

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

*Determinación de enzimas hepáticas
en mujeres usuarias y no usuarias
del DIU TCu 380A*

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

MARTHA GUADALUPE HERNÁNDEZ CANTORAL

**DIRECTORA:
C.D. DOLORES DE LA CRUZ CARDOSO**

**ASESOR:
DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA**

JUNIO, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“ Cuando hacemos lo mejor que podemos, nunca sabemos qué milagro se produce en nuestra vida o en la de otros ”

Helen Keller

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la oportunidad de vivir y por haberme puesto en este camino.

A todas aquellas personas que hicieron posible este sueño profesional en mi vida, en especial a la institución formativa, a mi familia, maestros y amigos, por todo su estímulo, sabiendo que no existirá una forma de agradecer una vida de sacrificio y esfuerzo, quiero que sientan que el objetivo logrado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudo a conseguirlo fue su apoyo.

A todos ustedes... Gracias

DEDICATORIA

Dedico la presente:

A mis padres Héctor y Martha por su gran amor, sus consejos y su fe que pusieron en mí...

A mis hermanos y hermanas que fueron un soporte para vivir y seguir...

A Marco Alberto por su amor y compañía que me ha brindado en todo momento...

A Dolores De la Cruz, por su amistad, enseñanza y fuerza espiritual que me dedico incondicionalmente y a quien le tengo una gran admiración...

A Rubén Marroquín y Horacio Tovalín, por ser como son y que gracias a su confianza, y ayuda, se pudo realizar este sueño.

A Fabiola, Dora, Maurilio, Yolanda y Silvia, que me aceptaron como miembro de su familia y me apoyaron en todo lo que pudieron...

A mis amigos (Irma, Bere, Bety, Noemí, Lalo, Karina, Ivonne, Nadia, Gonzalo, Marcos, Rogelio, Amalia, Nancy) que han estado en las buenas y las malas, sin importar mis errores y aun creen en mí...

A todas las mujeres, principalmente a las que participaron en la realización de este trabajo.

A todos los que me apoyaron en cualquier situación y que pude haber olvidado en estos momentos, a todos ustedes... gracias "Que Dios los Bendiga".

ÍNDICE

	Pag.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Dispositivo Intrauterino T de cobre 380A (DIU TCu380A o DIU)	3
2.2. Metabolismo del cobre	4
2.3. Hígado	12
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
IV. OBJETIVOS	17
4.1. Objetivo general	17
4.2. Objetivos específicos	17
V. HIPÓTESIS	18
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL	19
6.1. Población de estudio	19
6.2. Criterios de inclusión	19
6.3. Criterios de exclusión	19
6.4. Variables	20
6.5. Material	20
6.6. Método	22
6.7. Diagrama de Flujo	29
6.8. Diseño Estadístico	30

VII.	RESULTADOS	31
	7.1. Cobre en suero	33
	7.2. Enzimas hepáticas	34
	7.3. Concentración de las enzimas hepáticas ALT, AST y GGT de acuerdo al tiempo de uso del DIU TCu380A	36
	7.4. Ceruloplasmina	40
	7.5. Proteína C Reactiva	42
	7.6. Correlación de los resultados obtenidos	43
VIII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	50
	8.1. Población	50
	8.2. Cobre en suero	50
	8.3. Enzimas hepáticas	52
	8.4. Ceruloplasmina	53
	8.5. Proteína C reactiva	55
	8.6. Correlación	57
IX.	CONCLUSIONES	60
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	61
XI.	ANEXOS	69
	11.1. Cuestionario para la inclusión de donadoras	69
	11.2. Obtención de anticuerpos en conejo para ceruloplasmina humana	71

I. INTRODUCCIÓN

En nuestro país, el Dispositivo Intrauterino T de cobre 380A (DIU TCU380A) es uno de los métodos anticonceptivos más utilizados y disponibles en todas las instituciones de salud, sobre todo de tipo público y es utilizado por mujeres en un rango de edad entre 18 y 40 años abarcando un gran porcentaje de la población. El uso de este tipo de método se difunde en los medios masivos de comunicación como uno de los métodos de control natal más eficaces y seguros, con un 99% de efectividad. ⁽¹⁾

La mayoría de los estudios realizados acerca de la toxicidad del cobre en relación con alteraciones hepáticas, han sido de tipo experimental y realizado en animales encontrándose una marcada elevación de enzimas específicas en sangre, tales como: Sorbitol Deshidrogenasa (SDH), Alanina amino transferasa (ALT), Aspartato amino transferasa (AST) y Gama Glutamil Transferasa (GGT). ^(2,3,4,5)

La presente investigación tuvo el objetivo de determinar si las mujeres que utilizaban este método anticonceptivo (DIU TCU380A) presentaban daño en hígado, ya que de acuerdo a investigaciones realizadas, este dispositivo induce concentraciones elevadas de cobre en sangre; ⁽⁶⁾ lo cual puede estimular la generación de algún signo de toxicidad, o una adaptación sistémica a la exposición crónica del elemento.

En el estudio participaron 40 mujeres usuarias y 40 no usuarias del DIU TCU380A, clínicamente sanas, sin antecedentes de padecimientos hepáticos, ingesta de complementos con Cu o consumo excesivo de alcohol. Su edad promedio fue de 28 años (± 6), su IMC de 23.05 y el tiempo de uso del DIU de 1 hasta 109 meses.

Después de proporcionarles información sobre el estudio, todas las interesadas firmaron una carta de consentimiento. Las participantes proporcionaron una muestra de sangre, de la

Conclusiones

que se determinó en suero los siguientes indicadores de daño hepático: ALT, AST, GGT y Proteína C reactiva (PCR); así mismo, se les determinó Ceruloplasmina (Cp) por el método de inmunodifusión radial en placa, por lo que fue necesario obtener primeramente anticuerpos anti-ceruloplasmina humana. ^(7,8,9) También se determinó cobre (Cu) por Espectrofotometría de absorción atómica.

Las concentraciones obtenidas de AST, ALT, GGT, PCR, Cp y Cu, resultaron mayores en las mujeres usuarias del DIU TCu380A, siendo estos estadísticamente significativos ($P < 0.05$).

El tiempo de uso del dispositivo mostró un incremento de las enzimas ALT, AST y GGT, a partir de los 37 meses de uso, las concentraciones resultaron por arriba de los de referencia.

En el caso de ceruloplasmina el tiempo no fue significativo, las concentraciones se presentaron análogas desde la inserción del DIU hasta los 109 meses de su colocación. Estas concentraciones fueron mayores que los valores de referencia ya establecidos.

Con respecto a PCR, solo se presentó en las mujeres usuarias del DIU de 1 a 36 meses de uso, en los demás periodos no se encontraron valores de la proteína.

Todos estos resultados muestran que el cobre liberado por el DIU provoca una alteración de las enzimas hepáticas, por lo que a largo plazo del uso del DIU se puede producir daño en hígado.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Dispositivo Intrauterino T de cobre 380A (DIU TCU380A o DIU)

El DIU TCU380A es el método anticonceptivo temporal moderno de uso más generalizado en todo el mundo (100 millones de usuarias). Se afirma que el número de usuarias del DIU aumentará en un 25% ó más el próximo decenio. ⁽¹⁾ Los DIU logran su efecto anticonceptivo principal al interferir con la motilidad y la supervivencia de los espermatozoides para prevenir la fertilización. Rara vez, cuando la fertilización ocurre, los DIU también pueden prevenir la implantación. ⁽¹⁰⁾

2.1.1. Tipos de Dispositivos más utilizados ⁽¹⁰⁾

- TCU 380A de cobre: Disponible en aproximadamente 70 países, tiene 380 milímetros cuadrados de cobre, distribuidos en el cuerpo y los brazos de la T, su tiempo eficaz es de 5-10 años.
- Multiload 375: Disponible alrededor de 50 países, contienen brazos en forma de herradura que teóricamente lo hacen resistente a la expulsión. Cinco años de uso eficaz.
- Nova T: Disponible en aproximadamente 60 países. Brazos horizontales y asa en el extremo inferior que facilita la extracción. Cinco años de uso eficaz.
- Mirena y Levonova: Disponible en 6 países. Liberan la hormona progestina sintética levonorgestrel, 20 microgramos diarios. Es tan eficaz como los DIU de cobre y el efecto secundario de sangrado es menor. Cinco años de uso eficaz.

Todo DIU produce una reacción endometrial que estimula la liberación de leucocitos y sustancias de acción local, llamadas prostaglandinas. Éstas actúan simultáneamente en el

cuello uterino, la cavidad uterina y el oviducto, para impedir que el espermatozoide fertilice al óvulo. El cobre presente en los DIU también tiene efectos espermicidas. Los estudios realizados con mujeres que usaban DIU de cobre han demostrado la presencia de un número reducido de espermatozoides después del coito, comparado con el de las no usuarias. El cobre tiene un alto grado de eficacia anticonceptiva, según afirma Sivin, del Population Council, que elaboró el DIU TCU380A: "Sabemos que el DIU inerte interfiere con el transporte de los espermatozoides", afirma "Pero el cobre interfiere en mayor medida. Y cuanto más cobre se use, mayor será el grado de interrupción".⁽¹¹⁾

Se recomienda que no se inserte el DIU si hay indicios de enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), flujo vaginal anormal o infección cervicouterina o vaginal. Si la usuaria tiene una enfermedad de transmisión sexual (ETS) pero ya no corre riesgo de contraer una nueva infección, la infección debe tratarse y cuando ésta haya desaparecido se podrá insertar el DIU.⁽¹¹⁾

No se recomienda a mujeres que tienen infecciones por VIH, embarazadas, con cáncer cervicouterino, infección del post-parto o del aborto, anemia por deficiencia de hierro, anemia falciforme y sangrado vaginal no explicado.⁽¹²⁾ En las mujeres que padecen, hipertensión arterial, enfermedades cardíacas, respiratorias, diabetes mellitus, o alguna otra alteración metabólica, no hay ningún inconveniente con el uso del DIU.⁽¹³⁾ Para poder explicar la acción del cobre no sólo en el ámbito local de la vagina como anticonceptivo; sino como elemento de concentración plasmática, es necesario dar a conocer algunas características de este elemento.

2.2. Metabolismo del cobre

El cobre es un constituyente normal de la dieta y está considerado como un elemento esencial para la vida humana. La principal función del cobre es a modo de componente integral de una gran variedad de enzimas, la mayoría de las cuales están involucradas en procesos de óxido-reducción, tales como la ceruloplasmina y la superóxido dismutasa.⁽¹⁴⁾ Así mismo, está involucrado en procesos hematopoyéticos y metabólicos como el del

hierro o asociados al sistema cardiovascular; también está vinculado a la formación de tejido conjuntivo y a la producción de energía. ⁽¹⁵⁾

La homeostasis del cobre es generalmente mantenida por controles en la absorción intestinal, excreción biliar y el almacenamiento intrahepático. ⁽¹⁶⁾

No obstante, dependiendo de la dosis, de la intensidad y la duración de la exposición al mencionado elemento, puede provocar daños a la salud humana por lo que está considerado como un elemento tóxico. ⁽¹⁵⁾

El cobre que tenemos en nuestro organismo proviene principalmente de la ingesta. Se absorbe a nivel del duodeno y yeyuno por transporte activo. Su absorción se ve favorecida por ciertos aminoácidos como la histidina. ⁽¹⁷⁾ Así mismo, diversos elementos pueden interferir en este proceso, tales como la presencia de cadmio, hierro, zinc y el consumo de fibra, de tal manera, que sólo se absorbe en un porcentaje del 35 al 70% de lo que se ingiere. ⁽¹⁸⁾

El cobre absorbido se incorpora a la ceruloplasmina plasmática. El resto se une a la albúmina, transcupreína y otras proteínas plasmáticas. ⁽¹⁹⁾

El cobre es transportado al hígado a través de la vena porta. En los hepatocitos, el cobre es captado por las metalotioneínas para su almacenamiento y se incorpora a varias cuproenzimas. Las metalotioneínas cargadas de cobre son almacenadas en los lisosomas de los hepatocitos, evitando de esta manera la toxicidad propia del metal libre ionizado. Cuando es necesitado, el cobre es de nuevo incorporado a la ceruloplasmina y excretado al plasma. El transporte del cobre en todos estos procesos se realiza gracias a unas proteínas especializadas denominadas chaperonas cúpricas y por varias ATP-asas cuprodependientes o proteínas de Menkes. El cobre en exceso es eliminado por vía biliar y excretado en las heces. ⁽²⁰⁾

También se observan concentraciones de cobre elevadas en los pacientes con infecciones agudas o crónicas, enfermedades hepáticas. Además, cualquier enfermedad que interfiera con la eliminación biliar puede ocasionar un aumento de las concentraciones hepáticas de cobre.⁽²¹⁾

2.2.1. Enzimas dependientes del cobre

El cobre es un componente de muchas enzimas, atribuyéndose muchas de las manifestaciones clínicas de la deficiencia de cobre al fallo de estas enzimas. El cobre en la ceruloplasmina juega un papel importante en la oxidación del hierro antes de que este sea transportado al plasma. La lisil-oxidasa, una enzima que contiene cobre, es esencial para las reacciones de entrecruzamiento del colágeno y de la elastina. También participa en la superóxido dismutasa y en otras enzimas en las que su papel no es todavía bien conocido.⁽²²⁾ Otras enzimas importantes en las que se encuentra presente el cobre son la dopamina b-monooxigenasa, una enzima implicada en la síntesis de las catecolaminas y en la peptidil-a-amida-monooxigenasa que modifica los neurotransmisores peptídicos (Cuadro1).⁽²³⁾

Cuadro 1. Cobre asociado a algunas enzimas y proteínas

Intracelulares	Extracelulares
Citocromo C oxidasa	Ceruloplasmina
Superóxido dismutasa	Lisil oxidasa
Dopamina-β-monooxigenasa/hidroxilasa	Albúmina
Tirosinasa	Transcupreína
Enzima alfa-Amidación	Amino oxidasa
Fenilalanina hidroxilasa	Superóxido dismutasa extracelular
Diamino oxidasa	Metalotioneína extracelular
Glicoproteína de matriz del cartílago	Factores V y VIII de la coagulación
Metalotioneína	Ferroxidasa II

Fuente: Pandit A, 2003⁽²³⁾

2.2.2. Proteínas Transportadoras de Cobre en el Plasma

El Cu esta siempre unido a proteínas en los sistemas biológicos. En mamíferos, se ha estimado que sobre el 90% del Cu incorporado a través de la dieta está unido a ceruloplasmina (Cp) luego de pasar por la circulación portal. ⁽²⁴⁾

La Cp pertenece a la familia de las oxidasas con múltiples átomos de Cu. Esta proteína de 132 kDa presenta 6 sitios de unión a Cu. El estudio de la estructura de la enzima humana mostró que tres de los átomos de Cu están en un arreglo “trinuclear”, los otros 3 en un arreglo “mononuclear” y hay otros dos sitios de unión a Cu que son lábiles, y están ocupados el 50% de tiempo. ⁽²⁵⁾

Su estructura es muy similar a la Fet3, una oxidasa de levaduras con múltiples átomos de Cu que es esencial para la absorción de alta afinidad de Fe. ⁽²⁶⁾

Dada la alta abundancia de Cp en el suero, y su alto contenido de Cu, varios investigadores han propuesto a esta proteína como la principal fuente de Cu celular. Sin embargo, la biodisponibilidad del Cu que contiene Cp es controversial. Linder y cols, (1998), sostienen que el Cu radiactivo que se incorpora por la dieta es unido inicialmente a moléculas como la albúmina y la transcureína y que en una segunda fase, luego de pasar por el hígado, más del 90% esta unido a Cp. Posteriormente, la marca radioactiva se puede encontrar distribuida en diferentes tejidos. El 10% restante del Cu no unido a Cp está unido a otras proteínas o aminoácidos principalmente albúmina, transcureína o histidina. ⁽²⁴⁾

Estudios en cultivos primarios de hepatocitos muestran que la absorción de Cu en presencia de histidina es mayor a la absorción de Cu solo o en presencia de albúmina. ^(27,28)

El contenido de Cu en el plasma es de 15 a 20 μM , del cual un 60-90% está asociado a ceruloplasmina. ⁽²⁹⁾

La disponibilidad del Cu unido a ceruloplasmina es baja debido a que la vida media del Cu unido a esta proteína es similar a la vida media de la ceruloplasmina.⁽³⁰⁾ Por tal motivo, se considera que el Cu bio-disponible es el Cu-no Cp (unido a albúmina o aminoácidos como Histidina o Glicina), el que se calcula alcanza una concentración plasmática de 1,5-5 μM .⁽³¹⁾

2.2.3. Absorción del cobre

La absorción del cobre es del orden del 30% y es disminuida por altas ingesta alimentarias de hierro, molibdeno y zinc.⁽³²⁾ Este elemento se almacena preferentemente en el hígado, riñón, músculo, corazón y cerebro.⁽³³⁾ Su deficiencia produce anemia, neutropenia y desmineralización ósea,⁽³²⁾ mientras que la ingestión en exceso es tóxica.

