificada se leyó en tres diferentes longitudes de onda (280, 330 y 610 nm) de las cuales, la absorbancia a 280 y 610 nm, se utilizaron para calcular la cantidad y pureza de la Cp obtenida. Se diluyó una alícuota en NaCl 0.9% a una concentración de 1 mg de Cp/ml con la cual se tomó un espectro de absorción desde 260 hasta 650 nm. Encontramos una gran similitud entre el espectro obtenido y el reportado en la literatura para la ceruloplasmina humana (8) y de oveja (56). Los coeficientes de extinción de la Cp de conejo ($E^{1\%}_{1\text{cm}}$) a 280, 330 y 610 no se encuentran reportados, por lo cual se utilizaron los valores obtenidos con la Cp purificada para calcularlos. Los resultados fueron los siguientes: $E^{1\%}_{280} = 13.8$; $E^{1\%}_{330} = 0.44$ y $E^{1\%}_{610} = 0.81$. Estos valores se encuentran en el rango de los reportados para otras especies y por tanto, el cociente entre la absorción entre las tres diferentes longitudes de onda que nos indican la pureza de una muestra de Cp son similares a los ya reportados para la proteína humana (13), de rata (54), caballo (57) y bovina (53). Para la proteína de conejo se calcularon los siguientes valores: $610/280 = 0.044$; $610/330 = 1.39$ y $280/610 = 22.62$. Si comparamos la cantidad, pureza y cocientes de la Cp purificada calculada en función tanto de los coeficientes reportados para la proteína humana (13) como de los coeficientes calculados en este trabajo encontramos una gran similitud en los datos obtenidos que no modifican significativamente ni la cantidad ni la pureza de la muestra obtenida.

La absorción de una muestra de Cp a 330 nm está dada por la cantidad de cobre tipo III presente en una muestra. El cociente entre la absorción a 610 y 330 nm representa la relación entre el cobre tipo I y el tipo III presentes en la proteína. En el caso de la Cp de vaca, la relación 610/330 es de 2.1 (53), para ovejas es de 2.0 (55) y la obtenida en este trabajo para la proteína de conejo es de 1.42. Son pocos los autores que hacen referencia a este cociente, pero se sabe que diferentes factores tales como el pH (53) se reflejan en cambios en la absorción en las diferentes longitudes de onda. También, se ha visto que la manipulación y el envejecimiento de una muestra de Cp purificada, genera un componente incoloro que consiste aparentemente de moléculas desprovistas de cobre tipo I (38) lo que disminuiría la absorción de la muestra a 610 nm y por tanto el cociente entre las dos longitudes de onda sería también menor. Los átomos de cobre "azules" son muy inestables y tienden a perderse con la manipulación mientras que el cobre tipo II aumenta con el envejecimiento y la desnaturación de la proteína (54). Así, podemos postular que la diferencia en el cociente 610/330 entre los reportados y el obtenido para el conejo pueda deberse ya sea a diferencias intrínsecas en el contenido de los dos tipos de cobre en las distintas moléculas o bien a cambios debidos al proceso de obtención de la ceruloplasmina de conejo.

Ahora bien, la Cp de conejo purificada se utilizó para determinar su actividad de oxidasa en función de la cantidad de proteína añadida en el ensayo y que fluctuó en un rango de 10 a 300 µg. Al graficar la absorbancia a 550 nm contra la cantidad de Cp se encontró que existe una relación lineal entre actividad y cantidad. Los ensayos reportados con Cp humana mostraban que esta linealidad se presenta hasta 0.5 U.O. (206). Sin embargo, para la Cp de conejo purificada en este trabajo encontramos esta linealidad hasta alrededor de 2.0 U.O (figura 7). Asimismo, este ensayo nuevamente nos indicó que la proteína estaba pura. Si consideramos que 1 mg Cp = 63 Unidades de actividad y 1 unidad de actividad = 0.1 U.O. a 550 nm (13); 1 mg de Cp = 6.3 U.O. a 550 nm, para 100 µg de proteína esperaríamos una lectura de 0.63 U.O., lectura que obtuvimos al agregar esta cantidad a la mezcla de incubación.

Así, por criterios espectrofotométricos y de actividad de oxidasa, la Cp aparentemente esta pura, sin embargo, esta muestra "pura" en electroforesis no nos genera una sola banda como sería de esperar sino que mostró además de las bandas correspondientes a la Cp (125, 110 y 18.5 kDa), una banda de alto peso molecular (200 kDa) que pensamos no se debe a contaminantes ni a un dímero de la proteína, sino a la presencia de una forma molecular de la Cp de alto peso molecular. Efectivamente, existe un reporte en la literatura (43) en el cual se describe una forma de la Cp con este peso que se presenta en el suero tanto de personas sanas, como en el de recién nacidos y pacientes con la enfermedad de Wilson. También se menciona que esta molécula se encuentra en la fracción con actividad de oxidasa, contiene cobre y está glicosilada. Trabajando con células Hep G2 se encontró que las dos formas de la Cp, 135 y 200, son sintetizadas y secretadas al medio, mientras que en estudios con células hepáticas humanas se han detectado 2 especies de mRNA de Cp lo que sugiere que las dos formas son productos de diferentes mensajeros que contienen secuencias polipeptídicas comunes. Por otro lado, en la rata no se ha encontrado formas de la Cp de alto peso molecular y únicamente se ha detectado un mensajero para esta proteína. Así, esta forma de 200 kDa podría ser el resultado de modificaciones postraduccionales de la Cp nativa, aún cuando la presencia de un mensajero y su síntesis en hígado parecen apuntar a una molécula de importancia fisiológica (43).

El trabajo de Rydén (38), el único que se encuentra acerca de la Cp de conejo, menciona que aún con la proteína 60% pura puede calcularse un peso molecular mínimo para esta molécula de 108,000 y concluye que por comparación con otras ceruloplasminas de mamífero probablemente su peso real esté cercano a 120 kDa. Por otro lado, debido a la gran inestabilidad de la Cp es frecuente su fragmentación. Este proceso de fragmentación parece tener lugar aún en presencia de inhibidores de proteasas durante la purificación y almacenamiento de la proteína. El plasma presenta una actividad proteolítica baja, sin embargo, se puede asumir que los inhibidores de proteasas endógenos se eliminan durante el proceso de purificación por lo que el equilibrio entre proteasas e inhibidores tanto endógenos como los agregados, se altera por lo que los enlaces peptídicos de la Cp más susceptibles a la proteólisis se cortan (42). La plasmina es precisamente la responsable del rompimiento del enlace que genera la banda de 20 kDa aún cuando la trombina puede romper también a la Cp durante su purificación y almacenamiento (41). La electroforesis en SDS de la Cp revela hasta 6 componentes con pesos moleculares de 130, 110, 86, 48, 22 y 18 kDa generados por la proteólisis espontánea de la cadena de Cp (11). En presencia de ácido α amino caproico la proteína humana en electroforesis muestra la banda principal con un peso de 130 kDa y dos componentes generados por el rompimiento de un sólo enlace peptídico con pesos moleculares de 110 y 20 kDa (42). Así, aún cuando se tomaron todas las precauciones para evitar la degradación de la Cp de conejo al purificarla, la electroforesis nos mostró no sólo a la molécula nativa, sino también los fragmentos debidos a la proteólisis por lo que podemos concluir que parte de la Cp obtenida está rota, pero pura.

La inducción de anticuerpos resulta hoy en día una técnica muy frecuentemente usada. Pueden utilizarse diferentes sistemas para generar a los anticuerpos: moléculas monoespecíficas como en el caso de los anticuerpos monoclonales o bien anticuerpos policlonales. Así, uno de los objetivos del trabajo, inducir anticuerpos contra la Cp, se realizó inmunizando cobayos con la Cp de conejo purificada. Existían dudas acerca de la capacidad de la proteína de conejo para disparar el proceso inmune en cobayos, ya que la Cp es una proteína muy conservada evolutivamente y que comparte grandes regiones de identidad de secuencia con otros componentes séricos tales como los factores

V y VIII de coagulación (113-114). Sin embargo, con el empleo del adyuvante completo de Freund en la primera inmunización pudo lograrse la producción de anticuerpos. Estas inmunoglobulinas fueron purificadas; el título obtenido usando el método de Ouchterlony es de 1:64, y presentó únicamente una banda de precipitación, lo cual nos indica además, que la proteína usada para inducir los anticuerpos estaba pura. Por otra parte, al hacer la inmunodifusión radial, pudo observarse que la cantidad de anticuerpo necesario para obtener una relación lineal entre el diámetro del halo y la Cp presente en el ensayo, es baja en relación a otros anticuerpos usados en el laboratorio.