Es difícil cuantificar la biodisponibilidad del cobre, por lo tanto la acumulación del cobre en los tejidos, principalmente en el hígado juega un rol fundamental en el metabolismo del cobre. La absorción intestinal del cobre es muy baja (<1,0-10%).⁽³³⁾

En un estudio realizado en la Unidad Universitaria de Investigación en Cariología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM, se obtuvieron resultados que indican un incremento de Cu en sangre, en usuarias del DIU TCu380A. La media de cobre en sangre de las usuarias fue de $217 \pm 20.96 \mu\text{g/dL}$, y en las no usuarias de $107.47 \pm 16.25 \mu\text{g/dL}$.⁽⁶⁾ En este estudio no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de cobre entre los grupos con diferente tiempo de uso del DIU, ni por grupos de edad. Los valores en usuarias fueron mayores a los valores de referencia para población general de 70-140 $\mu\text{g/dL}$.⁽³⁴⁾

2.2.4. Efectos tóxicos por exposición crónica a cobre

El cobre es un elemento esencial para la vida humana, pero en dosis elevadas puede provocar anemia, irritación del estómago e intestino, daño renal y daño hepático.⁽³⁵⁾

Aunque no son frecuentes las intoxicaciones agudas por este metal, dadas sus propiedades eméticas y laxantes, se caracteriza por náuseas, vómito, dolor de cabeza y debilidad.⁽³⁶⁾

Los casos más graves cursan con taquicardia e hipertensión que pueden ir seguidas por ictericia, anemia hemolítica, uremia y muerte.⁽³⁷⁾

Un caso especial de intoxicación se produce en la enfermedad de Wilson, alteración congénita que afecta al metabolismo del cobre, en la que aparecen trastornos con la ingestión de concentraciones normales de este metal.^(32,37)

Aunque se han encontrado valores elevados de cobre, hierro y zinc en ciertos tumores provocados experimentalmente en animales de laboratorio por xenobióticos orgánicos, no ha sido demostrada la responsabilidad carcinogénica del cobre.⁽³²⁾

El Comité Mixto FAO/OMS establece la cantidad de 0,5 mg/Kg como ingestión máxima diaria admisible.⁽³⁶⁾

Tras la absorción, por vía gastrointestinal, de cantidades pequeñas pero repetidas pueden presentarse náuseas, salivación, dolor epigástrico, diarreas, vértigo, debilidad e ictericia.⁽³³⁾

También, se han observado vómitos y diarreas por consumo de té con 25 p.p.m. de cobre y se han descrito erupciones cutáneas por ingestión de agua con 7,6 p.p.m. de este metal.⁽³⁹⁾

El cuerpo contiene de 50 a 120 miligramos. No hay valor de recomendación diaria, sino un Requerimiento Diario Dietético Estimado Seguro y Adecuado (ESADDI), que establece un nivel de 1.5 a 3 mg/día.⁽³⁸⁾

La principal función del cobre es como componente integral de una gran variedad de enzimas y proteínas, la mayoría de las cuales están involucradas en procesos de óxido-reducción, encargadas de unirse y reaccionar con oxígeno molecular, para reducir el efecto perjudicial de los radicales libres. La exposición crónica a compuestos de cobre en

cantidades ligeramente más altas de las requeridas, puede causar una mayor acumulación de éste en los tejidos, que se manifiesta en cambios fisiológicos y alteraciones metabólicas en diversos órganos, tales como la tiroides, el corazón, las arterias, los riñones y el hígado, entre otros órganos. ^(16, 17, 18, 39, 40, 41)

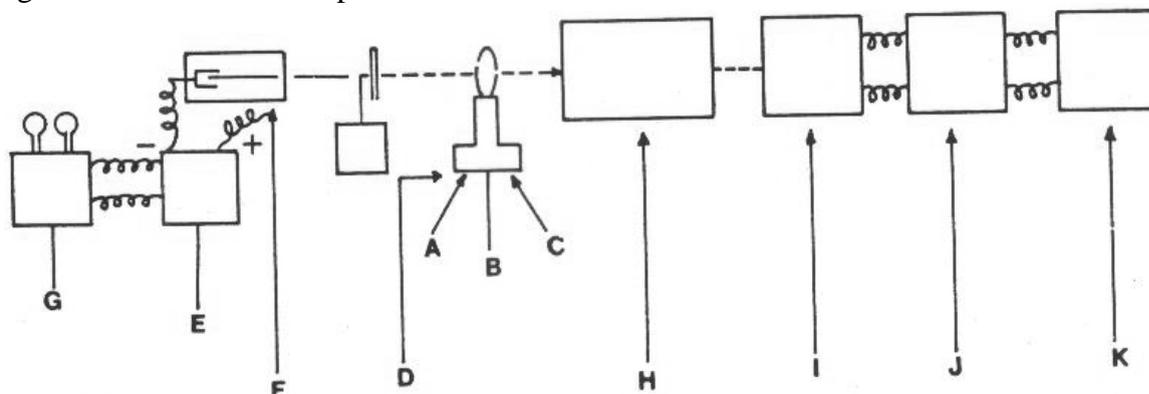
2.2.5. Métodos de medición del cobre

2.2.5.1. Espectrofotometría de absorción y emisión atómica

La espectrofotometría de absorción atómica se basa en la medición de energía absorbida o emitida por los átomos de un elemento metálico. La mayoría de las muestras son sólidas o líquidas, los átomos o iones de los analitos deben ser vaporizados a la flama o en un horno de grafito. Los átomos absorben luz visible o ultravioleta y hacen transiciones a niveles de energía más altos. La concentración del analito es determinada por la cantidad de absorción aplicando la ley de Lambert y Beer. Las mediciones de concentración son generalmente determinadas en una curva de calibración, después de haber calibrado el aparato con los estándares de concentración conocida. ⁽⁴²⁾

El equipo y reactivos que se requieren para este estudio son espectrofotómetro de absorción atómica, lámpara de cátodo hueco del elemento a determinar y gas, generalmente aire-acetileno, aire-hidrogeno u óxido nitroso-acetileno. ⁽⁴³⁾

Figura 1. Estructura del espectrofotómetro



Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 1988. ⁽⁴³⁾

- A) Sistema muestreador, sirve para introducir la muestra al quemador por medio de succión capilar.
- B) Sistema nebulizador, es en donde se lleva a cabo la nebulización de la muestra por medio de una esfera de impacto o un deflector.
- C) Quemador de acero inoxidable, es donde se lleva a cabo la atomización de la muestra.
- D) Sistema para fluido de los gases oxidante y combustible.
- E) Fuente de poder.
- F) Fuente de luz.
- G) Corrector de fondo, integrado por dos fuentes de luz, una lámpara de deuterio y otra de haluro de tungsteno, que cubren el rango espectral de absorción atómica y cuya función es eliminar las absorciones no específicas.
- H) Monocromador, selecciona la longitud de onda y el ancho de banda.
- I) Fotomultiplicador, detecta la señal producida por el elemento a determinar, con sensibilidad en un rango de 190 a 850 nm.
- J) Amplificador.
- K) Registrador, reproduce gráficamente el resultado de la operación y puede o no estar integrado al aparato.

2.2.5.2. Espectrofotometría de cobre

Se estudia espectrofotométricamente la formación del complejo amarillo formado entre el ion Cu(II) y la tiosemicarbazona del 2-carboxibenzaldehído (2CBTSC), desarrollándose un método fotométrico de determinación de cobre. El intervalo útil de trabajo del método desarrollado está comprendido entre 0,5 y 5,0 ppm del Ion Cu(II) ($\lambda_{\text{máx}} = 346 \text{ nm}$, $e = 1,2 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) con un error relativo de 1,12 % (para 3 ppm de Cu(II), $n = 11$, $p = 0,05$). Se han estudiado las interferencias de numerosos iones. La estequiometría del complejo formado resulta ser 1:1 (2CBTSC:Cu), determinado por métodos espectrofotométricos. El método se aplica al análisis de cobre en formulaciones médicas, agua potable, salvado de trigo y muestras biológicas. Se estudia la influencia de la concentración de Cu(II) en el intervalo de concentraciones de 0,1 a 6 ppm. a 346 nm. Con los datos de absorbancia a 346 nm, se comprueba el cumplimiento de la ley de Beer. El sistema obedece dicha ley

entre 0,2 y 6 ppm. La absorptividad molar a esa longitud de onda resulta ser de $1,2 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. El intervalo de concentración óptimo, evaluado por el método de Ringbom es de 0,5 a 5 ppm de Cu(II). El error relativo para 3 ppm de Cu(II) es de 1,12% para un intervalo de confianza del 95%.⁽⁴⁴⁾

2.3. Hígado

2.3.1. Anatomía

El hígado de un adulto normal, pesa entre 1400 y 1600 gramos, representa el 2.5 % del peso corporal. Recibe la sangre a través de la vena porta (60 a 70 % de flujo sanguíneo hepático) y de la arteria hepática (30 a 40 %), ambas penetran por el hilo hepático.⁽⁴⁵⁾

El parénquima de los ácinos hepáticos se divide en tres zonas: la zona 1 es la más cercana al aporte vascular, la zona 3 rodea las venas centrolobulillares terminales y la zona 2 es la zona intermedia. Esta división tiene consecuencias metabólicas considerables, ya que la actividad de muchas enzimas hepáticas muestra un gradiente lobulillar. Además, muchas formas de lesión hepática siguen también una distribución zonal.⁽⁴⁶⁾

2.3.2. Microarquitectura

El hígado se divide en lobulillos hexagonales, de 1 a 2 mm de diámetro, orientados alrededor de las ramas terminales de las venas suprahepáticas. Las células que lo conforman son llamadas hepatocitos, sin embargo cuando estos se encuentran más próximos a las venas centrolobulillares poseen menos aporte sanguíneo, por lo que se admite que estos constituyen la periferia de los "lobulillos metabólicos" denominados ácinos.⁽⁴⁶⁾

2.3.3. Función

El hígado esta situado en el cuadrante superior del abdomen, es el responsable del enorme trabajo que conlleva el mantenimiento de la homeostasis metabólica, que supone el procesamiento de los aminoácidos, carbohidratos, lípidos y vitaminas de la dieta, la síntesis de las proteínas del suero, destoxificación y excreción hacia la bilis de los productos de desechos endógenos y de las sustancias biológicas extrañas contaminantes. Por tanto, las consecuencias de las enfermedades hepáticas tienen un gran alcance.⁽⁴⁶⁾

Son muchas las agresiones de tipo metabólico, tóxico, microbiano, circulatorio y neoplásico capaces de producir lesiones hepáticas. En algunos casos, la enfermedad es primaria del hígado, como sucede con la hepatitis viral o el carcinoma hepatocelular. No obstante, con mayor frecuencia, la afectación hepática es secundaria, a menudo asociada a algunas de las enfermedades más comunes del hombre, como son la descompensación cardiaca, el cáncer diseminado, el alcoholismo o las infecciones extrahepáticas. Estas afecciones son evaluadas clínicamente por enzimas específicas de hígado denominadas transaminasas (La alanina aminotransferasa ALT y aspartato aminotransferasa AST), presentes en las células hepáticas que pasan hacia la circulación sanguínea cuando existe daño en las células. La destrucción o cambio de permeabilidad de las membranas celulares provoca la liberación de la ALT y AST a la circulación sanguínea, provocando aumento de la actividad de las enzimas en suero, esto se produce como consecuencia de alteración hepática.⁽⁴⁷⁾

Otra enzima de importancia hepática es la gamma glutamil transpeptidasa (GGT) que se encuentra en grandes cantidades en el hígado y páncreas, en menor cantidad en riñón y próstata. En el estudio de las enfermedades hepatobiliares presta una gran ayuda. Su incremento es paralelo a la fosfatasa alcalina y en caso de ictericias obstructivas, sus niveles se elevan más temprano y con mayor intensidad que la fosfatasa, lo que se debe a un mecanismo de inducción enzimático a nivel microsómico, más que a lesión hepática. Esta enzima es considerada como el termómetro del alcohólico o de daño hepático crónico activo por la pérdida de la función antitóxica del hígado. La determinación de estas enzimas adquiere importancia diagnóstica cuando sus valores se comparan con los de otras

enzimas de similar origen tisular, permitiendo así completar el perfil enzimático de órganos como el hígado. ^(45, 46, 47)

En el hígado se sintetiza una gran cantidad de proteínas, de las cuales la Proteína C Reactiva (PCR) es de gran importancia clínica ya que esta se encuentra en sangre periférica en personas que sufren trastornos inflamatorios. Su presencia se determina mediante aglutinación pasiva en placa y es muy útil para el diagnóstico y pronóstico de la fiebre reumática y de otras enfermedades inflamatorias. Esta proteína no se presenta en sujetos sanos y desaparece una vez que el cuadro clínico mejora. El nivel de PCR aumenta en casi todas las infecciones bacterianas agudas, algunos tumores y diversos tipos de destrucción de tejidos, como en el infarto al miocardio. ^(48, 49, 50)

La PCR se mide mediante un anticuerpo de PCR purificada por reacción de precipitina en un capilar, inmunodifusión radial y prueba en portaobjetos con látex (es la prueba recomendada). ⁽⁹⁾

La enorme reserva funcional del hígado compensa, hasta cierto punto el impacto clínico de las lesiones hepáticas iniciales, esto se debe a que en los hepatocitos pueden acumularse distintos tipos de sustancias, entre ellas hierro y cobre. ⁽⁵¹⁾

2.3.4. Alteraciones hepáticas crónicas por cobre

El cobre puede producir una toxicidad en hígado ocasionando insuficiencia hepática aguda y súbita, la cual puede producir encefalopatía (disfunción cerebral), dificultades de coagulación sanguínea e incluso la muerte. El síntoma más común de la hepatotoxicidad es la elevación de las transaminasas ALT y AST, las cuales pasan a la circulación sanguínea cuando las células del hígado están dañadas. Un incremento dos o tres veces mayor del valor de referencia de las transaminasas (0-38 U/L en hombres y 0-32 U/L en mujeres) es motivo de preocupación, pero una elevación que sea cinco veces mayor del límite máximo normal indica toxicidad hepática grave. La hepatotoxicidad leve o moderada a menudo es

asintomática, pero algunas personas sufren náuseas, pérdida de apetito, fatiga, picazón (prurito), dolores musculares y articulares o molestias abdominales. ⁽²⁾

La mayoría de los estudios realizados acerca de la toxicidad del cobre en relación a alteraciones hepáticas han sido de tipo experimental y realizados en animales, encontrándose una marcada elevación de enzimas específicas en sangre, tales como la sorbitol deshidrogenasa (SDH), GGT y ALT. ⁽⁵²⁾

Araya y colaboradores, realizaron un amplio estudio en humanos, donde concluyeron que el 9.2% de los participantes registró un incremento de la actividad de las enzimas hepáticas (ALT, AST, GGT) superior a los límites normales; no obstante, los participantes no presentaron ninguna evidencia clínica que pudiera indicar desorden hepático; la concentración máxima de cobre en sangre fue de 52.87 $\mu\text{gCu/dL}$, encontrándose dentro de los valores de referencia (70-140 $\mu\text{gCu/dL}$). ⁽⁵³⁾

Se ha afirmado, que en el 6.5% de los casos en que se experimenta un incremento de cobre en suero más allá del rango normal indica una posible disfunción hepática. ⁽⁵⁴⁾

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La hepatotoxicidad asociada al cobre requiere de una exposición prolongada a un alto contenido de este elemento, no obstante, puede afirmarse que la concentración exacta es materia de controversia. El almacenamiento de cobre en hígado produce fenómenos oxidativos, que pueden traducirse al paso del tiempo en daño hepático. ⁽⁵⁵⁾

La exposición prolongada a cobre, como la que propician los dispositivos intrauterinos del tipo TCU380A, alcanzan una concentración media en sangre periférica de $217\mu\text{gCu/dL} \pm 20.96$. Actualmente, se desconoce si la concentración de cobre en sangre inducida por estos DIU's, produce alguna alteración orgánica o signos de toxicidad, o bien como en el estudio de Araya y colaboradores pudiera ocurrir una adaptación sistémica a la exposición crónica del mencionado elemento.

Este trabajo tuvo la finalidad de determinar en mujeres usuarias del DIU TCU380A si las concentraciones de cobre en sangre se asociaban con alteraciones hepáticas.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar la concentración de cobre en suero y el comportamiento de enzimas hepáticas en un grupo de usuarias del DIU TCu380A.

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar los niveles de ALT, AST, GGT, PCR, Cp y Cu en usuarias y no usuarias del DIU TCu380A.
2. Comparar los niveles de ALT, AST, GGT, PCR, Cp y Cu entre usuarias y no usuarias del DIU TCu380A.
3. Evaluar, la influencia del tiempo de uso del DIU TCu380A, con el comportamiento de ALT, AST, GGT, PCR y Cp.

V. HIPÓTESIS

Los niveles de ALT, AST, GGT, PCR y Cp serán mayores en las usuarias del DIU TCu380A que en las no usuarias.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente estudio fue transversal y comparativo de la presencia de alteración en las enzimas hepáticas de usuarias y no usuarias del DIU TCu380A.

6.1. Población de estudio

El grupo de estudio estuvo compuesto por 80 mujeres voluntarias en un rango de edad entre 18 y 40 años, 40 de ellas usuarias del DIU TCu380A y 40 no usuarias, a las que se les dieron pláticas informativas sobre el tema, antes de incluirlas.

6.2. Criterios de inclusión (Anexo 1)

6.2.1. *Usuarias*

- Tener entre 18 y 40 años de edad.
- Utilizar DIU
- No haber sufrido enfermedades hepáticas crónicas ni agudas.

6.2.2. *No usuarias*

- Tener entre 18 y 40 años de edad.
- No utilizar ningún tipo de anticonceptivo
- No haber sufrido enfermedades hepáticas crónicas ni agudas.

6.3. Criterios de exclusión

- Ser menores de 18 años y mayores de 40 años de edad.
- Haber sufrido enfermedades hepáticas crónicas o agudas.

Nota: se eliminaron los datos de aquellas mujeres cuyos resultados de los análisis clínicos correspondientes denotaron alteraciones en glucosa tanto de usuarias como no usuarias.

6.4. Variables

6.4.1. Dependientes

- Enzimas hepáticas: ALT, AST y GGT
- Proteínas sintetizadas en hígado: PCR y Cp

6.4.2. Independientes

- Uso del DIU TCu380A
- Niveles de cobre en suero

6.4.3. Moderadoras

- Tiempo de uso del DIU
- Ingesta de alcohol
- Consumo de medicamentos

6.5. Material

6.5.1. Material

- Tubos vacutainer de 7 mL sin anticoagulante (BD Vacutainer)
- Agujas para vacutainer (BD Vacutainer)
- Adaptador para vacutainer (BD Vacutainer)
- Ligadura (BD Vacutainer)
- Torundas con alcohol al 70%
- Gradillas para tubos de ensaye de 13 x 100mm
- Pipetas Pasteur

- Perilla
- Cronómetro
- Pipetas graduadas de 1, 2 y 5mL (Pyrex)
- Tubos de ensayos (Pyrex)
- Aplicadores de madera
- Pipetas calibradas con rango variable de 5-20 μL , 40-200 μL y 100-1000 μL (BIOHIT)
- Celdas desechables (Jenway 6305)
- Papel parafilm (American Nacional Can)
- Guantes de látex (Protec I.N.T)
- Contenedor de residuos biológico-infecciosos (IEC-20A, TCM-PC-1)
- Puntas para micro pipeta (Neptune)
- Placas Falcon 3046 (Becton Dicknson Labware)
- Perforador
- Marcador indeleble (Signal)
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL (Kimax)
- Regla métrica
- Pipeta estéril 1/10 mL (Costar)
- Vasos de precipitado de 50, 100 mL (Pyrex)
- Varillas de vidrio
- Piseta 250 mL

6.5.2. Equipo

- Refrigerador
- Espectrofotómetro UV visible (Jenway 6305)
- Vortex Genie (Scientific Industries)
- Baño de agua (Precisión Circulating Sistem-253)
- Centrífuga (Hamilton Bell Vanguard)
- Balanza analítica (Mettler H33AR, Hoffman-Pinther)

- Horno de microondas
- Espectrofotómetro de absorción atómica con quemador de flujo laminar de 10 cm. de longitud (PYE-UNICAM SP 192)
- Lámpara de cátodo hueco para cobre

6.5.3. Reactivos

- Equipo de reactivos para determinar ALT (Wiener Lab)
- Equipo de reactivos para determinar AST (Wiener Lab)
- Equipo de reactivos para determinar GGT (Wiener Lab)
- Equipo de reactivos para determinar PCR (Wiener Lab)
- Agarosa (Bioxon)
- Azida de sodio (Merck-Schuchardt)
- Suero de conejo (Anticuerpos para Ceruloplasmina humana)
- Estándar de cobre 1000 ppm (Sigma)
- Ácido Nítrico (J.T. BAKER)
- Agua desionizada (Hycel de México, S.A de C.V)
- Agua destilada (Theissier)
- Aire comprimido (presión 0.8 kg/cm)
- Acetileno (presión 0.8 kg/cm)
- Cloro al 0.5% (Cloralex)
- PBS (Sigma)

6.6. Método

6.6.1. Muestras biológicas

1. Se recolectaron muestra de sangre periférica de las mujeres en tubos vacutainer de 7 mL y se identificaron de acuerdo a su nombre, fecha y clave (en numeración consecutiva).

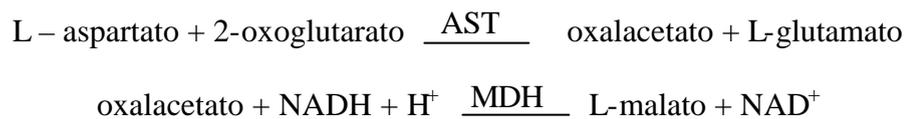
Diseño experimental

2. Las agujas y torundas utilizadas se depositaron en un contenedor de residuos punzó cortante biológico-infeccioso.
3. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos
4. Se separó el suero del paquete globular de cada muestra con una pipeta Pasteur y se colocó en un tubo de ensayo limpio y seco, previamente identificado

6.6.2. Determinación de enzimas

6.6.2.1. Aspartato amino transferasa (AST)

El fundamento está basado en la siguiente reacción:



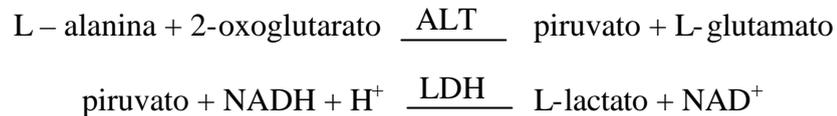
Método

1. En un tubo de ensayo mantenido en baño de agua a 37°C se colocó 1mL de sustrato reconstituido y 100 µL de suero.
2. Se mezcló inmediatamente y se puso en marcha el cronómetro.
3. Después de un minuto se registró la absorbancia inicial de la muestra a una longitud de onda de 340 nm.
4. Se repitió este procedimiento a los 1,2 y 3 minutos después de la primera lectura.
5. Posteriormente se determinó la diferencia promedio de absorbancia por minuto, restando la lectura del anterior y promediando los valores, estos se utilizaron para los cálculos.

Valor de referencia: 0-32 U/L

6.6.2.2. Alanino aminotrasferasa (ALT)

Fundamento basado en la siguiente reacción:



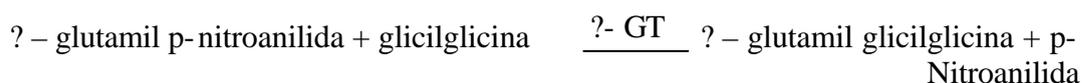
Método

1. En un tubo de ensaye mantenido en baño de agua a 37°C se colocaron 3mL de buffer, 50 µL de NADH, 50 µL de LDH y 300 µL de suero.
2. Se mezcló y se incubó a 37°C durante 5 minutos.
3. Al término de estos se agregaron 50 µL de 2-Oxoglutarato.
4. Se mezcló inmediatamente y se espero un minuto.
5. Se registró la absorbancia inicial a una longitud de onda de 340nm.
6. El procedimiento se repitió a los minutos 1,2 y 3 después de la primera lectura.
7. Se determinó la diferencia promedio de absorbancia por minuto, restando la lectura del anterior y promediando los valores.
8. Se utilizó este valor para los cálculos.

Valor de referencia 0-32 U/L

6.6.2.3. Gamma Glutamil Transferasa (GGT)

Fundamento. La gamma-glutamil transferasa es una carboxipeptidasa que cataliza la siguiente reacción:



La actividad enzimática se mide leyendo la velocidad de aparición del color amarillo de la p-nitroanilida a 405 nm.

Método

1. En un tubo de ensaye mantenido a 37°C se colocaron 3mL de sustrato reconstituido.
2. Se preincubo tres min. y se le agregaron 200 µL de suero.
3. Se mezcló inmediatamente y se puso en marcha el cronómetro.
4. Después de un minuto se registró la absorbancia inicial a una longitud de onda de 405 nm.
5. Este procedimiento se repitió a 1, 2 y 3 minutos después de la primera lectura.
6. Se determinó la diferencia promedio de absorbancia por minuto, restando la lectura del anterior y promediando los valores.
7. Los valores se utilizaron para los cálculos.

Valor de Referencia: 8-34 U/L

6.6.3. Proteínas

6.6.3.1. Proteína C reactiva (PCR)

Fundamento: La PCR se detecta en suero por reacción con un anticuerpo específico adsorbido sobre un soporte inerte de látex. La PCR se une a los anticuerpos adsorbidos produciendo la aglutinación de las partículas de látex.

Método

1. Se colocó una gota de suero problema, suero testigo positivo y suero testigo negativo en tres diferentes lugares de la placa.
2. A los cuales se les adiciono una gota (50 µL) del reactivo de PCR-látex previamente agitado, a cada uno de los sueros.
3. Se mezcló perfectamente con aplicadores y se agitó durante 2 minutos.
4. La aglutinación se observó y se comparó con los testigos positivo y negativo de la prueba.

5. En el caso de las muestras que presentaron una aglutinación, se les realizaron diluciones seriadas, para obtener el valor real de la proteína.

Valor de Referencia: 0 a 6 mg/L

6.6.3.2. Ceruloplasmina (Cp)

Fundamento: La inmunodifusión radial es un sistema bidimensional con difusión sencilla tanto cualitativo como cuantitativo. La difusión radial del antígeno produce un anillo de precipitado, cuyo diámetro al cuadrado (área) es proporcional a la concentración del antígeno, cuando la concentración de anticuerpo y el espesor del gel son uniformes y constantes. Esta técnica determina cuantitativamente la concentración del antígeno. Se basa en la relación cuantitativa entre la cantidad del antígeno colocado en un pozo en la placa de agar con anticuerpo y el anillo de precipitación que resulta.

Método

Preparación de las placas:

1. Se pesaron 0.6 g de agarosa, en una balanza analítica.
2. Se colocaron en un matraz de 250 mL, se les agregó 60 mL de agua destilada y una pizca de azida de sodio.
3. Se colocó el matraz en el horno de microondas durante 1 minuto para disolver la agarosa.
4. Se colocaron 2 mL de agarosa con una pipeta graduada a 24 tubos de ensaye etiquetados.
5. Se colocaron en baño María a 45°C durante 10 min.
6. A cada tubo se le agregó 150 µL de suero de conejo y se agitaron.
7. Cada uno de los tubos fue vaciado en un pozo de las placas de Falcon, evitando la presencia de burbujas.
8. Las placas se dejaron reposar hasta alcanzar la solidificación.

9. Se realizaron perforaciones de 5mm en el agar y se utilizaron el mismo día de su elaboración.

Procesamiento de la muestra

1. Se colocaron 5 μ L de cada muestra en el orificio de los pozos de las placas.
2. Estos fueron identificados de acuerdo a su código de numeración.
3. Se colocó el estándar de Ceruloplasmina a diferentes concentraciones (ver anexo 10.2.3.5)
4. Las placas se refrigeraron durante 48 horas.
5. A las 48 horas se midió el halo de inhibición con una regla métrica.
6. Se realizó una curva de calibración y se grafico el diámetro obtenido en cada muestra para calcular su concentración.

Valor de referencia: 34 a 48 mg/dL

6.6.4. Cobre (Cu)

6.6.4.1. Preparación del material

1. El material ocupado para la determinación de cobre, fue previamente lavado con jabón no iónico y enjuagado con agua desionizada.
2. Posteriormente se colocó en ácido nítrico 1M durante 24 hrs. Al término de este tiempo se enjuagó con agua desionizada y se dejó secar boca abajo al aire libre.

6.6.4.2. Preparación de la curva estándar

1. Se prepararon diluciones a partir de la solución patrón; concentrada de cobre (1000 ppm), para obtener soluciones con concentración de 2, 4, 8, 16 y 32 ppm.
2. Se utilizó como blanco, agua desionizada.
3. Se obtuvieron las lecturas de absorbancia en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica a una longitud de onda de 324.8 nm con una flama, empleando como gas aire-acetileno para la cuantificación del elemento.

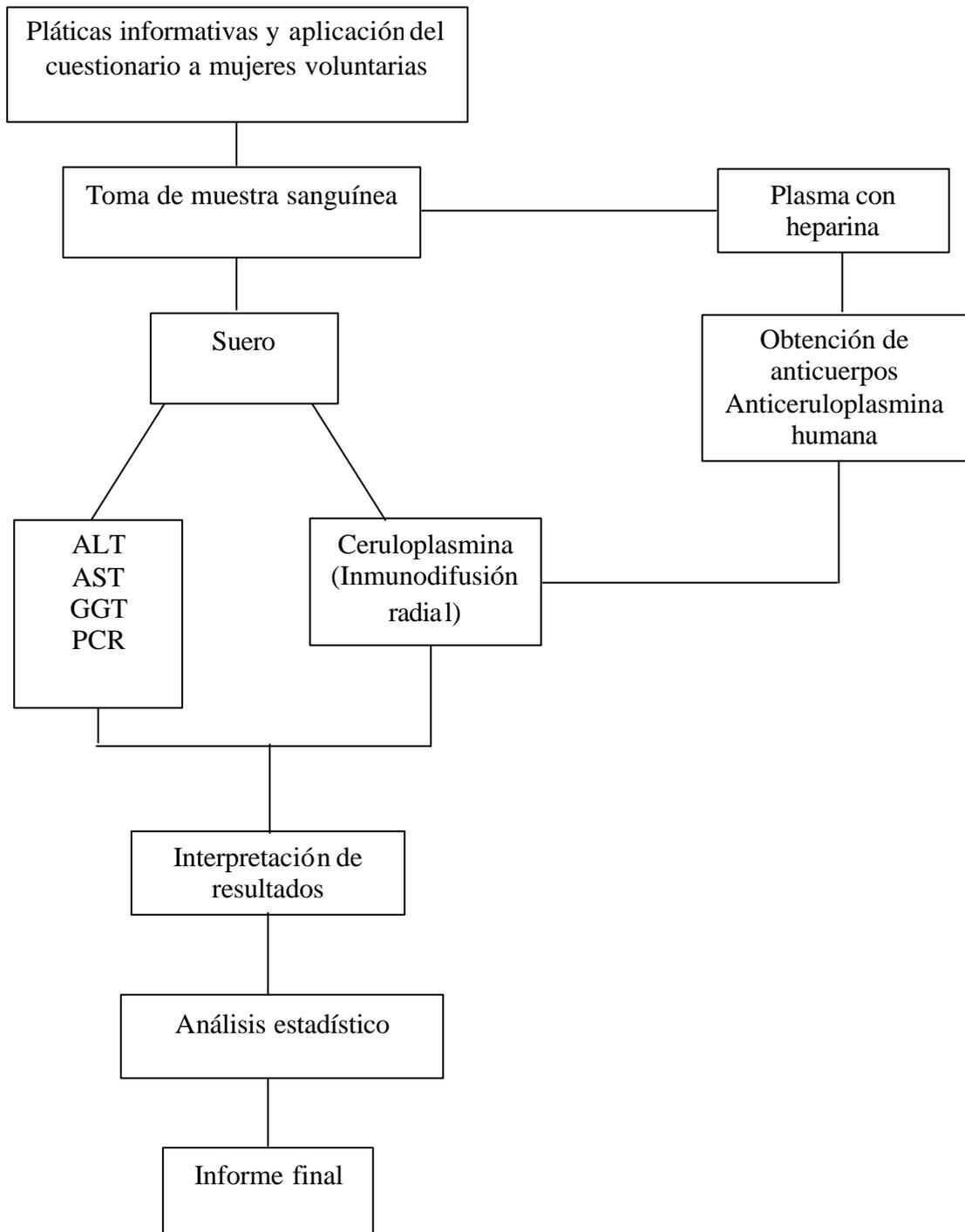
Diseño experimental

4. Con las lecturas obtenidas se realizó una gráfica de absorbancia contra concentración.
5. Se obtuvo una curva lineal y su coeficiente de correlación. Con esto se calculó b (ordenada al origen) y m (pendiente).
6. Esta curva de calibración sirvió para obtener las ppm de cobre en las muestras de suero.