En el proceso de inducción de la anemia encontramos una gran similitud en la respuesta de los parámetros hematológicos con los ya reportados para este sistema experimental (198, 211, 216). Efectivamente, y aún cuando se presentan ligeros cambios en los valores normales al inicio de la anemia debidos simplemente a la variación poblacional, la cinética de los diferentes parámetros hematológicos y en especial, el número de células rojas que nos sirve para dividir a la anemia en las diferentes fases, son muy parecidos a los que se obtienen en este sistema experimental. En la fase de equilibrio de la anemia (días 10-15) pueden calcularse la producción de células rojas y la de hemoglobina; como puede observarse en la figura 11 no se presentan variaciones considerables en estos dos parámetros, lo cual nos indica que se produce igual cantidad a la que se remueve. Así, conocemos el número de células y la cantidad de hemoglobina para cada día así como el volumen de sangre extraído y el peso del animal y por tanto podemos calcular la producción de células rojas que fue de 25.5×10^9 células/kg de peso/día y la de hemoglobina de 0.85 g/ kg de peso/día. Nuevamente encontramos que estos valores concuerdan con los obtenidos en otros experimentos con el sistema de inducción de anemia crónica por sangrado.

El incremento en la producción eritropoética en los conejos anémicos es de 4 a 5 veces sobre la de animales no sangrados, y esta respuesta aparentemente no está limitada por la disponibilidad del hierro contenido en los almacenes o la capacidad de transportarlo en el suero (211). Los conejos son capaces de regular su captación de hierro de la dieta de acuerdo a las condiciones y suministrarlo a los precursores de las células rojas sin modificar considerablemente el sistema de transporte de hierro, como puede observarse en la figura 15. Los niveles de hierro sérico (figura 13) en los conejos aumentan a lo largo del período de sangrado, y este incremento refleja la gran movilización de hierro que existe para la formación de hemoglobina. Si consideramos la producción de hemoglobina en la fase de equilibrio, y tomamos en cuenta que se requieren 3.35 mg de Fe/g de hemoglobina (214), en el sistema se necesitan 9.6 mg de hierro diarios para la síntesis de esta proteína. Durante el protocolo experimental se remueven aproximadamente 180 mg de hierro en forma de sangre, sin embargo, las reservas de hierro son de alrededor de 23 mg (211) por lo que el hierro necesario para la síntesis de hemoglobina debe obtenerse de la dieta, y es suficiente para mantener la producción de células macrocíticas (figura 12) características del modelo de anemia experimental inducida por sangrado.

En condiciones de anemia crónica, la modificación de la cantidad de transferrina, molécula encargada del transporte sérico del hierro, se hace patente hasta la fase de recuperación y equilibrio en las cuales encontramos valores aproximadamente 50% por arriba de los iniciales. Este aumento es paralelo al incremento observado en la concentración de hierro sérico, por lo cual, no hay variación en el porcentaje de saturación de la transferrina, hecho que ya habíamos detectado en otro estudio realizado con este mismo sistema (216). En este trabajo encontramos valores de hierro sérico ligeramente menores y que alcanzan un máximo de 2.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cuando en otros ensayos se aproximan a los 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de suero. Si consideramos que el aumento en el hierro sérico observado en este trabajo fue menor que el detectado en otras ocasiones pero que el incremento en la transferrina fue similar, resulta fácil entender el hecho de que la saturación de la transferrina no se haya modificado.

La determinación de la actividad de la Cp se hizo utilizando suero en lugar de plasma ya que resultados previos (200) habían mostrado que la concentración de EDTA que se usa como anticoagulante parece tener un efecto inhibitorio de cuando menos el 45% sobre la Cp al quelar el cobre asociado a la proteína (18). Por otra parte, se sabe que el Fe^{++} interactúa con la Cp incrementando su actividad (101,121-123); el método de determinación de actividad de la Cp requiere entonces de material libre de hierro y la presencia de un quelante específico, en este caso la ortofenantrolina (209).

Si existe hierro "libre" en el suero, es decir, no unido a la transferrina podríamos encontrar marcadas diferencias en la actividad de la proteína al determinarla en condiciones en las que exista o no la orotofenantrolina. El hecho de no observar diferencias entre ambas determinaciones en este trabajo puede deberse al hecho de que se requieren concentraciones mayores a 0.4 μ mol/L / 0.1 ml de suero para detectar el efecto de activación de la Cp, y en el suero de los conejos anémicos existe un máximo de 0.012 μ mol/L de hierro / 0.1 ml de suero (200).

Por otra parte, al comparar los cambios en la actividad de oxidasa de la Cp a lo largo del período de sangrado observados en este estudio, con los datos obtenidos en otro trabajo (200), encontramos patrones de variación parecidos, en los cuales es patente la diferencia de cada conejo en su respuesta. La actividad de la Cp a lo largo del sangrado tiende a aumentar alcanzando su máximo significativo en el día 13 de anemia (1.705 U.O./ml = 0.271 mg/ml, $p < 0.001$), día en el cual los valores son el doble de los iniciales (0.754 U.O./ml = 0.120 mg/ml). Este ensayo de la actividad nos permite transformar la absorbancia a 550 nm en valores de concentración, lo cual nos indicó una mayor cantidad de Cp en el día 0 en los conejos de este trabajo (0.12 mg/ml), con respecto a los valores previamente determinados (200). Cabe mencionar sin embargo, que la cantidad de Cp en el día 0 de sangrado, valor que podemos considerar el normal de los conejos, que es de 0.12 mg/ml representa aproximadamente la mitad de la cantidad presente en adultos humanos normales y en ratas (1,54,137) y es precisamente uno de los factores que ha dificultado la obtención de muestras puras de la proteína de conejo.

Las condiciones de determinación de actividad evitan la presencia de agentes que pudieran interactuar con la Cp aumentando o disminuyendo su acción de oxidasa. Quedaba la duda, sin embargo, si los cambios en la actividad durante la anemia se debían a una modificación real de la concentración de Cp en el suero, o era el resultado de una variación de la actividad de oxidasa de la molécula por modificación de las condiciones fisiológicas. La determinación de la cantidad de Cp por inmunodifusión radial nos mostró que a pesar de existir ligeras diferencias (alrededor del 10%) con respecto a los valores calculados en función de su actividad de oxidasa, a excepción del día 7, son estadísticamente iguales. La Cp inmunoreactiva alcanza en el día 4 el primer aumento significativo, y alcanza su máximo nivel significativo para el día 11 en el que la cantidad de Cp sérica representa un incremento del 75% sobre la concentración inicial. La diferencia en la cantidad de Cp detectada por los dos métodos podríamos explicarla como el resultado de una inhibición de la proteína que ocasionara menores niveles de actividad. Una explicación alternativa a estas diferencias en la cantidad de Cp sería la presencia de una mayor cantidad de apoceruloplasmina presente en la circulación. Se sabe que no existen diferencias en la velocidad de biosíntesis y secreción de la apo- y holo- proteínas en el hígado, y que en condiciones normales alrededor del 10% de la proteína circulante se presenta como apoceruloplasmina (212). La incorporación de cobre a la proteína en el hígado sería entonces limitante únicamente en función de la relación de holo- a apo-proteína secretada de la célula (73). La alimentación de los conejos y el tipo de sistema de inducción de una anemia crónica por sangrado nos permiten asumir que la cantidad de cobre es suficiente para cubrir los requerimientos diarios del conejo. Sin embargo, en condiciones en las cuales se incrementan drásticamente las necesidades del animal, se puede llegar a una deficiencia de cobre temporal, que incrementa hasta un 40% la cantidad de apoceruloplasmina presente en la circulación (38-39), lo cual se reflejaría como una menor cantidad de proteína activa con respecto a la Cp inmunoreactiva. Así, aún cuando la primera evidencia de una mayor cantidad de Cp en el sistema se deriva del aumento en la actividad de oxidasa, el uso de métodos de inmunoprecipitación nos sugiere alteraciones en el metabolismo de la Cp, ya sea un incremento en su síntesis y/o una disminución en su catabolismo.