6.6.4.3. Preparación de las muestras de suero

1. Se colocaron 500 μL de suero + 1500 μL de agua desionizada (dilución 1 a 4), en un tubo estéril de 4 mL.
2. Esto se realizó para cada una de las 80 muestras de suero.
3. Se ejecutaron las lecturas de absorbancia en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica a una longitud de onda de 324.8 nm, con una flama empleando como gas aire-acetileno para la cuantificación del cobre.
4. Las absorbancias obtenidas se utilizaron para los cálculos, con la ayuda de la curva estándar. Se realizó la conversión de ppm a $\mu\text{g/dL}$ y este valor se multiplicó por la dilución.

6.7. Diagrama de flujo



6.8. Diseño estadístico

Se aplicó para el análisis de los resultados estadística descriptiva como media aritmética, varianza y desviación estándar a cada uno de los grupos establecidos.

Con la finalidad de realizar la comparación de ALT, AST, GGT, PCR y Ceruloplasmina entre las dos diferentes poblaciones de estudio, se aplicó una prueba de hipótesis para diferencia de medias utilizando la *t*-student para cada caso.

Para evaluar el tiempo de uso del DIU TCu380A con el comportamiento de ALT, AST, GGT, PCR y Ceruloplasmina se realizó un análisis de varianza con una prueba de Tukey.⁽⁵⁶⁾

El programa utilizado para el Análisis de Datos fue SPSS 14, 2003.⁽⁵⁷⁾

VII. RESULTADOS

La población participante en esta investigación estuvo constituida por 80 mujeres que presentaron una edad promedio de 28 años (± 6), un índice de masa corporal promedio de 23.05 Kg/m² (± 2.6), clínicamente sanas, sin antecedentes declarados de haber sufrido enfermedades hepáticas, y sin consumo de medicamentos ni suplementos alimenticios. El 87.5% de las participantes se reportó como no consumidora de bebidas alcohólicas, mientras que el 12.5% las consumen ocasionalmente, a lo sumo 3 veces en un mes.

El 50% de la población estaba utilizando como método anticonceptivo el DIU TCu380A, y el otro 50% estuvo constituido por mujeres que estaban utilizando, en un 6.25% el condón y el 43.75% no utilizaba ningún método.

Los tiempos de uso del DIU TCu380A se muestran en el Cuadro 2, observando que el mayor porcentaje de usuarias se encuentra en el intervalo de 13 a 36 meses de uso.

Cuadro 2. Tiempo de uso en meses de las usuarias del DIU TCu380A. Los Reyes La Paz, Estado de México. 2005-2006.

Tiempo (meses)	Frecuencia	%
1-12	8	20
13-36	12	30
37-60	11	27.5
61-84	2	5
85-108	3	7.5
>109	4	10
Total	40	100

Fuente: Directa

Las mujeres usuarias del DIU TCU380A manifestaron presentar sintomatología desde el inicio de su inserción, predominando la inflamación del vientre en un 67.5%; como se describe en el Cuadro 3. En este también se puede apreciar que hay mujeres que presentan más de un síntoma y que sólo el 5% no presentó ninguna molestia.

Cuadro3. Sintomatología que presentan las mujeres usuarias del DIU TCU380A a partir de su inserción. Los Reyes La Paz, Estado de México. 2005-2006.

Síntomas	Frecuencia	%
Inflamación en vientre	27	67.5
Inflamación en caderas	11	27.5
Inflamación en estomago	10	25
Dolores de cabeza frecuentes	16	40
Adelanto de la menstruación	21	52.5
Retrazo de la menstruación	10	25
Hemorragias	3	7.5
Fatiga	22	55
Ninguno	2	5

Fuente: Directa

Se obtuvo como dato adicional que las mujeres usuarias del DIU TCU380A presentan un tiempo promedio de menstruación de 5 días (± 2) mientras que las no usuarias presentaron una media de 4 días (± 1).

Así mismo, se llevaron a efecto estudios de laboratorio complementarios para corroborar el estado de salud de la totalidad de las mujeres participantes en la investigación. La concentración promedio de glucosa en sangre fue de 83.22 mg/dL (± 14.93); urea de 29.61 mg/dL (± 12.28); creatinina de 0.8 mg/dL (± 0.08) y hemoglobina de 13.51 mg/dL (± 1.19).

De esta manera, podemos afirmar que se trató de un grupo de mujeres clínicamente sanas de acuerdo a estos resultados, ya que estas concentraciones se encuentran dentro de los valores de referencia. ^(47,48) Al compararse estadísticamente estas concentraciones entre los dos grupos no se encontró ninguna diferencia significativa.

7.1. Cobre en suero

De acuerdo a los objetivos planteados en la presente investigación se determinó cobre en un total de 80 muestras de suero de las mujeres participantes, encontrándose un promedio de 307.30 µg/dL (\pm 156.23) en las usuarias del DIU TCu380A y de 83.15 µg/dL (\pm 22.38) en las no usuarias.

Cuadro 4. Valores promedio de Cobre en suero de usuarias del DIU TCu380A de acuerdo al tiempo de uso. Los Reyes La Paz, Estado de México.2005-2006.

Tiempo de uso (meses)	N	Cu (µg/dL)
No usuarias	40	83.15 \pm 22.38
1-12	8	289.71 \pm 143.34*
13-36	12	269.90 \pm 96.31*
37-60	11	222.40 \pm 72.66*
61-84	2	314.00 \pm 70.71*
85-108	3	360.00 \pm 277.84*
>109	4	562.00 \pm 118.32*

*ANOVA $p < 0.05$ con respecto a las no usuarias

Fuente: Directa

Se observa que las concentraciones de cobre en suero son mayores en las usuarias del DIU. El incremento de 1 a 60 meses es alrededor de 3 veces más que el de las no usuarias y a partir de los 61 meses las concentraciones se elevan de 4 hasta 7 veces más.

Podemos observar que la mitad del total de las mujeres usuarias, se encuentra entre 1 y 36 meses de uso. Así, podemos clasificar a esta población en dos tiempos de uso como se muestra en el Cuadro 4.1. De esta forma, conseguimos percibir que el cobre en suero se deposita, básicamente, durante los primeros tres años de uso. Posterior a lo cual el incremento promedio es relativamente bajo, aunque suficiente para provocar una concentración anormal de enzimas hepáticas en suero como veremos a continuación.

Cuadro 4.1. Valores promedio de Cobre en suero de usuarias de 1 a 36 y de 37 a 109 meses de uso del DIU TCu380A. Los Reyes La Paz, Estado de México.2005-2006.

Tiempo de uso en meses	N	µg/dL Cu	DS	p<0.05
1-36	20	279.80	14.00	*
37 a >109	20	364.60	143.49	*
No usuarias	40	83.15	22.38	*

Fuente: Cuadro 4

Nota: * Estadísticamente significativo

7.2. Enzimas hepáticas

Los resultados obtenidos con respecto a la determinación de enzimas hepáticas, en la población descrita, indican que sus concentraciones son mayores en las usuarias del DIU TCu380A que en las no usuarias. Así mismo, se pudo constatar que el tiempo de uso del DIU tiene influencia en el incremento de las concentraciones de estas enzimas (Cuadro 5, Gráfica 1). Al hacerse una comparación de las concentraciones entre usuarias y no usuarias se presentó una diferencia significativa con respecto a los diferentes tiempos de uso, excepto para el tiempo de 1 a 12 meses.

Cuadro 5. Valores promedio de enzimas hepáticas ALT, AST, GGT en usuarias y no usuarias del DIU TCU380A. Los Reyes La Paz, Estado de México. 2005-2006.

Enzimas	Usuarias U/L	N	No usuarias U/L	N	p<0.05
ALT	40.05 ± 19.10	40	14.92 ± 8.72	40	*
AST	36.77 ± 17.88	40	12.80 ± 5.88	40	*
GGT	35.20 ± 13.51	40	14.36 ± 7.07	40	*

Fuente: Directa

Nota: * Significativo

Cuadro 6. Valores promedio de enzimas hepáticas ALT, AST, GGT de acuerdo al tiempo de uso del DIU TCU380A en usuarias y no usuarias. Los Reyes La Paz, Estado de México. 2005-2006.

(meses)	N	ALT (U/L)	AST (U/L)	GGT (U/L)
No usuarias	40	14.92 ± 8.72	12.800 ± 5.88	14.362 ± 7.07
1-12	8	24.13 ± 16.00	20.38 ± 11.89	22.38 ± 13.10
13-36	12	27.73 ± 5.98*	24.91 ± 8.46*	25.36 ± 4.99*
37-60	11	42.90 ± 9.27*	41.50 ± 8.51*	43.40 ± 8.18*
61-84	2	47.50 ± 15.33*	42.50 ± 9.71*	46.00 ± 6.22*
85-108	3	64.00 ± 6.24*	60.33 ± 10.60*	50.00 ± 10.00*
>109	4	73.25 ± 11.53*	67.00 ± 8.91*	45.50 ± 7.19*

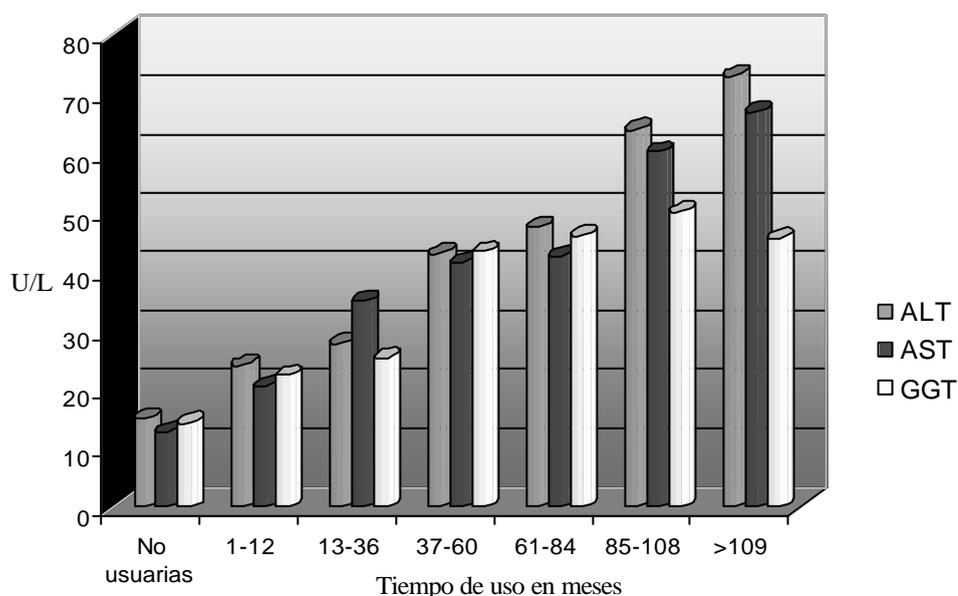
Fuente: Directa

Nota: * ANOVA, Significativo p<0.05

7.3. Concentración de las enzimas hepáticas ALT, AST y GGT de acuerdo al tiempo de uso del DIU TCu380A

El análisis de las enzimas ALT y AST mostraron un incremento progresivo de sus concentraciones a partir de los 37 meses de uso del DIU TCu380A, teniendo en consideración que los valores de referencia para personas clínicamente sanas van de 0-31 U/L para ALT y de 0 a 32 en el caso de la AST. ⁽⁴⁷⁾ Las mujeres no usuarias del DIU presentaron un valor promedio dentro del rango de referencia (Cuadro 6; Gráfica 1.1 y 1.2). Cabe hacer notar que la ALT se encuentra en mayor proporción que la AST. Los valores promedio de la enzima GGT en estas usuarias también se ven influidos por el tiempo de uso del dispositivo, pero el comportamiento de esta enzima muestra un decremento después de los 109 meses de uso. (Gráfica 1.3).

Gráfica 1. Valores promedio de las enzimas hepáticas ALT, AST, GGT en usuarias y no usuarias de DIU TCu380A, de acuerdo al tiempo de uso del DIU TCu380A. Los Reyes La Paz, Estado de México.2005-2006.

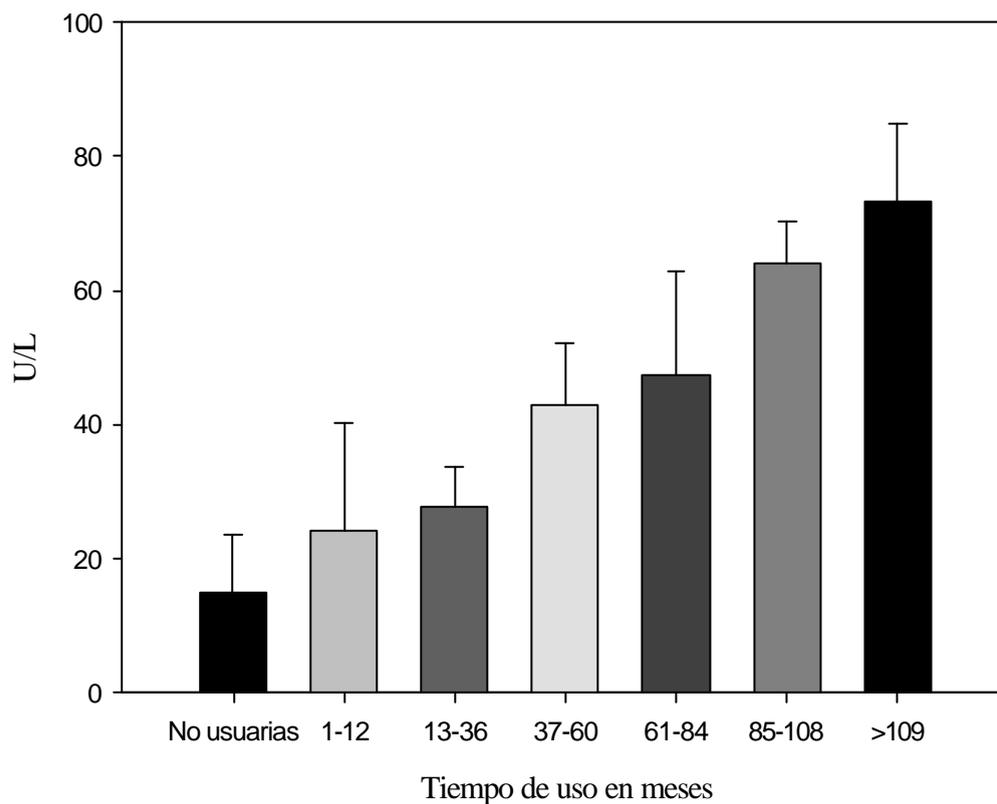


Fuente: Cuadro 6

7.3.1. *Enzima ALT*

El incremento de la enzima ALT es consistente, manteniéndose dentro de la normalidad hasta los 36 meses de uso. Es a partir del mes 37 cuando se manifiesta fuera de los valores de referencia, llegando a más de 70 U/L a los 109 meses. Así mismo, este valor es 6 veces superior al valor promedio encontrado en las no usuarias. Esto puede observarse en la Gráfica 1.1.

Gráfica 1.1. Valores promedio de ALT en usuarias de DIU TCu380A de acuerdo al tiempo de uso. Los Reyes La Paz, Estado de México.2005-2006.

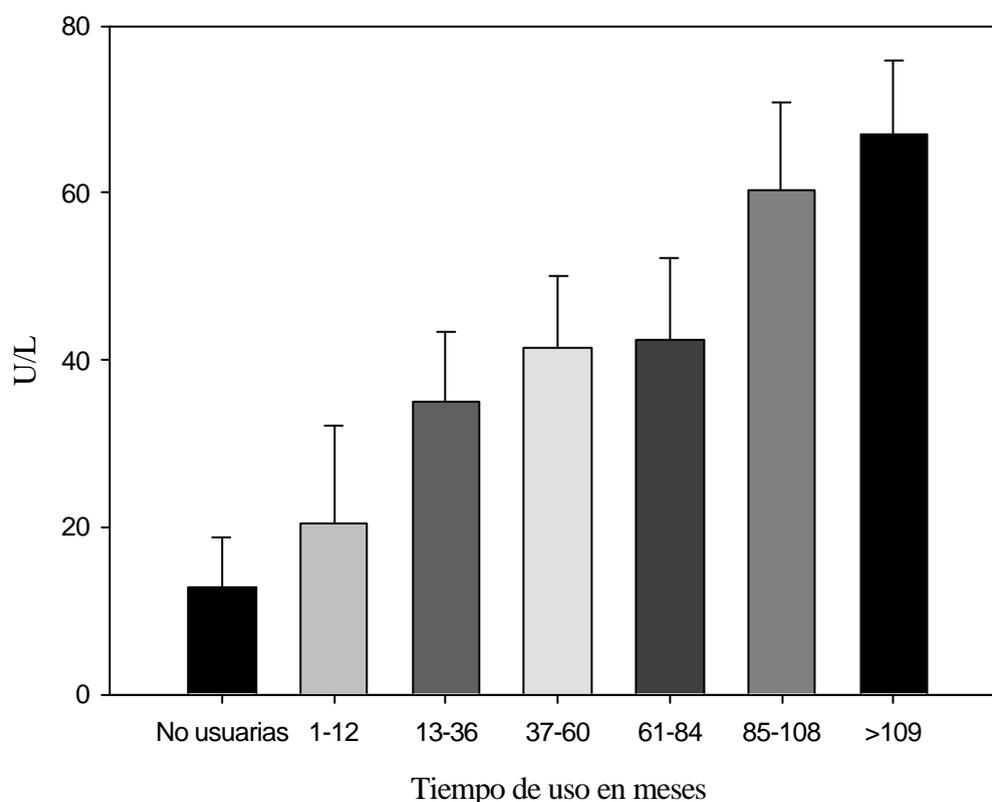


Fuente: Cuadro 6

7.3.2. *Enzima AST*

El incremento de la enzima AST es consistente, manteniéndose dentro de la normalidad hasta los 36 meses de uso. Es a partir del mes 37 cuando se manifiesta fuera de los valores de referencia, llegando a más de 60 U/L a partir de los 109 meses. Esta concentración es 5 veces superior al valor promedio encontrado en las no usuarias. Cabe hacer notar, que el incremento de esta enzima presenta etapas de estancamiento, por ejemplo, de los 37 a los 84 meses, en que se incrementa y nuevamente a partir de los 85 meses en adelante. (Gráfica 1.2).

Gráfica 1.2. Valores promedio de AST en usuarias de DIU TCu380A de acuerdo al tiempo de uso. Los Reyes La Paz, Estado de México.2005-2006.

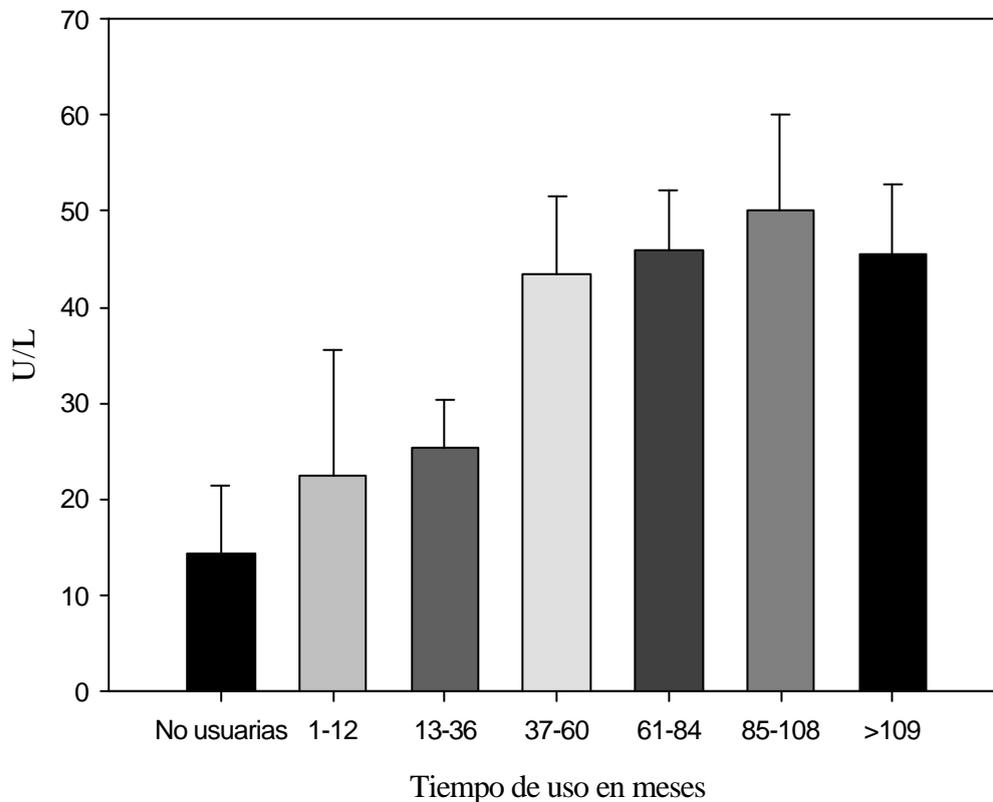


Fuente: Cuadro 6

7.3.3. Enzima GGT

El incremento inicial de la enzima GGT trata de ser regulado en el periodo de tiempo de 1 a 36 meses, dando un incremento posterior al mes 37, a partir del cual sobrepasa los valores de referencia, una vez más trata de ser regulada entre los meses 37 a 84 pero se genera un nuevo incremento a los 85 meses, y decrece a los 109 meses. La concentración más elevada es al mes 85 siendo 3 veces mayor que las no usuarias.

Gráfica 1.3. Valores promedio de GGT en usuarias del DIU TCu380A de acuerdo al tiempo de uso. Los Reyes La Paz, Estado de México.2005-2006.



Fuente: Cuadro 6

7.4. Ceruloplasmina

Tratamiento especial merecen los datos sobre Ceruloplasmina (Cp), ya que en este caso particular se obtuvieron resultados adicionales en relación al método de análisis; ya que la técnica empleada para su determinación no tiene antecedentes en la literatura; es de bajo costo y de fácil ejecución. La técnica establecida está basada en el método de inmunodifusión radial que facilita el análisis de esta proteína. Se encuentra detallada en el Anexo.

Como puede apreciarse en la Cuadro 7, se registró un incremento de la concentración de la Cp, de acuerdo al tiempo de uso del DIU; incluso en el periodo inicial de 1 a 12 meses ya es superior al que presentan las mujeres no usuarias. Su incremento, es irregular pero constante y lo podemos observar en la Gráfica 2. Los valores promedio de Cp en usuarias representa más de dos veces el valor de las no usuarias.

Cuadro 7. Valores promedio de Ceruloplasmina en usuarias de DIU TCu380A de acuerdo al tiempo de uso. Los Reyes La Paz, Estado de México.2005-2006.

Tiempo de uso (meses)	N	Cp (mg/dL)
No usuarias	40	56.92 ± 31.93
1-12	8	105.65 ± 45.81*
13-36	12	126.95 ± 34.33*
37-60	11	132.30 ± 30.99*
61-84	2	128.62 ± 36.75*
85-108	3	147.00 ± 0.00*
>109	4	128.62 ± 36.75*

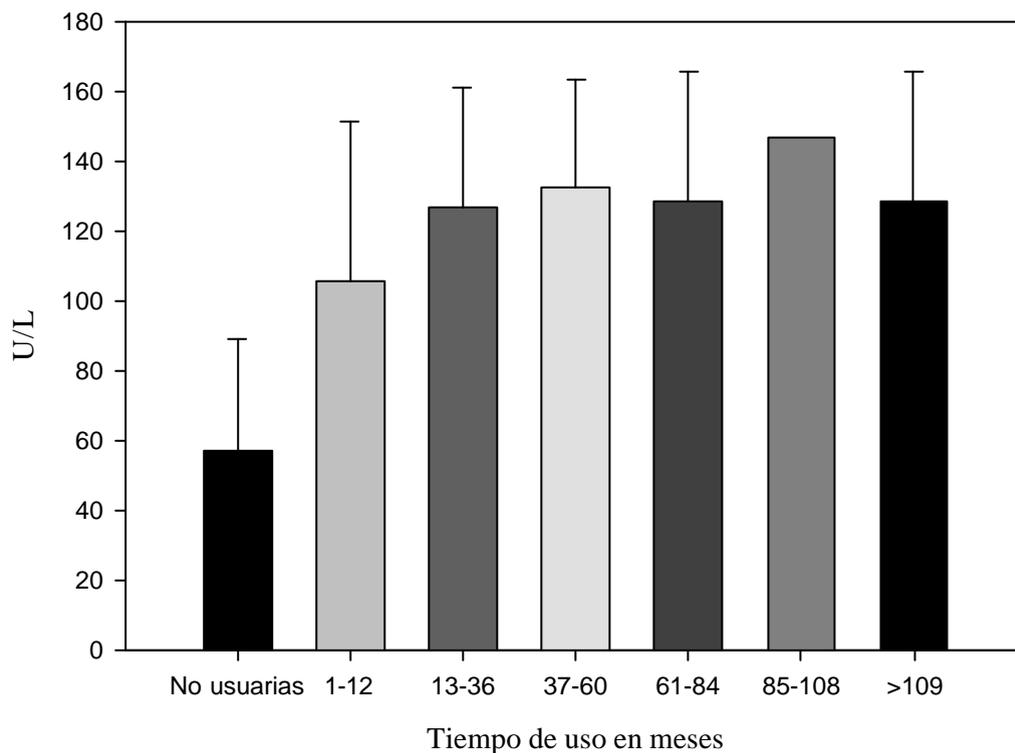
Fuente: Directa

Nota: *ANOVA $p < 0.05$ con respecto a las no usuarias

Como podemos observar en la Gráfica 2, desde la inserción del DIU TCu380A, los valores de ceruloplasmina son elevados y mayores a los valores de referencia. La concentración de la Cp, de los 85 a los 108 meses, presentó valores iguales, por lo que no existe una desviación estándar para este grupo.

Así mismo, en la Cuadro 7, encontramos los valores promedio de ceruloplasmina en usuarias y no usuarias del DIU TCu380A, la diferencia de concentración entre los grupos es estadísticamente significativa, siendo superior en las usuarias.

Gráfica 2. Valores promedio de ceruloplasmina en usuarias del DIU TCu380A de acuerdo al tiempo de uso. Los Reyes La Paz, Estado de México.2005-2006.



Fuente: Cuadro 7

Cuadro 8. Valores promedio de Ceruloplasmina en usuarias y no usuarias de DIU TCu380A. Los Reyes La Paz, Estado de México.2005-2006.

No usuarias mg/dL	DIU mg/dL	p<0.05
56.92	125.86	*

Fuente: Directa

Nota: * Estadísticamente significativo

En el Cuadro 8 se muestra claramente que existe una diferencia significativa de ceruloplasmina entre usuarias y no usuarias del DIU.

7.5. Proteína C Reactiva

La proteína C reactiva en las no usuarias fue negativa, en las usuarias solo se presentó en un número reducido de casos, denotando con ello la presencia de trastornos inflamatorios subclínicos entre las usuarias del DIU, como puede observarse en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Porcentaje y concentración media de Proteína C Reactiva en suero de usuarias y no usuarias del DIU TCu380A. Los Reyes La Paz, Estado de México.2005-2006.

Grupo	N	mg/dL	%	p<0.05
No usuarias	40	Negativo	0	
Usuarias de DIU TCu380A	29	Negativo	72.5	
	11	35.45 ± 39.11	27.5	*

Fuente: Directa

Nota: * Diferencia significativa con respecto a las mujeres no usuarias

Cuadro 10. Valores promedio de PCR en suero de usuarias del DIU TCu380A de acuerdo al tiempo de uso. Los Reyes La Paz, Estado de México.2005-2006.

Tiempo de uso (meses)	N	PCR (mg/dL)
No usuarias	40	Negativo
1-12	8	78.00 ± 36*
13-36	12	11.14 ± 2.26*
37-60	11	Negativo
61-84	2	Negativo
85-108	3	Negativo
>109	4	Negativo

Fuente: Directa

Nota: * Significativo ($p < 0.05$)

La proteína C reactiva se presenta en los primeros meses de uso del DIU, la mayor concentración se encuentra en el primer año, y está disminuye entre los 13 y 36 meses. A partir del mes 37 desaparece, reportándose como negativo como en el caso de las no usuarias.

7.6. Correlación de los resultados obtenidos

En el Cuadro 11, puede observarse el coeficiente de determinación de las concentraciones de Cu en relación a las enzimas hepáticas y ceruloplasmina en usuarias del DIU TCu380A.

Se realizó una clasificación por tiempo de uso de 1 a 36 meses (Grupo I), y de más de 37 meses (Grupo II), de acuerdo al punto de inicio del incremento de la concentración de las enzimas hepáticas fuera de los valores de referencia (Cuadro 5). Todos los incrementos registrados en el Grupo II presentan coeficientes significativos, incluso a una p menor de 0.01.

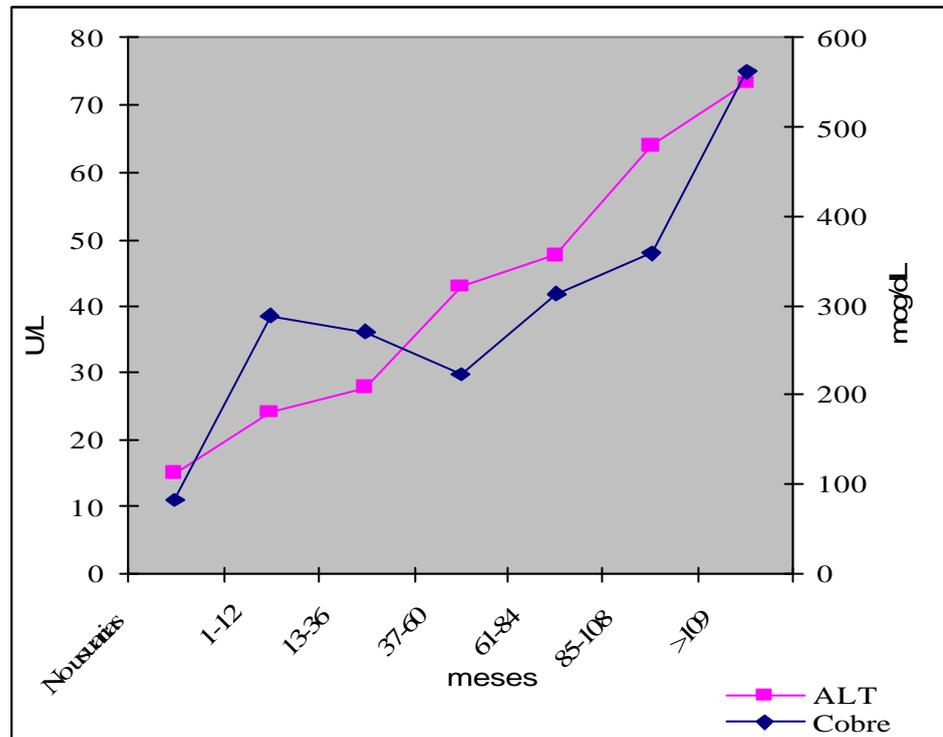
Cuadro 11. Coeficiente de determinación de las concentraciones de cobre sobre enzimas hepáticas y ceruloplasmina en usuarias del DIU TCu380A. Los Reyes La Paz, Estado de México. 2005-2006.