Se sabe que la ceruloplasmina se modifica en respuesta a múltiples condiciones tanto fisiológicas como patológicas (1). En este trabajo, encontramos una elevación en los niveles de esta proteína que pueden ser el resultado de un incremento en la síntesis o bien una disminución en su catabolismo. El aumento en la actividad y concentración de la Cp se presenta desde el inicio del protocolo de sangrado, lo cual permite suponer que se comporta como una proteína reactante de fase aguda. Esta respuesta de fase aguda se expresa como múltiples alteraciones de las funciones metabólicas, endocrinas, neurológicas e inmunológicas, caracterizadas principalmente por un aumento en la síntesis de algunas proteínas hepáticas, leucocitos, anemia, así como también un incremento de los ni-

veles de cobre sérico. También se sabe que esta respuesta parece estar iniciada por la Interleucina-1, que aparentemente estimula la síntesis de ceruloplasmina en el hígado (215). La respuesta que observamos parece ser específica y no deberse a un aumento generalizado de proteínas hepáticas, ya que hemos determinado la variación en la concentración total de proteínas en el suero y la cantidad de albúmina a lo largo de la anemia y no se detectan modificaciones en su concentración. Sin embargo, en otro modelo experimental, el del síndrome nefrótico, la disminución de la Cp circulante, permite suponer que este tipo de respuesta no ocurre en las ratas (197).

Ahora bien, en el modelo de anemia crónica experimental buscamos una posible relación entre los metabolismos del hierro y cobre. La primera instancia, fue determinar si existe correlación entre las variaciones que presenta la Cp a lo largo del sangrado y los niveles de hierro sérico en este mismo periodo. Cuando se relaciona día a día estos dos parámetros no se obtiene una correlación significativa; sin embargo al desfasar los valores 1 día, es decir, los cambios en la Cp se reflejan en modificaciones de los niveles de hierro 24 horas después, la correlación aún cuando baja, se hace estadísticamente significativa. Por otra parte, la transferrina, proteína sérica responsable del transporte de hierro desde los sitios de absorción hasta los de utilización y/o almacenamiento, también se modifica en la anemia. Si relacionamos los cambios presentados por la Cp y la transferrina desfasando nuevamente los valores 1 día, encontramos una buena correlación. El hecho de que se presente relación entre estos 3 parámetros (Cp, transferrina y hierro) desfasando los aumentos un día es congruente con el papel de la Cp como directora en la toma de hierro, y nos indicaría que en respuesta a la inducción de la anemia se modifican tanto el metabolismo de cobre como el de hierro. En condiciones normales, casi todo el hierro unido a transferrina es captado rápidamente por la médula. Al inducirse la anemia por remoción de sangre, se estimula la eritropoyesis y por tanto la necesidad de hierro. Los reticulocitos tanto de médula como de sangre son capaces de utilizar el Fe(III) unido a la transferrina. Sin embargo, el hierro que se absorbe en el intestino es Fe(II) y debe por tanto oxidarse antes de incorporarse a la apotransferrina. Se sabe que en el plasma existen condiciones que permiten la oxidación no enzimática del hierro, tales como el oxígeno y el citrato, sin embargo, la velocidad con la cual se lleva a cabo es muy baja en relación con los requerimientos normales del organismo y por tanto insuficiente en condiciones en las cuales la necesidad de Fe(III) aumenta drásticamente como en el caso de nuestro sistema experimental (142,149). La ceruloplasmina es capaz de oxidar el hierro hasta 20 veces más rápidamente que la oxidación no enzimática. Sabemos que en el humano existe un recambio de 30-40 mg de hierro al día en el plasma, y en estudios en los cuales se administra Cp a cerdos, se ha detectado la elevación rápida (4 horas) de los niveles de hierro sérico, de tal manera que se ha concluido que el efecto primario de la Cp es el incrementar el flujo de hierro al plasma ya sea que este hierro provenga de las células hepáticas o el intestino. Ahora bien, se ha encontrado que la máxima velocidad de movilización de hierro se presenta cuando existe cuando menos el 10% de la concentración de la enzima, alrededor de 0.2 μ M, y que en estas condiciones se transportan 5.2 mg de Fe/kg de peso (142-153). En el conejo normal, la cantidad de Cp presente en el suero equivale a 1.12 mM, y en la fase de equilibrio, se requieren alrededor de 9 mg de Fe/día para mantener la producción de hemoglobina. Así, aún cuando no se modificara la Cp durante la anemia, la cantidad presente es suficiente para cubrir los requerimientos diarios de hierro. Este proceso parece no estar relacionado con la cantidad de transferrina y su velocidad dependería en última instancia por la disponibilidad de hierro que pueda movilizarse.

El modelo de inducción de anemia crónica por sangrado nos ha permitido el estudio de la eritropoyesis y el metabolismo del hierro (198-199,211). Hemos encontrado que existe un "tope" en la eritropoyesis que se incrementa hasta 4-5 veces en nuestro sistema, y que aparentemente el hierro no es un factor limitante en este proceso. Por otro lado, ya que las reservas de hierro en el hígado de los conejos son de apenas 23 mg, el hierro necesario para la eritropoyesis debe provenir principalmente de la dieta. Podemos postular que en respuesta a una mayor necesidad de hierro el organismo incrementa su absorción y la Cp se encarga de transformarlo en un complejo transferrina-Fe(III) que puede ser utilizado por la célula para la síntesis de hemoglobina. El aumento en la cantidad de Cp en nuestro modelo podría explicarse directamente como el resultado de una modificación de su metabolismo en respuesta a la necesidad incrementada de hierro (actividad de ferroxidasa), o bien, la respuesta a una serie de estímulos (inflamación, protección contra la oxidación) que se sabe inducen cambios en el "status" de la Cp. Finalmente, el resultado de la inducción de la anemia en

los conejos en lo que se refiere a los metabolismos de hierro y cobre es una alteración de su equilibrio. Los resultados reportados en la literatura, así como los emanados de este trabajo, nos plantean una nueva serie de interrogantes acerca de la ceruloplasmina y su papel como vínculo molecular entre el metabolismo del hierro y el del cobre.

CONCLUSIONES

La ceruloplasmina de conejo obtenida mediante el empleo de cromatografía de intercambio iónico presentó las características de absorción espectrofotométrica descritas para la proteína humana. La relación A_{610}/A_{280} de la proteína azul obtenida fue de 0.0475. La electroforesis nos permite proponer la existencia de formas de alto peso molecular aparente, cercanas a 200,000 además de la ceruloplasmina "normal" de 125,000.

En el modelo de anemia experimental por sangrado crónico la ceruloplasmina presentó variaciones en su concentración determinadas a través del método de inmunodifusión radial que emplea el antígeno inducido contra esta proteína en cuyo en el presente trabajo.

Se propone que las variaciones de la ceruloplasmina están ligadas a los cambios observados en la cantidad de transferrina y hierro sérico que se manifiestan 24 horas después lo que es congruente con un papel de dirección en la toma de hierro por la ceruloplasmina.

REFERENCIAS

1. Poulik, MD. and Weiss, ML. *Ceruloplasmin* en: The Plasma Proteins. Ed. by Frank, W. Putnam. Academic Press. New York. 2nd. Ed. Vol. II p 52 (1975).
2. Laurie, SH. and Mohammed, ES. Caeruloplasmin: The Enigmatic Copper Protein. *Coord Chem. Rev* **33**, 279 (1980).
3. Holmberg, CG. On the Presence of a laccase-like Enzyme in Serum and its Relation to the Copper in Serum. *Acta Physiol Scand* **8**, 227 (1944).
4. Holmberg, CG. and Laurell, CB. Investigations in Serum Copper. I. Nature of Serum Copper and its Relation to the Iron-binding Protein in Human Serum. *Acta Chem Scand* **1**, 944 (1947).
5. Holmberg, CG. and Laurell, CB. Investigations in Serum Copper. II. Isolation of the Copper Containing Protein, and a Description of some of its Properties. *Acta Chem Scand* **2**, 550 (1948).
6. Holmberg, CG. and Laurell, CB. Investigations in Serum Copper. III. Coeruloplasmin as an Enzyme. *Acta Chem Scand* **5**, 478 (1951).
7. Holmberg, CG. and Laurell, CB. Investigations in Serum Copper. IV. Effect of Different Anions on the Enzymatic Activity of Coeruloplasmin. *Acta Chem Scand* **5**, 921 (1951).
8. Rydén, L. *Ceruloplasmin* in: Copper Proteins and Copper Enzymes. Ed. René Lontie. CRC Press. Florida. Vol. III p37 (1984).
9. Frieden, E. and Hsieh, HS. Ceruloplasmin: The Copper Transport Protein with Essential Oxidase Activity. *Adv. Enzymol* **44**, 187 (1976).
10. Araud, P., Gianazza, E. and Miribel, L. Ceruloplasmin. *Meth Enzymol* **163**, 441 (1988).
11. Steinbuch, M. and Quentin, M. Preparation of Ceruloplasmin. *Nature* **183**, 323 (1959).
12. Sanders, BE., Miller, OP. and Richard, MN. Preparation of Ceruloplasmin. *Arch Biochem Biophys* **84**, 60 (1959).
13. Curzon, G. and Vallet, L. The Purification of Human Caeruloplasmin. *Biochem J* **74**, 279 (1960).
14. Broman, L. Separation and Characterization of Two Coeruloplasmins from Human Serum. *Nature* **182**, 1655 (1958).
15. Richterich, R., Temperli, A. and Aebi, H. Die heterogenität des caeruloplasmins: Isolierung und charakterisierung von zwei cupro-proteinen aus human-serum. *Biochim Biophys Acta* **66**, 240 (1962).
16. Broman, L. and Kjellin, K. A rapid semi-continuous method for purification of ceruloplasmin from human serum. *Biochim Biophys Acta* **82**, 101 (1964).
17. Deutsch, HF. The Preparation of Crystalline Ceruloplasmin from Human Plasma. *Arch Biochem Biophys* **89**, 225 (1960).
18. Kasper, CB. and Deutsch, HF. Physicochemical Studies of Human Ceruloplasmin. *J Biol. Chem* **238**, 2325 (1963).