Enzimas	Tiempo de uso del DIU de 1 a 36 meses (Grupo I)	Tiempo de uso del DIU < 37 meses (Grupo II)
ALT	0.13	0.75**
AST	0.16	0.78**
GGT	0.13	0.46*
Cp	0.20	0.50*

Nota: * Correlación significativa $p < 0.05$
** Correlación significativa $p < 0.01$

Al graficar las concentraciones de cobre en suero y las concentraciones de enzimas hepáticas, se puede observar la variabilidad que existe en cuanto al tiempo de uso del DIU TCu380A.

Gráfica 3. Correlación de la concentración de ALT y cobre en suero, según el tiempo de uso del DIU TCu380A. Los Reyes La Paz, Estado de México. 2005-2006.

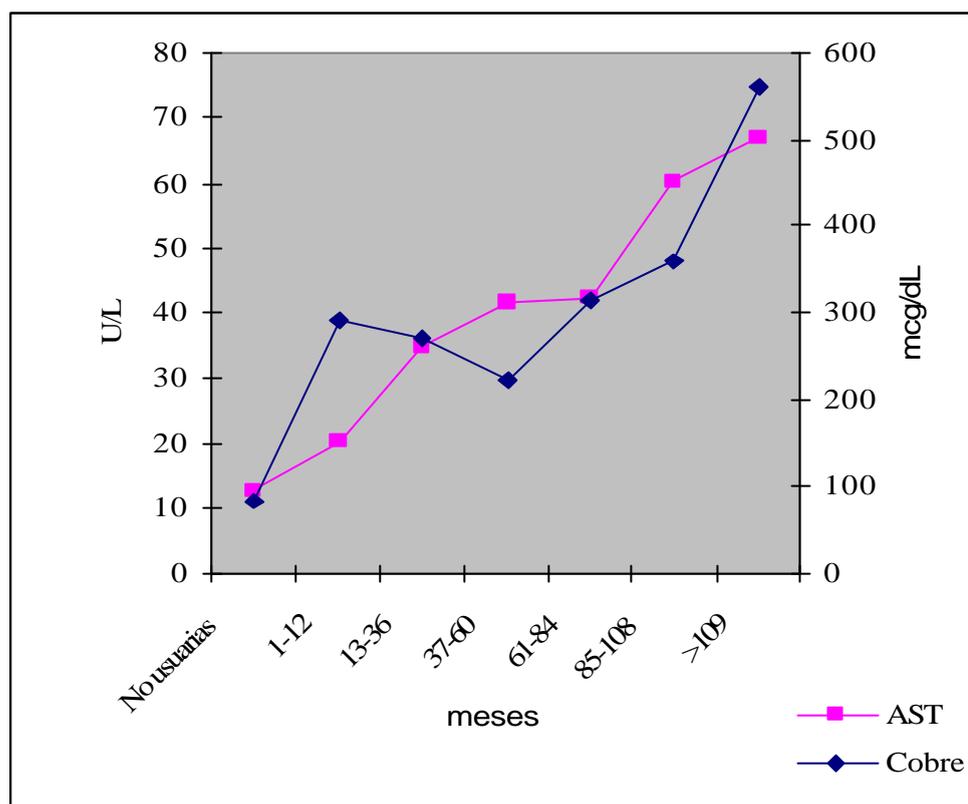


Fuente: Cuadro 4 y 6

En esta gráfica se puede observar que la concentración de cobre va aumentando con el paso del tiempo, y este incremento se relaciona con el incremento de la ALT que de igual forma se observa aumentada en cuanto al uso del DIU TCu380A.

Las concentraciones de cobre llegan a una disminución en el rango de 37 a 60 meses, y a partir de estos meses comienza un mayor aumento de hasta 680 μ g/dL (valor máximo).

Gráfica 4. Correlación de la concentración de AST y cobre en suero, según el tiempo de uso del DIU TCu380A. Los Reyes La Paz, Estado de México. 2005-2006.

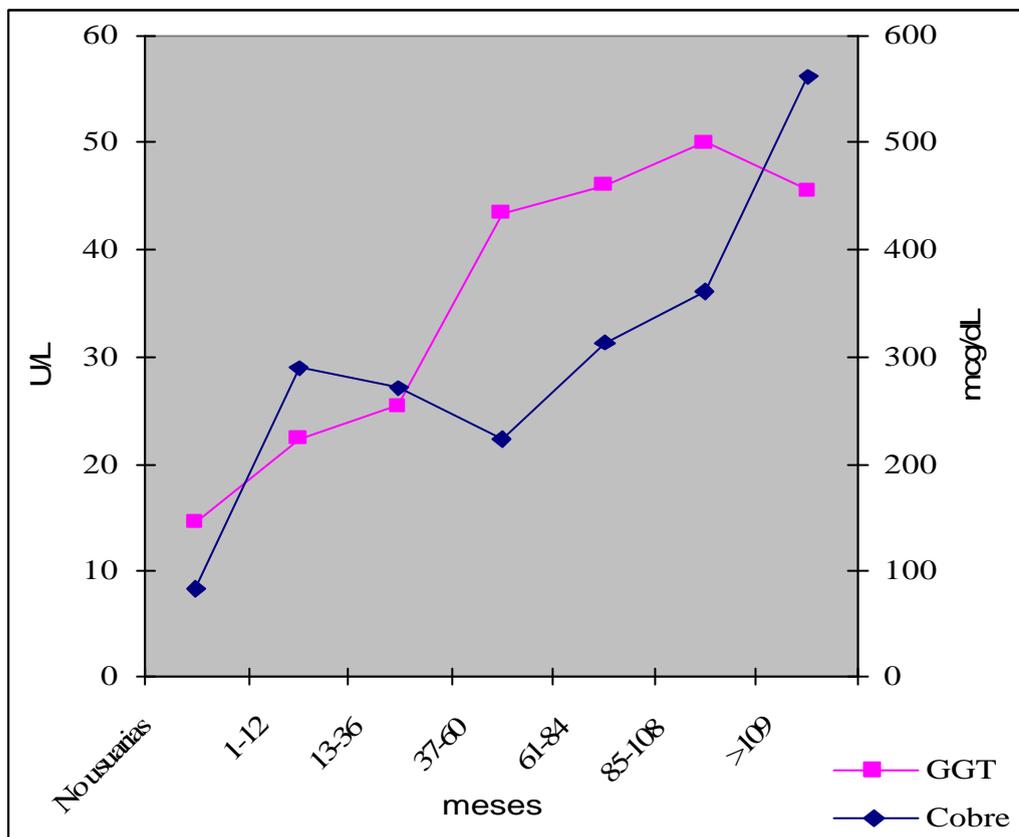


Fuente: Cuadro 4 y 6

El incremento de la enzima AST esta influenciado por el tiempo de uso del DIU y las concentraciones de cobre, como se puede observar en el Cuadro 11.

A pesar de que las concentraciones de cobre presentan un pico de decremento entre los 37 y 60 meses, la enzima se manifiesta en aumento, observándose que al llegar al tiempo de 61 a 84 meses, el cobre y la enzima presentan un comportamiento similar a partir del cual su aumento es mayor para ambos casos.

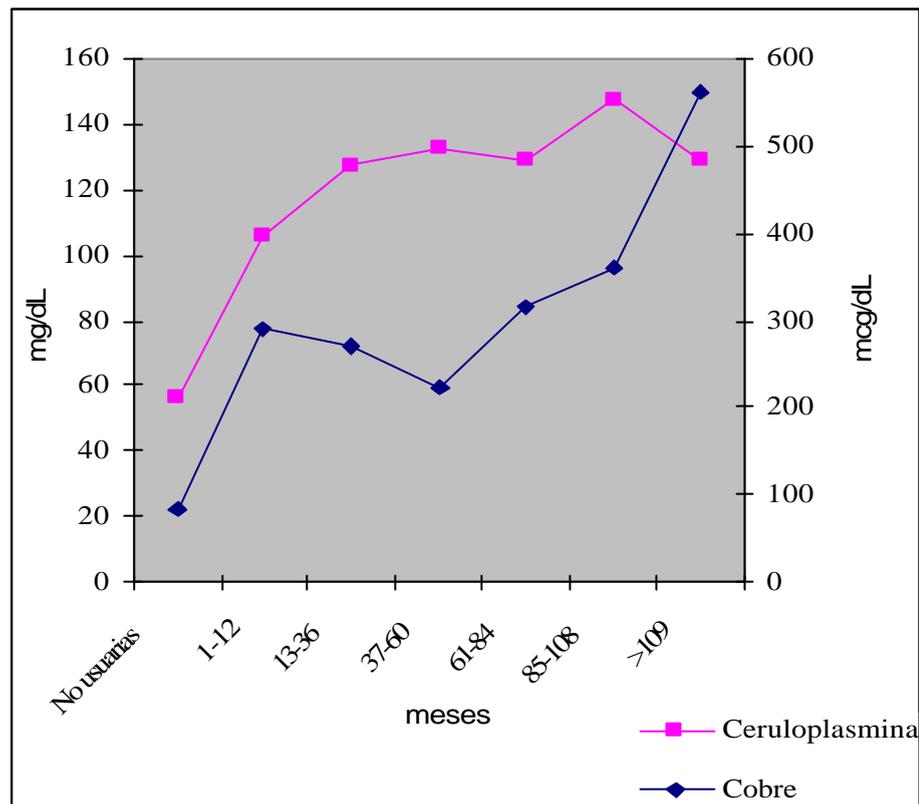
Gráfica 5. Correlación de la concentración de GGT y cobre en suero, según el tiempo de uso del DIU TCU380A. Los Reyes La Paz, Estado de México. 2005-2006.



Fuente: Tabla 4 y 6

Las concentraciones de la enzima GGT se presentan incrementadas de acuerdo al tiempo de uso del DIU y a las concentraciones de cobre, a pesar de que estas presentan un decremento a los 37 meses, el comportamiento de la enzima no disminuye al contrario se observa aumentado, disminuyendo una mínima concentración a los 109 meses

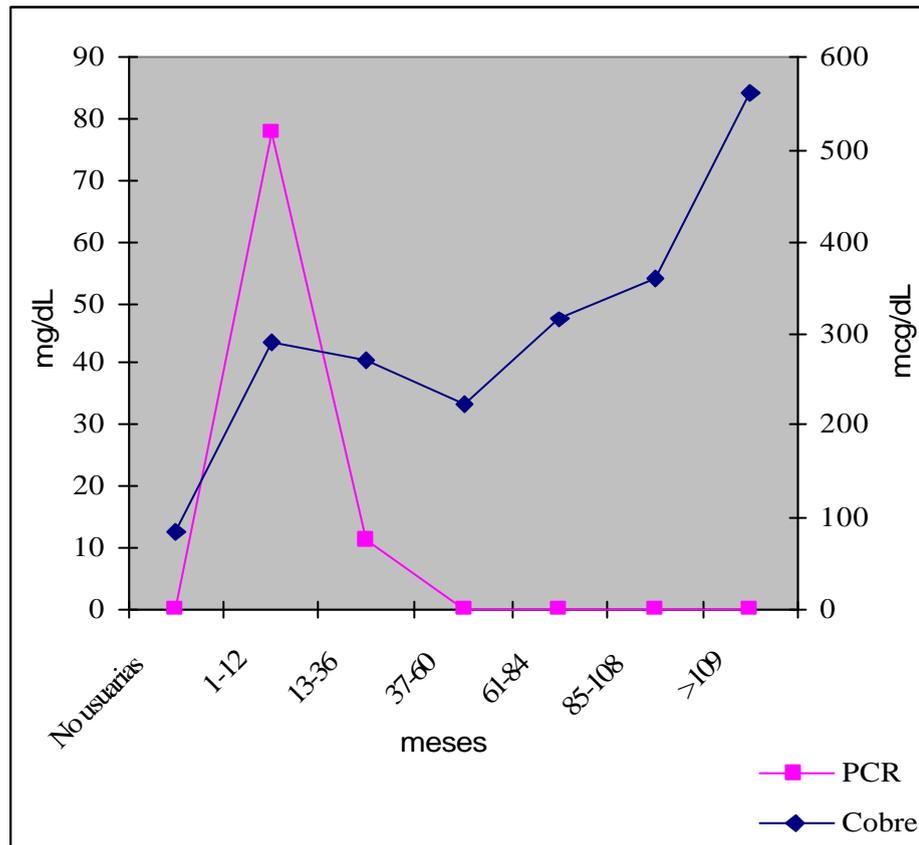
Gráfica 6. Correlación de la concentración de Ceruloplasmina y cobre en suero, según el tiempo de uso del DIU TCu380A. Los Reyes La Paz, Estado de México. 2005-2006.



Fuente: Cuadro 4 y 7

Las concentraciones de la ceruloplasmina se encuentran elevadas desde el primer mes de uso del DIU presentando el mayor pico de incremento a los 85 meses, la correlación entre el incremento de las concentraciones del cobre y las de ceruloplasmina fue del 50% (Cuadro 11), por lo que el aumento de la ceruloplasmina se observa relacionado al alto contenido de cobre, sin importar el tiempo de uso.

Gráfica 7. Correlación de la concentración de PCR y cobre en suero, según el tiempo de uso del DIU TCu380A. Los Reyes La Paz, Estado de México. 2005-2006.



Fuente: Cuadro 4 y 10

En la gráfica se muestra como las concentraciones de PCR se elevan en un periodo de tiempo de 1 a 12 meses, y comienzan a disminuir a partir de los 13 meses, llegando hasta cero a partir de los 37 meses en adelante, la correlación que existe entre el incremento de la proteína con las concentraciones del cobre de acuerdo al tiempo de uso del DIU, no es significativa.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1. Población

En este estudio se eliminaron variables que pudieran interferir en los resultados, como son la ingesta de medicamentos y alcohol, así como la presencia de obesidad y diabetes mellitus. Diversos estudios indican que estas variables tienen estrecha relación con la presencia de hígado graso lo que contribuye al incremento de las enzimas ALT, AST y GGT en la circulación sanguínea debido a que las células del hígado se dañan. ^(58,59,60,61,62)

Se aplicó un cuestionario a las personas que voluntariamente quisieron participar en este estudio, a partir de lo cual fueron seleccionadas las mujeres que cumplían con los criterios de inclusión, así mismo, para corroborar estos resultados se les determinó glucosa, hemoglobina e índice de masa corporal ^(63,64) y se controló que no estuvieran consumiendo medicamentos ni cantidades superiores a 30g de alcohol por día, ⁽⁶⁵⁾ por lo que puede reiterarse que todas las mujeres participantes cumplieron con los requisitos.

Algunos autores como Mondragón C, reportan que el tiempo de uso del DIU TCu380A en el cual este presenta una mayor eficacia es un periodo de 36 a 60 meses al término del cual debe ser retirado y sustituido por uno nuevo; ⁽¹⁰⁾ en nuestra investigación se muestra que la mayor frecuencia de uso se encuentra en el periodo sugerido; no obstante, hubo mujeres que presentaban más de 109 meses de uso del dispositivo.

8.2. Cobre en suero

La media de cobre en sangre de las mujeres no usuarias, participantes en este estudio, es inferior a las medias encontradas en población general de la República Checa, Alemania y Santiago de Chile donde se registraron niveles de 97, 99.37 y 130.9 $\mu\text{g/dL}$ respectivamente. ^(66,67,68) En términos generales podemos afirmar que tanto el valor

mínimo como el máximo se encuentran dentro de los valores de referencia en suero que son entre 70 y 140 $\mu\text{g/dL}$.^(69,70)

En el caso de la concentración de cobre en suero de las mujeres usuarias del DIU TCu380A es diferente. Encontramos una media que es aproximadamente, tres veces superior al valor mínimo de referencia y dos veces superior al valor máximo. Se sabe que el cobre es un elemento indispensable para la vida; no obstante, en cantidades superiores al óptimo recomendado se convierte en tóxico, encontrando que cuando las concentraciones de cobre en suero son de 80 a 200 $\mu\text{g/dL}$, debido a una exposición crónica, hay un incremento de las alfa globulinas, eritrocitos y hemoglobina. Así mismo, cuando estas concentraciones son superiores a los 200 $\mu\text{gCu/dL}$ se encuentran entre otras alteraciones, hígados dilatados y distensión abdominal.⁽⁷¹⁾ En el caso de las usuarias de DIU en esta investigación, sus valores de hemoglobina se encontraron dentro de los de referencia.

El almacenamiento de cobre por parte del hígado tiene sus límites. La metalotioneina (MT) es la proteína clave para almacenar el cobre en los tejidos, especialmente en el hígado. Al sobrepasarse la capacidad de almacenar cobre por la MT, se producen fenómenos oxidativos ya sea en el hepatocito o en las células del retículo endotelial (RE) del hígado, las cuales atrapan el complejo cobre-MT liberado por las células hepáticas y a su vez sufren fenómenos oxidativos que las llevan a liberar citoquinas que precipitan el daño hepático en forma aguda.⁽⁷²⁾

En la situación particular de las mujeres participantes en este estudio desconocemos el grado de daño hepático que pudieran presentar, pero los niveles de cobre en sangre que presentan las usuarias de este dispositivo son mayores a los presentados por las no usuarias. Esta absorción ocurre de manera constante y probablemente bajo la forma de sulfato cúprico o cuproso, debido a la composición del moco uterino, estos valores altos de ceruloplasmina muestran que hay una presencia elevada de cobre en sangre, el cual esta

siendo almacenado en hígado, produciendo una alteración progresiva de transaminasas a través del tiempo de uso del dispositivo.

8.3. Enzimas hepáticas

Existen marcadores citotóxicos llamados isoenzimas hepáticas (ALT, AST y GGT) las cuales son de origen citosólico y su presencia en suero se relaciona con la gravedad del daño celular, indicando la extensión de la irreversibilidad del daño en la destrucción o disfunción de los hepatocitos. Estas enzimas también pueden encontrarse incrementadas en casos de daño o padecimientos de cerebro, corazón, hígado y riñones. Pero el incremento de la enzima ALT es específica de lesión hepática, de manera particular cuando se encuentra en una proporción mayor que la AST y GGT, ⁽⁷³⁾ y la confirmación de ello se puede establecer por la proporción de AST/ALT ^(59,75) la cual da positivo para los datos manejados en la presente investigación.

Las investigaciones experimentales realizadas por exposición controlada a cobre se han realizado, por lo general en animales, encontrándose que en cabras de 34 kilogramos de peso en promedio se produce un incremento de las concentraciones normales de estas enzimas (58.0 ± 11.44 de ALT y 38.9 ± 4.26 de GGT) a partir de una exposición de 300 mg Cu por día donde el investigador concluyó que a partir de esta dosis se produce daño hepático severo en estos animales. ⁽⁵²⁾ En el caso particular de nuestros resultados en usuarias del dispositivo, las concentraciones son análogas a las antes citadas a partir de los 37 meses.

En estudios como el de Araya y cols., se llevó a cabo un análisis experimental de la exposición gástrica a cobre en humanos (< 0.01, 2, 4, y 6 mg Cu/L), no indujo alteración de las concentraciones normales de este elemento, concluyó que no se producen cambios perceptibles después de dos meses en relación al comportamiento de la actividad de las enzimas hepáticas. Los valores determinados estuvieron en el rango de 28 a 32 U/L para

ALT, de 21 a 23 para AST y de 23 a 28 para GGT. ⁽⁵³⁾ Estos valores son similares a los encontrados en las no usuarias del DIU TCu380A.

Sin embargo, en el caso de las mujeres que han usado el dispositivo por más de 36 meses los valores encontrados para AST, ALT y GGT son superiores a los de referencia. Ello significa que podemos estar frente a casos de daño hepático. ⁽⁷⁶⁾ Incluso si tomamos en consideración criterios como los de Ruhl y cols., ⁽⁷⁷⁾ o bien los manejados en el estudio de George y cols., llevado a efecto en el 2006 quienes utilizan una concentración de ALT >43 U/L y de AST > 40 IU/L como sustitutos para diagnosticar la enfermedad del hígado graso en no alcohólicos, ⁽⁷⁸⁾ cuando el valor de referencia para esta enzima es de 0-32 U/L, podríamos afirmar que más del 50% de las mujeres participantes en este estudio serían diagnosticadas con daño hepático.

Las usuarias del DIU TCu380A presentan fatiga e inflamación en vientre y de abdomen, así como dolor de cabeza, que tomados como complemento de los datos clínicos de la elevación de enzimas hepáticas también resultan de utilidad para construir de manera más completa el cuadro clínico de las mujeres participantes en el presente estudio, ⁽³⁹⁾ estos signos y síntomas también orientan hacia el diagnóstico de daño hepático. ⁽³⁷⁾

8.4. Ceruloplasmina

La exposición crónica a compuestos de cobre en cantidades ligeramente más altas de las requeridas, puede causar una mayor acumulación de éste en los tejidos, que se manifiesta en cambios fisiológicos y alteraciones metabólicas en hígado, entre otros órganos. ^(16,17,18,39,40,41)

Uno de los cambios fisiológicos es el incremento de la ceruloplasmina, que en este estudio encontramos en cantidades superiores en las usuarias del mencionado dispositivo en relación a las no usuarias

Discusión de resultados

La ceruloplasmina se determinó en este estudio para poder corroborar la presencia de cobre en sangre. Se ha estimado que el 90% del Cu incorporado a través de la dieta está unido a ceruloplasmina (Cp) luego de pasar por la circulación portal. ⁽²⁴⁾ La Cp pertenece a la familia de las oxidasas con múltiples átomos de Cu. Esta proteína de 132 kDa presenta 6 sitios de unión a Cu. Su estructura es muy similar a la Fet3, una oxidasa de levaduras con múltiples átomos de Cu que es esencial para la absorción de alta afinidad. ⁽²⁶⁾ Dada la alta abundancia de Cp en el suero, y su alto contenido de Cu, varios investigadores han propuesto a esta proteína como la principal fuente de Cu celular. Sin embargo, la biodisponibilidad del Cu que contiene Cp es controversial. Linder y cols, sostienen que el Cu radiactivo que se incorpora por la dieta es unido inicialmente a moléculas como la albúmina y la transcupreína y que en una segunda fase, luego de pasar por el hígado, más del 90% esta unido a Cp. ⁽²⁴⁾ Por otro lado, Meyer y cols, realizaron estudios en ratones aceruloplasminémicos, donde no observaron diferencias en la absorción gastrointestinal de Cu, la absorción hepática, la excreción biliar, ni el contenido de Cu en tejidos como cerebro, corazón, vesícula o riñón respecto a los ratones silvestres. Pero sí encontraron una aumentada concentración de Cu en el hígado de los ratones, consecuente con la idea de que el Cu hepático es utilizado en la biosíntesis de Cp. El 10% restante del Cu no unido a Cp está unido a otras proteínas o aminoácidos principalmente albúmina, transcupreína o histidina. ⁽³⁰⁾ En estudios de cultivos primarios de hepatocitos se muestra que la absorción de Cu en presencia de histidina es mayor a la absorción de Cu solo o en presencia de albúmina. ^(27,28)

La disponibilidad del Cu unido a ceruloplasmina es baja debido a que la vida media del Cu es similar a la vida media de la proteína. ⁽³⁰⁾ Por tal motivo, se considera que el Cu bio-disponible es el Cu-noCp (unido a albúmina o aminoácidos como Histidina), el que se calcula alcanza una concentración plasmática de 1,5 y 5 μM . ⁽³¹⁾

Los niveles normales de Cp en suero de mujeres son de 40.9 mg/dL (\pm 6.8), los niveles altos de ceruloplasmina sérica se presentan en embarazo, en las infecciones agudas y

crónicas, en infarto al miocardio, cancer, leucemias, tirotoxicosis y cirrosis hepática, la administración de estrógenos también significa niveles altos. ⁽⁷⁹⁾ Investigadores como Gault y col., observaron que en ausencia de embarazo o administración de estrógenos, una ceruloplasmina superior a 65 mg/dL significaba generalmente trastornos del hígado. ⁽²¹⁾ Algunos otros como Rice, nombran que la Cp alta presenta una reacción de fase aguda, comparable al fibrinógeno, proteína C reactiva y el ácido salicílico. ^(80,81) No obstante en el presente estudio las concentraciones de ceruloplasmina en usuarias es más del doble de la determinada en las no usuarias, lo que también confirma la presencia de posible daño hepático.

En esta investigación los niveles de ceruloplasmina se presentaron mayores a los establecidos como referencia en las mujeres usuarias de DIU presentando una significancia ($p < 0.05$), el tiempo de uso del dispositivo entre las usuarias no resultó significativo, lo cual nos muestra que no importa el tiempo de uso del dispositivo para presentar concentraciones elevadas de Cp, sino que el cobre liberado del DIU es absorbido a través de las paredes del útero, desde su colocación.

La Cp tiene una actividad antioxidante, ⁽⁸²⁾ es catalogada como anti- inflamatorio de fase aguda ⁽⁸³⁾ y tiene un papel activo en la regulación de la homeostasis del cobre y del hierro. ⁽⁸²⁾ La concentración en plasma puede ser de dos a tres veces mayor durante procesos inflamatorios, el embarazo y otros estados patológicos. ^(84,85)

8.5. Proteína C reactiva

La inflamación es un fenómeno complejo en el que se han descrito una gran cantidad de alteraciones sistémicas asociadas. A pesar de que estos cambios pueden observarse tanto en la inflamación aguda como en la crónica, se les conoce en general como respuesta de fase aguda. Entre los cambios de fase aguda más importantes se encuentran las alteraciones

en la concentración de un grupo de proteínas séricas denominadas reactantes de fase aguda.⁽⁸⁶⁾ Éstas se definen como aquellas proteínas plasmáticas cuya concentración aumenta por lo menos un 25% durante el fenómeno inflamatorio. Una de ellas, la proteína C reactiva (PCR), puede aumentar hasta 1000 veces su concentración. La PCR y otras proteínas de fase aguda se originan en el hepatocito, secundariamente al estímulo de citocinas como interleucina 6, interleucina 1 β , factor de necrosis tumoral e interferón- γ entre otras. Las citocinas poseen un complejo sistema de interacción entre sí y con diversos sistemas; participan en el desarrollo de las manifestaciones más visibles y conocidas de la inflamación, como la fiebre, la somnolencia, la letargia o la anorexia. La función de las proteínas de fase aguda es poco conocida. Se sabe que algunas pueden tener efectos proinflamatorios, en tanto que otras inhiben este proceso. La PCR, por ejemplo, posee la propiedad de ligarse a la fosfocolina y reconocer patógenos externos.⁽⁸⁷⁾

También posee otros efectos como inhibir la adhesión de los leucocitos a la pared endotelial, inhibir la generación de superóxidos en los neutrófilos, y estimular en los monocitos la síntesis de citocinas inflamatorias y factor tisular. Algunas de estas propiedades son probablemente importantes para inhibir el proceso inflamatorio.⁽⁸⁸⁾

En cambio, la PCR no está sujeta a estas influencias, por lo que se ha transformado en un parámetro más fiable para la estimación o el seguimiento de la inflamación, ya que su concentración aumenta desde procesos inflamatorios menores como los traumas, hasta enfermedades como fiebre reumática, es por ello que ha sido denominada como marcador de alta sensibilidad.⁽⁸⁹⁾

La PCR fue encontrada en concentraciones elevadas en 11 de las 20 mujeres pertenecientes a los grupos de 1 a 12 y de 13 a 36 meses del presente estudio y puede estar asociada, como lo afirma Enriquez D, a cualquier infección o traumatismo.⁽⁹⁰⁾ En el caso particular de esta investigación, esto puede estar asociado al trauma que ocurre debido a la inserción

del DIU, ya que 7 de 8 mujeres pertenecientes al grupo de 1 a 12 meses presentaron concentraciones hasta de 96 mg/dL. Así mismo, si consideramos que el DIU es un elemento extraño en el cuerpo de la mujer usuaria se puede aseverar que produce inflamación aguda al menos en los primeros meses después de la inserción.

La inflamación aguda que puede producir el DIU contribuye a que se facilite un proceso infeccioso debido a la presencia de bacterias en el tracto genital superior, el cual rompe la integridad del moco cervical y del endometrio disminuyéndose las defensas.⁽⁹¹⁾ Lo que constituye un riesgo para desarrollar enfermedad pélvica inflamatoria (EPI). Esto podría explicar la elevación de la proteína en más del 50% de las mujeres pertenecientes al grupo de usuarias de 1 a 36 meses.

Se sabe que la EPI se presenta después de la inserción del DIU, aunque el periodo en el que se presenta esta en discusión. Investigadores como Faundes A,⁽⁹²⁾ Sinei SK,⁽⁹³⁾ Pap-Akeso M,⁽⁹⁴⁾ Walsh TL,⁽⁹⁵⁾ McCormack WM⁽⁹⁶⁾ y Morrison CS,⁽⁹⁷⁾ han realizado estudios al respecto en diversos países y cada uno ha expresado un periodo distinto respecto a los otros, que van desde 1 hasta 24 meses. Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran que la presencia de PCR predomina en un periodo de tiempo de 1 a 36 meses, en los que probablemente se esta presentando una EPI.

8.6. Correlación

Las concentraciones de cobre que se obtuvieron en esta investigación muestran que el DIU TCu 380A libera cobre a partir de su inserción, el cual esta pasando al torrente sanguíneo, por lo que las concentraciones en suero se presenta elevada, estas concentraciones fueron mayores que las encontradas anteriormente en la investigación realizada por De La Cruz y

Discusión de resultados

cols. ⁽⁶⁾ Al realizar los análisis estadísticos, se observó que el tiempo de uso del DIU tiene influencia con el incremento de las concentraciones encontradas en suero.

Al correlacionar estas concentraciones con el de las enzimas hepáticas, observamos que conforme va transcurriendo el tiempo de uso del DIU las enzimas ALT, AST y GGT también van incrementándose, mostrando una correlación significativa. Es a partir de los 37 meses cuando las enzimas se presentan fuera de los valores de referencia, es también en ese tiempo cuando el cobre comienza a presentar un incremento mayor en sus concentraciones. Si tomamos en consideración que las concentraciones de cobre en sangre representan la cantidad que se ha almacenado en el hígado, ⁽⁹⁸⁾ y que este tiene sus límites de almacenamiento, ⁽²⁰⁾ entonces decimos que por el exceso de cobre almacenado se está produciendo un desequilibrio homeostático, aún cuando el organismo cuenta con mecanismos muy poderosos de autorregulación, al romperse este equilibrio aparecen alteraciones que repercuten en la salud del ser humano. ⁽¹⁹⁾

El organismo cuenta con sofisticados sistemas de defensa antioxidante para neutralizar el efecto de cobre y protegerse de las consecuencias dañinas producidas por este elemento, en una sobrecarga de cobre se presenta alteración en la fragilidad lisosomal, se disminuye la fluidez de la membrana, se altera la composición de ácidos grasos en las membranas y se cataliza la peroxidación de lípidos, dando por resultado la vasta debilitación en la función y la integridad celular de los hepatocitos; ^(99,100) por ello que el hígado al detectar las concentraciones elevadas de cobre comienza a producir concentraciones elevadas de ceruloplasmina, para poder regular la cantidad de cobre, ya que la Cp atrapa hasta 8 moléculas de Cu/molécula de Cp, además, tiene una actividad antioxidante y es catalogada como anti-inflamatorio de fase aguda que puede tener un papel activo en la regulación de la homeostasis del cobre y del hierro. ⁽⁸²⁾ Por esta razón las concentraciones en suero puede ser de dos a tres veces mayor durante la inflamación, el embarazo y otros estados patológico. ^(84,85) Se ha visto en diversos trabajos realizados su elevación en suero cuando hay procesos inflamatorios, infecciones o necrosis, y se considera que refleja el intenso estrés oxidativo presente durante éstos procesos.

Es por ello que la correlación entre el tiempo de uso del DIU y el incremento de la ceruloplasmina es muy baja, porque esta se produce desde el inicio de la inserción del DIU y sus concentraciones se mantienen casi constantes en los diferentes tiempos de uso.

En el caso de la PCR el incremento en las usuarias del DIU se debe a la inflamación que se produce por insertar un cuerpo extraño al organismo, así como también puede estar relacionado a procesos infecciosos por el uso del DIU, aunque la PCR es una proteína que se produce en hígado y el aumento podría manifestar un desequilibrio del hígado, pero no es específica para diagnosticar daño.

Con todo esto podemos decir que el cobre liberado por los DIU's genera la peroxidación lipídica de las membranas hepáticas y la disfunción mitocondrial, induciendo la liberación de la ALT, AST y GGT a la circulación sanguínea, provocando aumento de estas enzimas en suero. ⁽¹⁸⁾ Lo cual refleja el daño que esta causando al hígado.