19. Deutsch, HF., Kasper, CB. and Walsh, DA. Rapid method for preparation of crystalline human ceruloplasmin from Cohn fraction IV-1. *Arch Biochem Biophys* **99**, 132 (1962).
20. Morell, A. and Scheinberg, IH. Heterogeneity of Human Ceruloplasmin. *Science* **131**, 930 (1960).
21. Laurle, SH. and Mohammed, ES. Ceruloplasmin: The enigmatic Copper Protein. *Coord Chem Rev* **33**, 279 (1980).
22. Morell, AG., Van Den Hamer, CJA. and Scheinberg, IH. Physical and Chemical Studies on Ceruloplasmin. VI. Preparation of Human Ceruloplasmin Crystals. *J Biol. Chem* **244**, 3494 (1969).
23. Deutsch, HF. and Fisher, GB. Studies of Human Ceruloplasmin Fractions Separated by Chromatography on Hydroxylapatite. *J Biol. Chem* **239**, 3325 (1964).
24. Rydén, L. Evidence for proteolytic fragments in commercial samples of human ceruloplasmin. *FEBS Lett* **18**, 321 (1971).
25. Noyer, M., Dwulet, FE., Hao, YL. and Putnam, FW. Purification and Characterization of Undegraded Human Ceruloplasmin. *Anal Biochem* **102**, 450 (1980).
26. Oosthuizen, MMJ., Nel, L., Myburgh, JA. and Crookes, RL. Purification of Undegraded Ceruloplasmin from Outdated Human Plasma. *Anal Biochem* **148**, 1 (1985).
27. Belew, M., Peterson, EA. and Porath, J. A High-Capacity Hydrophobic Adsorbent for Human Serum Albumin. *Anal Biochem* **151**, 438 (1985).
28. Kawasaki, N., Ishigami, A., Tanimoto, T. and Tanaka, A. Determination of Iron(III) Ion Using Ion Chromatography with Electrochemical Detection and its Application to the Assay of the Ferroxidase Activity of Ceruloplasmin. *J Chromatography* **603**, 237 (1990).
29. Poulik, MD. Electrophoretic and Immunological Studies on Structural Sub-Units of Human Ceruloplasmin. *Nature* **194**, 842 (1962).
30. Kasper, CB. and Deutsch, HF. Immunochemical Studies of Crystalline Human Ceruloplasmin and Derivatives. *J Biol. Chem* **238**, 2343 (1963).
31. Pollon, WN. and Beam, AG. The Molecular Structure of Human Ceruloplasmin: Evidence for Subunits. *Biochim Biophys Acta* **127**, 407 (1966).
32. Freeman, S. and Daniel, E. Dissociation and Reconstitution of Human Ceruloplasmin. *Biochem* **12**, 4086 (1973).
33. Simons, K. and Beam, AG. Isolation and Partial Characterization of the Polypeptide Chains in Human Ceruloplasmin. *Biochim Biophys Acta* **175**, 260 (1969).
34. Mukasa, H., Kajiya, S., Sugiyama, K., et al. The Subunit Structure of Porcine Ceruloplasmin. *Biochim Biophys Acta* **168**, 132 (1968).
35. Rydén, L. Single-Chain Structure of Human Ceruloplasmin. *Eur J Biochem* **26**, 380 (1972).
36. Rydén, L. Comparison of Polypeptide-Chain Structure of Four Mammalian Ceruloplasmins by Gel Filtration in Guanidine Hydrochloride Solutions. *Eur J Biochem* **28**, 48 (1972).

37. Rydén, L. and Björk, I. Reinvestigation of Some Physicochemical and Chemical Properties of Human Ceruloplasmin (Ferroxldase). *Biochem* **15**, 3411 (1976).
38. Carrico, R.J., Deutsch, H.F., Beinert, H. and Orme-Johnson, W.H. Some Properties of an Apoceruloplasmin-like Protein in Human Serum. *J Biol. Chem* **244**, 4141 (1969).
39. Holtzman, N.A. and Gaumnitz, B.M. Identification of an Apoceruloplasmin-like Substance in the Plasma of Copper-deficient Rats. *J Biol. Chem* **245**, 2350 (1970).
40. Kasper, C.B., Deutsch, H.F. and Beinert, H. Studies on the State of Copper in Native and Modified Human Ceruloplasmin. *J Biol. Chem* **238**, 2338 (1963).
41. Kingston, I.B., Kingston, B.L. and Putnam, F.W. Chemical Evidence that Proteolytic Cleavage Causes the Heterogeneity Present in Human Ceruloplasmin Preparations. *Proc Natl. Acad. Sci* **74**, 5377 (1977).
42. Moshkov, K.A., Lakatos, S., Hajdu, J. *et al.* Proteolysis of Human Ceruloplasmin. Some Peptide Bonds are Particularly Susceptible to Proteolytic Attack. *Eur J Biochem* **94**, 127 (1979).
43. Sato, M., Schilsky, M.L., Stockert, R.J., *et al.* Detection of Multiple Forms of Human Ceruloplasmin. A novel M_r 200,000 form. *J Biol. Chem* **265**, 2533 (1990).
44. Takahashi, N., Bauman, R.A., Ortel, T.L. *et al.* Internal Triplication in the Structure of Human Ceruloplasmin. *Proc Natl. Acad. Sci* **80**, 115 (1983).
45. Takahashi, N., Ortel, T.L. and Putnam, F.W. Single-chain Structure of Human Ceruloplasmin: The Complete Aminoacid Sequence of the Whole Molecule. *Proc Natl. Acad. Sci* **81**, 390 (1984).
46. Kingston, I.B., Kingston, B.L. and Putnam, F.W. Complete Amino Acid Sequence of a Histidine-Rich Proteolytic Fragment of Human Ceruloplasmin. *Proc Natl. Acad. Sci* **76**, 1668 (1979).
47. Dwulet, F.E. and Putnam, F.W. Internal Duplication and Evolution of Human Ceruloplasmin. *Proc Natl. Acad. Sci* **78**, 2805 (1981).
48. Kingston, I.B., Kingston, B.L. and Putnam, F.W. Primary Structure of a Histidine-rich Proteolytic Fragment of Human Ceruloplasmin. I. Amino Acid Sequence of the Cyanogen Bromide Peptides. *J Biol. Chem* **255**, 2878 (1980).
49. Kingston, I.B., Kingston, B.L. and Putnam, F.W. Primary Structure of a Histidine-rich Proteolytic Fragment of Human Ceruloplasmin. II. Amino Acid Sequence of the Tryptic Peptides. *J Biol. Chem* **255**, 2888 (1980).
50. Jamieson, G.A. Studies on Glycoproteins. I. The Carbohydrate Portion of Human Ceruloplasmin. *J Biol. Chem* **240**, 2019 (1965).
51. Bonaccorsi di Patti, M.C., Musci, G., Giartosio, A., *et al.* The Multidomain Structure of Ceruloplasmin from Calorimetric and Limited Proteolysis Studies. *J Biol. Chem* **265**, 21018 (1990).
52. Mukasa, H., Nosoh, Y. and Sato, T. Reversible Dissociation of Porcine Ceruloplasmin Into Subunits. *Biochim Biophys Acta* **168**, 483 (1968).
53. Calabrese, L., Malatesta, F. and Barra, D. Purification and properties of bovine caeruloplasmin. *Biochem J* **198**, 667 (1981).

54. Manolis, A. and Cox, DW. Purification of rat ceruloplasmin: characterization and comparison with human ceruloplasmin. *Prep Biochem* **10**, 121 (1980).
55. Calabrese, L., Capuozzo, E., Gattieri, A. and Bellocco, E. Sheep Ceruloplasmin: Isolation and Characterization. *Mol Cell Biochem* **51**, 129 (1983).
56. Calabrese, L., Mateescu, MA., Carbonaro, M. and Mondovi, B. Reexamination of Spectroscopic Properties of Ceruloplasmin Freshly Isolated with a Novel Very Rapid Single-Step Procedure. *Bioch Internat* **16**, 199 (1988).
57. Medda, R., Cara, N. and Floris, G. Horse Plasma Ceruloplasmin Molecular Weight and Subunit Analysis. *Prep Bioch* **17**, 447 (1987).
58. Starcher, B and Hill, CH. Isolation and characterization of induced ceruloplasmin from chicken serum. *Biochim Biophys Acta* **127**, 400 (1986).
59. Disilvestro, RA. and Harris ED. Purification and partial characterization of ceruloplasmin from chicken serum. *Arch Biochem Biophys* **241**, 438 (1985).
60. Hilewicz-Grabska, M. Zgirski, A., Krajewski, T. and Plonka, A. Purification and partial characterization of goose ceruloplasmin. *Arch Biochem Biophys* **280**, 18 (1988).
61. Musci, G., Carbonaro, M., Adriani, A. et al. Unusual Stability of a Reptilian Ceruloplasmin. *Arch Biochem Biophys* **279**, 8 (1990).
62. Evans, GW. and Weideranders, RE. Pituitary- Adrenal Regulation of Ceruloplasmin. *Nature* **215**, 766 (1967).
63. Evans, GW., Comatzer, NF. and Comatzer, WE. Mechanisms for Hormone-Induced Alterations in Serum Ceruloplasmin. *Am J Physiol* **218**, 613 (1970).
64. Evans, GW., Myron, DR., Comatzer, NF. and Comatzer, WE. Age-dependent Alterations in Hepatic Subcellular Copper Distribution and Plasma Ceruloplasmin. *Am J Physiol* **218**, 298 (1970).
65. Evans, GW., Majors, PF. and Comatzer, WE. Induction of Ceruloplasmin Synthesis by Copper. *Biochem Biophys Res Commun* **41**, 1120 (1970).
66. Young, SN. and Curzon, G. Neonatal Human Ceruloplasmin. *Biochim Biophys Acta* **336**, 306 (1974).
67. Salmenpera, L., Perheentupa, J., Pakarinen, P and Sillmes, MA. Cu Nutrition in Infants During Prolonged Exclusive Breast-Feeding: Low Intake but Rising Serum Concentrations of Cu and Ceruloplasmin. *Am J Clin Nutr* **43**, 251 (1986).
68. Chang, IC., Mitholland, DC. and Matrone, G. Controlling Factors in the Development of Ceruloplasmin in Pigs During the neonatal-Growth Period. *J Nutr* **106**, 1343 (1976).
69. Bell, JU., López, JM. and Bartos, KD. The Postnatal Development of Serum Zinc, Copper and Ceruloplasmin in the Horse. *Comp Biochem Physiol* **87A**, 561 (1987).
70. Fleming, RE. and Gitlin, JD. Primary Structure of Rat Ceruloplasmin and Analysis of Tissue-specific Gene Expression during Development. *J Biol. Chem* **265**, 7701 (1990).

71. Gaitskhokh, VS., Voronina, OV., Denezhkina, VV. *et al.* Expression of Ceruloplasmin Gene in Various Organs of the Rat. *Biokhimiya* 55, 927 (1990).
72. Gaitskhokh, VS., L'Vov, VM., Monakhov, NK., *et al.* Intracellular Distribution of Rat-Liver Polyribosomes Synthesizing Ceruloplasmin. *Eur J Biochem* 115, 39 (1981).
73. Sato, M. and Gitlin, JD. Mechanisms of Copper Incorporation During the Biosynthesis of Human Ceruloplasmin. *J Biol. Chem* 266, 5128 (1991).
74. McArdle, HJ., Mercer, JF., Sargeson, AM. and Danks, DM. Effects of Cellular Copper Content on Copper Uptake and Metallothionein and Ceruloplasmin mRNA Levels in Mouse Hepatocytes. *J Nutr* 120, 1370 (1990).
75. Kataoka, M. and Tavassoli, M. Ceruloplasmin Receptors in Liver Cell Suspensions are Limited to the Endothelium. *Exp. Cell Res* 155, 232 (1984).
76. Tavassoli, M., Kishimoto, T. and Kataoka, M. Liver Endothelium Mediates Hepatocyte's Uptake of Ceruloplasmin. *J Cell Biol.* 102, 1298 (1986).
77. Irie, S. and Tavassoli, M. Liver Endothelium Desialates Ceruloplasmin. *Biochem Biophys Res Commun* 140, 94 (1986).
78. Omoto, E. and Tavassoli, M. The Role of Endosomal Traffic in the Transendothelial Transport of Ceruloplasmin in the Liver. *Biochem Biophys Res Commun* 162, 1346 (1989).
79. Omoto, E. and Tavassoli, M. Purification and Partial Characterization of Ceruloplasmin Receptors from Rat Liver Endothelium. *Arch Biochem Biophys* 282, 34 (1990).
80. Barnes, G. and Frieden, E. Ceruloplasmin Receptors of Erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 126, 157 (1984).
81. Dini, L., Carbonara, M. Musci, G. and Calabrese, L. The Interaction of Ceruloplasmin with Kupffer Cells. *Eur J Cell Biol.* 52, 207 (1990).
82. Stevens, MD., DiSilvestro, RA. and Harris, ED. Specific Receptor for Ceruloplasmin in Membrane Fragments from Aortic and Heart Tissues. *Biochem* 23, 261 (1984).
83. Saenko, EL., Basevich, VV. and Yaropolov, AI. Peculiarities of the Interaction of Ceruloplasmin with the Specific Receptor of Human Erythrocytes. *Biokhimiya* 53, 317 (1988).
84. Messerschmidt, A. and Huber, R. The Blue Oxidases, Ascorbate Oxidase, Laccase and Ceruloplasmin. *Eur J Biochem* 187, 341 (1990).
85. Vasil'ev, VB., Nelifakh, SA., Rusakov, DV., *et al.* Spectral Investigation on the Mechanism of Oxidase Activity of Ceruloplasmin. *Biokhimiya* 53, 620 (1988).
86. Calabrese, L., Carbonara, M. and Musci, G. Presence of Coupled Trinuclear Copper Cluster in Mammalian Ceruloplasmin is Essential for Efficient Electron Transfer to Oxygen. *J Biol. Chem* 264, 6183 (1989).
87. Nyfén, U. and Pettersson, G. The Effect of Diethylpyrocarbonate on Some Physical and Chemical Properties of Ceruloplasmin. *Eur J Biochem* 27, 578 (1972).

88. Gunnarsson, PO., Nylén, U. and Pettersson, G. Effect of pH on Electron-Paramagnetic Resonance Spectra of Ceruloplasmin. *Eur J Biochem* **37**, 47 (1973).
89. Calabrese, L. and Carbonaro, M. An E.P.R. Study of the Non-Equivalence of the Copper Sites of Ceruloplasmin. *Biochem J* **238**, 291 (1986).
90. Veldsema, A. and Van Gelder, BF. The Ratio of Type-1 and -2 Cu(II) in Human Ceruloplasmin. *Biochim Biophys Acta* **293**, 322 (1973).
91. Curzon, G. Effect of Chymotrypsin on Ceruloplasmin. *Nature* **181**, 115 (1958).
92. Aisen, P. Physical and Chemical Studies on Ceruloplasmin. III. A Stabilizing Copper-Copper Interaction in Ceruloplasmin. *J Biol. Chem* **240**, 1974 (1965).
93. Blumberg, WE. and Eisinger, J. Physical and Chemical Studies on Ceruloplasmin. I. The Relation Between Blue Color and the Valence of Copper. *J Biol. Chem* **238**, 1675 (1963).
94. Gunnarsson, PO., Nylén, U. and Pettersson, G. Inhibition of Ceruloplasmin by Inorganic Anions. *Eur J Biochem* **27**, 572 (1972).
95. Byers, W., Curzon, G. Garbett, K. et al. Anion-Binding and the State of Copper in Ceruloplasmin. *Biochim Biophys Acta* **310**, 38 (1973).
96. Curzon, G. An Investigation of the Decolorization of Ceruloplasmin by Acid. *Biochem J* **97**, 151 (1965).
97. Curzon, G. The Inhibition of Ceruloplasmin by Azide. *Biochem J* **100**, 285 (1966).
98. Curzon, G. and Speyer, BE. Inhibitors of Ceruloplasmin. *Biochem J* **105**, 243 (1967).
99. Speyer, BE. and Curzon, G. The Inhibition of Ceruloplasmin by Cyanide. *Biochem J* **106**, 905 (1968).
100. Rydén, L. Human Ceruloplasmin as a Polymorphic Glycoprotein. Analysis by Chromatography on Hydroxyapatite. *Int. J. Prot Res* **11**, 131 (1971).
101. Huber, CT. and Frieden, E. Substrate Activation and the Kinetics of Ferroxidase. *J Biol. Chem* **245**, 3973 (1970).
102. Morell, AG. and Scheinberg, IH. Preparation of an Apoprotein from Ceruloplasmin by Reversible Dissociation of Copper. *Science* **127**, 588 (1958).
103. Holtzman, NA. and Gaumnitz, BM. Studies on the Rate of Release and Turnover of Ceruloplasmin and Apoceruloplasmin in Rat Plasma. *J Biol. Chem* **245**, 2354 (1970).
104. Cartwright, GE., Markowitz, H., Shields, GS. and Wintrobe, MM. Studies on Copper Metabolism. XXIX. A Critical Analysis of Serum Copper and Ceruloplasmin Concentrations in Normal Subjects, Patients with Wilson's Disease and Relatives of Patients with Wilson's Disease. *Am J Med.* **28**, 555 (1960).
105. Wang, H., Koschinsky, M. and Hamerton, JL. Localization of the Processed Gene for Human Ceruloplasmin to Chromosome Region 8q21.23-q23.1 by in situ Hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **47**, 230 (1988).

106. Yang, F., Lum, JB., McGilli, JR. *et al.* Human Transferrin: cDNA Characterization and Chromosomal Localization. *Proc Natl. Acad. Sci* **81**, 2752 (1984).
107. Yang, F., Naylor, SL., Lum, JB. *et al.* Characterization, Mapping, and Expression of the Human Ceruloplasmin Gene. *Proc Natl. Acad. Sci* **83**, 3257 (1986).
108. Mercer, JFB. and Grimes, A. Isolation of a Human Ceruloplasmin cDNA Clone that Includes the N-terminal Leader Sequence. *FEBS Lett* **203**, 185 (1986).
109. Yang, F., Friedrichs, WE., Cupples, RL. *et al.* Human Ceruloplasmin. Tissue-Specific Expression of Transcripts Produced by Alternative Splicing. *J Biol. Chem* **265**, 10780 (1990).
110. Koschinsky, ML., Chow, BKC., Schwartz, J., Hamerton, JL. and MacGillivray, RTA. Isolation and Characterization of a Processed Gene for Human Ceruloplasmin. *Biochem* **26**, 7760 (1987).
111. Prozorovski, VN., Rashkovetski, LG., Shavlovski, MM., Vasiliev, V. and Neifakh, SA. Evidence that Human Ceruloplasmin molecule consists of Homologous Parts. *Int. J Peptide Protein Res* **19**, 40 (1982).
112. Germann, UA. and Lerch, K. Isolation and Partial Nucleotide Sequence of the Laccase Gene from *Neurospora crassa*: Amino acid Sequence Homology of the Protein to Human Ceruloplasmin. *Proc Natl. Acad. Sci* **83**, 8654 (1986).
113. Kane, WH. and Davie, EW. Cloning of a cDNA Coding for Human Factor V, a Blood Coagulation Factor Homologous to Factor VIII and Ceruloplasmin. *Proc Natl. Acad. Sci* **83**, 6800 (1986).
114. Church, WR., Jemigan, RL., Toole, J. *et al.* Coagulation Factors V and VIII and Ceruloplasmin Constitute a Family of Structurally Related Proteins. *Proc Natl. Acad. Sci* **81**, 6934 (1984).
115. Thomas, T. and Schreiber, G. The Expression of Genes Coding for Positive Acute-Phase Proteins in the Reproductive Tract of the Female Rat. *FEBS Lett* **243**, 381 (1989).
116. Aldred, AR., Grimes, A., Schreiber, G. and Mercer, JFB. Rat Ceruloplasmin. *J Biol. Chem* **262**, 2875 (1987).
117. Young, SN. and Curzon, G. A Method for Obtaining Linear Reciprocal Plots with Caeruloplasmin and its Application in a Study of the Kinetic Parameters of Caeruloplasmin Substrates. *Biochem J* **129**, 273 (1972).
118. Gunnarsson, PO., Nylén, U. and Pettersson, G. Kinetics of the Interaction between Ceruloplasmin and Reducing Substrates. *Eur J Biochem* **37**, 41 (1973).
119. Saenko, EL., Siverina, OB. and Basevich, VV. Kinetic Study of Oxidase Reaction of Ceruloplasmin. *Biokhimiya* **61**, 876 (1986).
120. Pettersson, G. Electronic Characteristics of Substrates for Ceruloplasmin. *Acta Chem Scand* **24**, 1838 (1970).
121. Levine, WG. and Pelsach, J. Studies on the Substrate Specificity of Ceruloplasmin. *Biochim Biophys Acta* **63**, 526 (1962).

123. Levine, WG. and Pelsach, J. Ethylenediaminetetraacetate, Iron and Ceruloplasmin Activity. *Biochim Biophys Acta* **77**, 802 (1983).
124. Pelsach, J. and Levine, WG. On the Mechanism of Ceruloplasmin-Catalyzed Oxidations. *Biochim Biophys Acta* **77**, 815 (1983).
125. Paulsson, LE. and Pettersson, G. Stability of Oxidation Products of Dimethyl-p-phenylenediamine. *Acta Chem Scand* **23**, 2727 (1969).
126. Pettersson, G. A Model for the Ceruloplasmin Catalyzed Oxidation of Dimethyl-p-phenylenediamine. *Acta Chem Scand* **23**, 2317 (1969).
127. Rice, EW. Standardization of Ceruloplasmin Activity in Terms of International Enzyme Units. *Anal Biochem* **3**, 452 (1962).
128. Siverina, OB., Basevich, VV. and Yaropolov, AI. Influence of pH on the Oxidase Activity of Ceruloplasmin. *Biochimiya* **52**, 232 (1987).
129. Gunnarsson, PO. and Pettersson, G. Inhibition of Ceruloplasmin by Unsaturated and Aromatic Carboxylic Acids. *Eur J Biochem* **27**, 564 (1972).
130. Kelleher, CA. and Mason, J. Reversible Inhibition of Ovine Ceruloplasmin by Thiomolybdates. *Int. J Biochem* **18**, 629 (1986).
131. Winyard, PG., Hider, RC., Brallsford, S. *et al.* Effects of Oxidative Stress on Some Physicochemical Properties of Ceruloplasmin. *Biochem J* **258**, 435 (1989).
132. Lovstad, RA. Interaction of Neocuproine, 1-10-Phenanthroline and 2,2'-Dipyridyl with Human Ceruloplasmin. *Int. J Biochem* **20**, 117 (1988).
133. Lovstad, RA. Interaction of Promazine with Human Ceruloplasmin. *Int. J Biochem* **19**, 649 (1987).
134. Barrass, BC. and Coult, DB. Effects of Some Centrally Acting Drugs on Ceruloplasmin. *Prog Brain Res* **36**, 97 (1972).
135. Osaki, S., McDermott, JA. and Frieden, E. Proof for the Ascorbate Oxidase Activity of Ceruloplasmin. *J Biol. Chem* **239**, 3570 (1964).
136. Harris, ED. and DiSilvestro, RA. Correlation of Lysyl Oxidase Activation with the p-Phenylenediamine Oxidase Activity (Ceruloplasmin) in Serum. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.* **168**, 528 (1981).
137. DiSilvestro, RA., Barber, EF., David, EA. and Cousins, RJ. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Rat Ceruloplasmin. *Biol. Trace Element Res* **17**, 1 (1988).
138. DiSilvestro, RA. and David, EA. Enzyme Immunoassay for Ceruloplasmin: Application to Cancer Patient Serum. *Clin Chim Acta* **158**, 287 (1986).
139. Kim, YS. and Coms, GF. Measurement of Ceruloplasmin in Chick Plasma by α -Dianisidine Oxidation. *Nutr Res* **8**, 379 (1988).

140. Out, TA., Jansen, HM., van Steenwijk, RP., de Nooljer, MJ., van de Graaf, EA. and Zuilderhoudt, FMJ. ELISA of Ceruloplasmin and Alpha 2-Macroglobulin in Paired Bronchoalveolar Lavage Fluid and Serum Samples. *Clin Chim Acta* 165, 277 (1987).
141. Curzon, G. and O'Reilly, S. A Coupled Iron-Ceruloplasmin Oxidation System. *Biochem Biophys Res Commun* 2, 284 (1960).
142. Osaki, S., Johnson, DA. and Frieden, E. The Possible Significance of the Ferrous Oxidase Activity in Normal Human Serum. *J Biol. Chem* 62 241, 2748 (1966).
143. Levine, WG. and Pelsach, J. Mechanism of Iron Stimulation of the Enzymatic Activity of Ceruloplasmin. *Nature* 207, 406 (1965).
144. McDermott, JA., Huber, CT., Osaki, S. and Frieden, E. Role of Iron in the Oxidase Activity of Ceruloplasmin. *Biochim Biophys Acta* 151, 541 (1968).
145. Osaki, S. and Johnson, DA. Mobilization of Liver Iron by Ferroxidase (Ceruloplasmin). *J Biol. Chem* 244, 5757 (1969).
146. Ragan, HA., Nacht, S., Lee, GR. et al. Effect of Ceruloplasmin on Plasma Iron in Copper-Deficient Swine. *Am J Physiol* 217, 1320 (1969).
147. Roeser, HP., Lee, GR., Nacht, S. and Cartwright, GE. The Role of Ceruloplasmin in Iron Metabolism. *J Clin Invest* 49, 2408 (1970).
148. Osaki, S., Johnson, M. and Frieden, E. The Mobilization of Iron from the Perfused Mammalian Liver by a Serum Copper Enzyme, Ferroxidase I. *J Biol. Chem* 246, 3018 (1971).
149. Mareschal, JC., Rama, R. and Crichton, RR. The Role of Ceruloplasmin in Fe(III)-Transferrin Formation In Vitro. *FEBS Lett* 110, 268 (1980).
150. Chidambaram, MV., Barnes, G. and Frieden, E. Ceruloplasmin and the Reactions Forming Diferric Transferrin. *FEBS Lett* 159, 137 (1983).
151. Beaumier, DL., Caldwell, MA. and Holbein, BE. Inflammation Triggers Hypoferremia and De Novo Synthesis of Serum Transferrin and Ceruloplasmin in Mice. *Infect Immun* 46, 489 (1984).
152. Roeser, HP., Lee, GR. and Cartwright, GE. Role of Ceruloplasmin (Plasma Ferroxidase) in Hypoferremia Associated with Chronic Inflammation and Endotoxin. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.* 142, 1155 (1973).
153. Gamier, A., Tosi, L. and Steinbuch, M. Ferroxidase II. The Essential Role of Copper in Enzymatic Activity. *Biochem Biophys Res Commun* 98, 68 (1981).
154. Cousins, RJ. Absorption, Transport, and Hepatic Metabolism of Copper and Zinc: Special Reference to Metallothionein and Ceruloplasmin. *Physiol Rev* 65, 238 (1985).
155. Al-Timimi, DJ. and Dormandy, TL. The Inhibition of Lipid Autoxidation by Human Ceruloplasmin. *Biochem J* 168, 283 (1977).
156. Goldstein, IM., Kaplan, HB., Edelson, HS. and Weissmann, G. Ceruloplasmin. A Scavenger of Superoxide Anion Radicals. *J Biol Chem* 254, 4040 (1979).

157. Gutteridge, JM., Richmond, R. and Halliwell, B. Oxygen Free-Radicals and Lipid Peroxidation: Inhibition by the Protein Ceruloplasmin. *FEBS Lett* **112**, 269 (1980).
158. Gutteridge, JMC. Antioxidant Properties of Ceruloplasmin Towards Iron- and Copper-Dependent oxygen Radical Formation. *FEBS Lett* **157**, 37 (1983).
159. Halliwell, B., Arooma, OI., Wasil, M. and Gutteridge, JMC. The Resistance of Transferrin, Lactoferrin and Ceruloplasmin to Oxidative Damage. *Biochem J* **256**, 311 (1988).
160. Caffrey, JM., Shinn, RE. and Freiden, E. Electron Transfer Between Heme Proteins and Ceruloplasmin. *Biochem Biophys Res Commun* **159**, 482 (1989).
161. Samokyszyn, VM., Miller, DM., Reif, DW. and Aust, SD. Inhibition of Superoxide and Ferritin-dependent Lipid Peroxidation by Ceruloplasmin. *J Biol. Chem* **264**, 21 (1989).
162. Vasilev, VB., Kachurin, AM. and Soroka, NV. Dismutation of Superoxide Radicals by Ceruloplasmin: Details of the Mechanism. *Biokhimiya* **63**, 2051 (1988).
163. Lovstad, RA. Catecholamine Stimulation of Copper Dependent Haemolysis: Protective Action of Superoxide Dismutase, Catalase, Hydroxyl Radical Scavengers and Serum Proteins (Ceruloplasmin, Albumin and Apotransferrin). *Acta Pharmacol et Toxicol* **54**, 340 (1984).
164. Saenko, EL., Skorobogat, OV. and Yaropolov, AI. The Protective Effect of Normal and Pathological (Wilson Disease) Ceruloplasmins on Human Erythrocytes. *Biochem Internat* **20**, 463 (1990).
165. Lovstad, RA. Copper Catalyzed Oxidation of Ascorbate (Vitamin C). Inhibitory Effect of Catalase, Superoxide Dismutase, Serum Proteins (Ceruloplasmin, Albumin, Apotransferrin) and Amino Acids. *Int. J Biochem* **19**, 309 (1987).
166. Lovstad, RA. Fatty Acid Induced Hemolysis. Protective Action of Ceruloplasmin, Albumins, Thiols and Vitamin C. *Int. J Biochem* **18**, 771 (1986).
167. Cousins, RJ. and Swerdel, MR. Ceruloplasmin and Metallothionein Induction by Zinc and 13-cis-Retinoic Acid in Rats with Adjuvant Inflammation. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.* **179**, 168 (1985).
168. Sternlieb, I., Morell, AG., Tucker, WD. et al. The Incorporation of Copper into Ceruloplasmin in Vivo: Studies with Copper⁶⁴ and Copper⁶⁷. *J Clin Invest* **40**, 1834 (1961).
169. Hsieh, HS. and Frieden E. Evidence for Ceruloplasmin as a Copper Transport Protein. *Biochem Biophys Res Commun* **67**, 1328 (1975).
170. Laurie, SH. and Pratt, DE. Copper-Albumin: What is its Functional Role? *Biochem Biophys Res Commun* **135**, 1064 (1986).
171. Schechinger, T., Hartmann, HJ. and Weser, U. Copper Transport from Cu(I)-thionein Into Apoceruloplasmin Mediated by Activated Leucocytes. *Biochem J* **240**, 281 (1988).
172. Orens, SJ., Goode, CA. and Linder, MC. Binding and Uptake of Copper from Ceruloplasmin. *Biochem Biophys Res Commun* **139**, 822 (1986).
173. Percival, SS. and Harris, ED. Copper Transport from Ceruloplasmin: Characterization of the Cellular Uptake Mechanism. *Am J Physiol* **258**, C140 (1990).

174. Campbell, CH., Brown, R. and Linder, MC. Circulating Ceruloplasmin is an Important Source of Copper for Normal and Malignant Animal Cells. *Biochim Biophys Acta* **678**, 27 (1981).
175. Darwish, HM., Cheney, JC., Schmitt, R. and Ettinger, MJ. Mobilization of Copper(II) from Plasma Components and Mechanism of Hepatic Copper Transport. *Am J Physiol* **246**, G72 (1984).
176. Semsel, I. Effects of Age and Turpentine-Induced Inflammation on the Activity of Ceruloplasmin from Blood of CFY Rats. *Gerontology* **37**, 199 (1991).
177. Weiner, AL. and Cousins, RJ. Hormonally Produced Changes in Ceruloplasmin Synthesis and Secretion in Primary Cultured Rat Hepatocytes. *Biochem J* **212**, 297 (1983).
178. Ferrari, RP., Paradisi, L. and Torielli, M. Changes of Serum Iron Transferrin and Copper Ceruloplasmin in Rats Given Cu(II)₂ (Acetylsalicylate)₄ During Acute Inflammation. *Anticancer Res* **9**, 771 (1989).
179. Sugawara, N. and Sugawara, C. Relationship Between Ceruloplasmin and Cu Status Involving Metallothionein Induced by Several Heavy Metals in the Mouse. *Arch Toxicol* **59**, 432 (1987).
180. DiSilvestro, RA. Influence of Dietary Copper, Copper Injections and Inflammation on Rat Serum Ceruloplasmin Activity Levels. *Nutr Res* **10**, 355 (1990).
181. DiSilvestro, RA. Effects of Ascorbic Acid and Inflammation on Ceruloplasmin Activity Levels in Guinea Pigs. *Nutr Res* **6**, 1009 (1986).
182. Barber, EF. and Cousins, RJ. Induction of Ceruloplasmin Synthesis by Retinoic Acid in Rats: Influence of Dietary Copper and Vitamin A Status. *J Nutr* **117**, 1615 (1987).
183. Jacob, RA., Skala, JH., Omaye, ST. and Tumlund, JR. Effect of Varying Ascorbic Acid Intakes on Copper Absorption and Ceruloplasmin Levels of Young Men. *J Nutr* **117**, 2109 (1987).
184. Dowdy, RP. and Dohm, GL. Effect of Training and Exercise on Serum Ceruloplasmin in Rat. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.* **139**, 489 (1972).
185. Barber, EF. and Cousins, RJ. Interleukin-1-Stimulated Induction of Ceruloplasmin Synthesis in Normal and Copper-Deficient Rats. *J Nutr* **116**, 375 (1988).
186. Pekarek, RS., Powanda, MC. and Wannemacher, RW. The Effect of Leukocytic Endogenous Mediator (LEM) on Serum Copper and Ceruloplasmin Concentration in the Rat. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.* **141**, 1029 (1972).
187. DiSilvestro, RA. Plasma Levels of Immunoreactive Ceruloplasmin and Other Acute Phase Proteins During Lactation. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.* **183**, 257 (1986).
188. Czaja, MJ., Weiner, FR., Schwarzenberg, SJ. et al. Molecular Studies of Ceruloplasmin Deficiency in Wilson's Disease. *J Clin Invest* **80**, 1200 (1987).
189. Fong-Fong Chu and Olden, K. The Expression of Ceruloplasmin, an Angiogenic Glycoprotein, by Mouse Embryonic Fibroblasts. *Biochem Biophys Res Comm.* **126**, 15 (1985).
190. Nelfakh, SA., Gaitskhoki, VS., Denezhkina, VV., Puchkova, LV. and Timchenko, LT. Comparative Study of Ceruloplasmin Biosynthesis in Various Cell-Free Systems. *Biochimiya* **52**, 30 (1987).

191. Kunapuli, SP., Singh, H., Singh, P. and Kumar, A. Ceruloplasmin Gene Expression in Human Cancer Cells. *Life Sci* 40, 2225 (1987).
192. Del Principe, D., Menichelli, A. and Colistra, C. The Ceruloplasmin and Transferrin System in Cerebrospinal Fluid of Acute Leukemia Patients. *Acta Paediatr Scand* 78, 327 (1989).
193. Galdston, M., Levytska, V., Schwartz, MS. and Magnúson, B. Increased Serum Concentration and Impaired Antioxidant Activity in Cigarette Smokers, and Ability to Prevent Suppression of Elastase Inhibitory Capacity of Alpha₁-Proteinase Inhibitor. *Am Rev Respir Dis* 129, 258 (1984).
194. Pacht, ER. and Davis, WB. Failure of High-Dose Vitamin E to Correct Ceruloplasmin Ferroxidase Deficiency in Cigarette Smokers. *Am Rev Respir Dis* 142, 1063 (1990).
195. Dogan, P., Soyuer, Ü. and Tanrikulu, G. Superoxide Dismutase and Myeloperoxidase Activity in Polymorphonuclear Leukocytes, and Serum Ceruloplasmin and Copper Levels, in Psoriasis. *Brit J Dermatol* 120, 239 (1989).
196. Ono, T., Abe, S. and Yoshida, MC. Hereditary Low Level of Plasma Ceruloplasmin in LEC Rats Associated with Spontaneous Development of Hepatitis and Liver Cancer. *Jpn J Cancer Res* 82, 488 (1991).
197. Mainero, A., Cruz, C. and Pedraza-Chaverri, J. Serum and Urinary Ceruloplasmin in Experimental Nephrotic Syndrome. *Clin Invest Med.* 15, 295 (1992).
198. Martínez-Medellín, J., Valdés López, V., Alba Lois, L., Beceril, B., Mayani, H. and Mainero, A. A Study of Erythropoiesis and Iron Metabolism in the Rabbit *in vivo*. I. Characterization and Limits of the Physiological Response. *Arch Invest Med.* 22, 309 (1991).
199. Mayani, H., Alba Lois, L. and Martínez Medellín, J. Rabbit Erythropoiesis During Recovery from Chronic Anaemia Induced by Bleeding. *Arch Invest Med.* 22, 317 (1991).
200. Velázquez Ocampo, MP. *Estudio sobre la Ceruloplasmina y su Posible Papel en el Metabolismo del Hierro de Conejos Hechos Anémicos por Sangrado*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, U.N.A.M. (1984).
201. Brewer, JM., Pesce, AJ. and Ashworth, RB. *Experimental Techniques in Biochemistry*. Prentice-Hall. New Jersey (1974) p 328.
202. Laemmli, UK. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 (1970).
203. Gabriel, O. Analytical Disk Gel Electrophoresis. *Meth Enzymol* XXII, 565 (1979).
204. Shade, AL., Oyama, J., Renhart, RW., Miller RL. Bound Iron an unsaturated iron-binding capacity of serum; rapid and reliable quantitative determination. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.* 87, 443 (1954).
205. Mancini, G., Carbonara, AO. and Heremans, JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2, 235 (1965).
206. Curzon, G. Some properties of coupled iron-ceruloplasmin oxidation systems. *Biochem J* 79, 656 (1961).

208. Huber, C. *et al* The inhibition of ferroxidase by trivalent and other metal ions. *J Biol. Chem* **245**, 3879 (1970).
209. Lovstad, R. A comparative study of the two different activities of ceruloplasmin in human sera. *Eur J Biochem* **8**, 303 (1969).
210. Zar, JH. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall Inc. New Jersey. (1984).
211. Alba Lois, L, Malnero, A., Valdés, V., Benavides, L. and Martínez Medellín, J. Erythropoiesis and iron metabolism: their study in an *in vivo* system in the rabbit. II. Dependence of the response on iron storage and transport. *Arch Med. Res* **23**, 7 (1992).
212. Gillin, JD, Schroeder, JJ, Lee-Ambrose, LM and Cousins, RJ. Mechanisms of caeruloplasmin biosynthesis in normal and copper-deficient rats. *Biochem J* **282**, 835 (1992).
213. Pinheiro, FS, Jorge, SM and Martínez, FE. Plasma zinc and copper levels in maternal, placental intervillous space and cord blood. *Nutr Res* **12**, 387 (1992).
214. Valdés López, VM. *Estudios sobre la dinámica de formación de la sangre en conejos hechos anémicos por sangrado*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, U.N.A.M. (1977).
215. Garduño Espinosa, J, Paniagua Sierra, R, Díaz Bensussen, S. and A. Lifshitz. Response of serum zinc and copper to inflammatory stimulation in the rat with chronic liver damage. *Arch Invest Med.* **22**, 289 (1992).
216. Martínez Medellín, J *et al*. *Studies on the role of transferrin in rabbit erythropoiesis* en: The Biochemistry and Physiology of Iron. Eds. P. Saltman and J. Hegener. Elsevier North Holland. New York p.239 (1982).
217. Rydén, LG and Hunt, LT. Evolution of protein complexity: the blue copper-containing oxidases and related proteins. *J Mol Evol* **36**, 41 (1993).