IX. CONCLUSIONES

1. Las concentraciones de cobre en suero de las mujeres usuarias del DIU TCu380A se presentan elevadas desde el inicio de su inserción y en cantidades superiores a los valores de referencia. Esta elevación se observa influenciada por el tiempo de uso del DIU.
2. Las mujeres usuarias del DIU TCu380A presentan concentraciones de ALT, AST, GGT, PCR, Cp superiores a los valores presentados por las no usuarias.
3. Las concentraciones de las enzimas hepáticas ALT, AST y GGT, de las mujeres usuarias del DIU TCu380A son superiores a los valores de referencia, a partir de los 37 meses de uso.
4. Las concentraciones de cobre en suero de las mujeres usuarias del DIU TCu380A, se correlaciona con las concentraciones de las enzimas hepáticas y ceruloplasmina presentando significancia a partir de los 37 meses de uso.
5. La PCR está presente sólo en los primeros 36 meses de uso del DIU TCu380A.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional de Estadísticas. Estadísticas Históricas de México. México. 1990; Tomo I:3-15.
2. Guler AH, Sapan N, Ediz B, Genc Z, Ozkan K. Effect of copper on liver and bone metabolism in malnutrition. *Turk J Pediatr.* Jul-Sep 1994; 36:205-13.
3. Fuentealba IC, Mullins JE, Aburto EM, Lau JC, Cherian GM. Effect of age and sex on liver damage due to excess dietary copper in Fischer 344 rats. *J Toxicol Clin Toxicol.* 2000; 38:709-17.
4. Aburto EM, Cribb AE, Fuentealba IC, Ikede BO, Kibenge FS, Markham F. Morphological and biochemical assessment of the liver response to excess dietary copper in Fischer 344 rats. *Can J Vet Res.* Apr 2001; 65:97-103.
5. Sidhu P, Garg ML, Morgenstern P, Vogt J, Butz T, Dhawan DK. Role of zinc in regulating the levels of hepatic elements following nickel toxicity in rats. *Biol Trace Elem Res.* 2004; 102:61-72.
6. De la Cruz D, Cruz A, Arteaga M, Castillo L, Tovalín H. Blood copper levels in Mexican users of the T380A IUD. *Contraception.* 2005; 72:122-5.
7. Calabrese L, Malatesta F, Barra D. Purification and properties of bovine ceruloplasmin. *Biochem J.* 1981; 199:667-673.
8. Ehrenwald E, Paul L, Fox. Isolation of Nonlabile Human Ceruloplasmin by Chromatographic Removal of a Plasma Metalloproteinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* March 1993; 309:392-395.
9. Marroquín R, Flores M. Manual de laboratorio de inmunología básica y clínica. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. 2002; 23-25, 48-49.
10. Mondragón CH. Planificación Familiar en: Gineco-Obstetricia para Enfermeras. 2ª ed. México: Trillas; 1991:461-66.
11. Family Health Internacional: Las mujeres y la planificación familiar. *Network en español.* 1994; 9:5-20.
12. Family Health Internacional: Dispositivos Intrauterinos. *Network en español.* 1996; 16 Supl 2:4-28.

13. Deux S. Métodos Anticonceptivos. En: Anticoncepción. 2 ed. Barcelona: Salvat; 1989.
14. Ozcelik D, Ozaras R, Gurel Z, Uzun H, Aydin S. Copper-mediated oxidative stress in rat liver: Biol Trace Elem Res 2004; 97 Supl 2:195.
15. Halliwell B, Gutteridge JM. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press; 1999:428-496.
16. Pankit AN, Bhave SA. Copper metabolic defects and liver disease: Environmental aspects J Gastroenterol Hepatol. 2002 Dec; 17 Supl 3:S403-07.
17. Britton RS. Metal-induced hepatotoxicity. Semin Liver Dis 1996; 16 Supl 1:3-12.
18. Ford ES. Serum copper concentration and coronary heart disease among US adults. Am J Epidemiol. 2000; 151:1182-88.
19. Llanos R, Mercer. The Molecular Basis of Copper Homeostasis and Copper-Related Disorders. DNA and Cell Biology. 2002; 21 Supl 1 4: 259-70.
20. Harris E. Basic and Clinical Aspects of Copper: Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 2003; 40 Supl 1 5: 247-86.
21. Gault M, Stein J, Aronoff A. Serum ceruloplasmin in hepatobiliary and other disorders: Significance of abnormal values. Gastroenterology. 1996; 50: 8.
22. Milne D. Copper intake and assessment of copper status. Am J Clin Nutr. 1998; 67 Supl 8:1041S-5S.
23. Pandit A, Bhave S. Copper metabolic defects and liver disease: Environmental aspects. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2002; 17:S403-S407.
24. Linder MC, Wooten L, Cerveza P, Cotton S, Shulze R, Lomeli N. Copper transport. Am J Clin Nutr. 1998; 67: 965S-971S.
25. Zaitsev VN, Zaitseva I, Papiz M, Lindley PF. An X-ray crystallographic study of the binding sites of the azide inhibitor and organic substrates to ceruloplasmin, a multi-copper oxidase in the plasma. J Biol Inorg Chem. 1999; 4: 587-79.
26. Blackburn NJ, Ralle M, Hassett R, Kosman DJ. Spectroscopic analysis of the trinuclear cluster in the Fet3 protein from yeast, a multinuclear copper oxidase. Biochemistry. 2000; 39: 2316-2324.
27. McArdle HJ, Gross SM, Danks DM. Uptake of copper by mouse hepatocytes. J Cell Physiol. 1988; 136: 373-378.

28. Darwish HM, Schmitt RC, Cheney JC, Ettinger MJ. Copper efflux kinetics from rat hepatocytes. *Am J Physiol.* 1984; 246: G48-55.
29. Linder MC. Biochemistry and Molecular Biology of Copper in Mammals. En E.J. Massaro (eds), *Handbook of Koper Pharmacology and Toxicology.* Human Press, New Jersey. 2002; 3 – 32.
30. Meyer LA, Durley AP, Prohaska JR, Harris ZL. Copper transport and metabolism are normal in aceruloplasminemic mice. *J Biol Chem.* 2001; 276: 36857-36861.
31. Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, et al. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature.* 1997; 390: 684-687.
32. Menéndez M. Toxicología del cobre. *Toxicología.* 1987; 4: 101-120.
33. Reilly C. *Metal Contamination of Food.* Applied Science Publisher. 1980.
34. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Laboratorio Clínico-Cifras Normales. Subdirección General Médica. México 1973; 73.
35. Asch R. Avances en reproducción humana. Sociedad Argentina de Esterilidad y Fertilidad. Medica Panamericana. Buenos Aires. 1988: 99-105.
36. OMS. Directives de Qualité pour L'Eau de Boisson. Critères d'hygiène et Documentation à l'appui. Genève. 1986; 2.
37. Roberts RH. *Sanidad Alimentaria.* Zaragoza. Acribia. 1981.
38. Segunda Reunión Internacional. Copper Transport and Its Disorders: Molecular and Cellular Aspects. Ravello Italia 1999. Sep: 17-22.
39. Arthur JR, Beckett GJ. Thyroid function. *Br Med Bull.* 1999; 55 Supl 3:658-68.
40. Yang CC, Wu ML, Deng JF. Prolonged hemolysis and methemoglobinemia following organic copper fungicide ingestion. *Vet Hum Toxicol.* Dec 2004; 46 Supl 1 6:321-3.
41. Haywood S, Muller T, Mackenzie AM, Muller W, Tanner MS, Heinz-Erian P. Copper-induced hepatotoxicosis with hepatic stellate cell activation and severe fibrosis in North Ronaldsay lambs: a model for non-Wilsonian hepatic copper toxicosis of infants. *J Comp Pathol.* May 2004; 130 Supl 1 4:266-77.
42. Havey D. *Modern Analytical Chemistry.* Mc Fraw Hill. USA 2000: 412-418.
43. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.* Espectrofotometría de absorción y emisión atómica. 5ª ed. México: Secretaría de Salud; 1988: 144-146.

44. López PL, López L, Hernández J. Determinación de cobre por espectrofotometría. 1999: 548-553.
45. Ramzi S, Vinay K, Tucker C. Patología Estructural y Funcional. 6 ed. Madrid: Interamericana Mc Graw-Hill; 2003: 882-5.
46. Chandrasoma P. Cliver R. Patología General. Santafé de Bogotá: El manual moderno; 1994: 693-9.
47. Ángel G, Ángel M. Interpretación Clínica de Laboratorio. México D.F: Médica Panamericana; 2000: 239, 441-3.
48. Lynch MJ. Métodos de laboratorio. México: Interamericana; 1988: 1187-1254.
49. Davidson I. Diagnóstico clínico para el laboratorio. Barcelona: Salvat; 1983: 987-92.
50. Todd-Sanford. Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio. Barcelona: Salvat; 1991: 156-62.
51. Hyghleyman L. The medicaments and the liver. 2003: 1-5.
52. Solaiman S.G, Maloney M.A, Qureshi G, Davis G, Andrea D. Effects of copper supplements on performance, health, plasma copper and enzymes in goats. Elsevier Science BV. 2001; 41: 127-139.
53. Araya M, Olivares M, Pizarro F, González M, Speisky H, Uauy R. Gastrointestinal symptoms and blood indicators of copper load in apparently healthy adults undergoing controlled copper exposure. Am J Clin Nutr. 2003; 77: 646-50.
54. Schenker JH, Jungreis E, Polishuk WZ. Oral contraceptives and serum copper concentration. Obstet Gynecol. Feb 1971; 37 Supl 2: 233-7.
55. Tercera Reunión Internacional Copper Homeostasis and Its Disorders: Molecular and Cellular Aspects. Copper Transport and Its Disorders: Molecular and Cellular Aspects. Ischia Italia. Oct 2002: 4-8.
56. Márquez de Cantú MJ. Probabilidad y Estadística: para Ciencias Químicas Biológicas. Escuela Nacional de Estudios profesionales Zaragoza. 1993: 600-680.
57. Estadística Práctica para el Análisis de Datos SPSS 14. 2003.
58. Itoh S, Yougel T, Kawagoe K. Comparison between non-alcoholic steatohepatitis and alcoholichepatitis. Am J Gastroenterol. 1987; 82: 650-654.

Referencias bibliográficas

59. Sabonge AR. Prevención primaria de las enfermedades hepáticas. Gastroenterología Preventiva. 1ª ed. Portobelo: El Campus; Nov 2000: 21.
60. Diehl AM, Goodman Z, Ishak KG. Alcohol-like liver disease in nonalcoholics. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. Gastroenterology. 1988; 95: 1056-1062.
61. Reichen J. NASH. Revised. Aug 2002.
62. Moreno D. Esteatohepatitis no alcohólica. An Med intern. Madrid 1989; 6: 100-103.
63. Wikimedia Foundation. Índice de masa corporal (IMC). Copyright (C) 2000,2001,2002 Free Software Foundation, Inc. 51 Franklin St, Fifth Floor, Boston. Esta página fue modificada por última vez el 15 Abr del 2007. (Consultada el 20 de Abr del 2007). Disponible en <http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81>. Número normalizado MA 02110-1301 USA.
64. Braillon A, Capron JP, Hervé MA, Degott C, Quenun C. Liver in obesity. Gut. 1985; 26: 133-139.
65. Bellantini et als. Ann Int Med. 2000; 132: 112-117.
66. Benes B, Spevackova V, Smid J, Batariova A, Cejchanova M, Zitkova L Effects of age, BMI, smoking and contraception on levels of Cu, Se and Zn in the blood of the population in the Czech Republic. Cent Eur J Public Health. Dec 2005; 13 Supl 4: 202-7.
67. Rukgauer M, Klein J, Kruse-Jarres JD. Reference values for the trace elements copper, manganese, selenium, and zinc in the serum/plasma of children, adolescents, and adults. J Trace Elem Med Biol. Jun 1997; 11 Supl 2: 92-8.
68. Reyes H, Baez ME, Gonzalez MC, Hernandez I, Palma J, Ribalta J, et al. Selenium, zinc and copper plasma levels in intrahepatic cholestasis of pregnancy, in normal pregnancies and in healthy individuals, in Chile. J Hepatol. Apr 2000; 32 Supl 4: 542-9
69. Gonzalez J, Garcia S, Menchen S, Fernandez E. Biological variation of Zn, Cu, and Mg in serum of healthy subjects. Clin Chem. 1990; 36: 2140– 2170.
70. Repetto MR, Repetto YM. Tabla de valores de referencia en fluidos biológicos. Instituto Nacional de Toxicología de Sevilla. 2000.

Referencias bibliográficas

71. Suciú L, Lazar V, Ilea E. Copper poisoning in the workwrs from a selection of copper electrolysis. En *Enviromental Pollution and Human Health. Toxicology Research Center. Lucknow Indian.* 1984: 212.
72. Da Costa Ferreira A M, Ciriolo MR, Marcocci L, Rotilio G. Copper(I) transfer into metallothionein mediated by glutathione. *Biochem J.* 1993; 292: 673-676.
73. Moitinho E, Bruguera M. Protocolo diagnóstico de las elevaciones agudas de las transaminasas. *Medicine.* 1996; 9: 379-381.
74. Sort I, Jané P. Protocolo diagnóstico ante elevación crónica de las transaminasas. *Medicine.* 1996; 9: 382-5.
75. Nanji A, Frech S, Freeman J. Serum alanine aminotransferase to aspartate aminotransferase ratio and negree of fatty liver in morbidly obese patients. *Enzyme.* 1986; 36: 266-269.
76. Bogden J, Klevay M. *Clinical Nutrition of the Essential Trace Elements and Minerals.* Human Press Inc. New Jersey USA. 2000.
77. Ruhl CE, Everhart JE. Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology.* 2003; 124: 71-9.
78. George N, Ioannou MD, Edward J, Boyko MD. The Prevalence and Predictors of Elevated Serum Aminotransferase Activity in the United States in 1999-2002. *The American Journal of Gastroenterology.* January 2006; 101 Supl 1: 76-82.
79. Bearn A. Wilson´s diseases. En *Stanbury. J Med.* 1966: 275-374.
80. Rice E. Evaluation of the role of ceruloplasmina as an acute phase reactant. *Chin Chim.* 1961a; Acta 6: 652.
81. Rice E. Astudy on correlations between C-reactive protein and certain other acute-phase reactants. *Chin Chim. Acta 6;* 170: 1961b.
82. Goode CA, Dinh CT, Linder MC. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1989; 258: 133-141.
83. Vulpe C, Levinson B, Whitney S, Packman S, Gitschier J. Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat Genet.* 1993; 3:7-13.
84. Fraser WD, Taggart DP, Fell GS, Lyon TD, Shenkin A. *Clin Chem.* 1989; 35: 2243-2247

Referencias bibliográficas

85. Ganapathi MK, Schults D, Mackiewicz A, Samols D, Kushner I. J Immunol. 1988; 141: 564-569.
86. Morley JJ, Kushner I. Serum C-reactive protein levels in disease. Ann NY Acad Sci. 1982; 389: 406-418.
87. Bazzinoa Óscar. Valor pronóstico de la determinación de la proteína C reactiva en la angina inestable a Servicio de Cardiología. Hospital Italiano de Buenos Aires. Argentina. Rev Esp Cardiol. 2001; 54: 1 - 6ISSN : 1579-2242.
88. Cermak J, Key NS, Bach RR, Balla J, Jacob HS, Vercellotti GM. C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. 1993; 82: 513-520.
89. King DE, et al. C-reactive protein and glycemic control in adults with diabetes. Diabetes care, 2003; 26 Supl 5: 1535-1539.
90. Enriquez B, Fuentes L, Gutierrez N, et al. Clínica y nuevas tecnologías diagnósticas en el embarazo ectópico. Rev Cubana Obstet Ginecol. sep-dic 2003; 29: ISSN 0138-600X.
91. Instituto Materno Infantil. Departamento de Obstetricia y Ginecología. Enfermedad pélvica inflamatoria. Edith Ángel Müller. Guidelines. Bogotá 2002: (Consultada el 22 de Abr 2007). Vol 51. Acceso en <http://www.fepafem.org> No. RR06.
92. Faundes A, Telles E, Cristofolletti ML, Faundes D, Castro S, Hardy E. The risk of inadvertent intrauterine device insertion in women carriers of endocervical Chlamydia trachomatis. Contraception. 1998; 58:105-9.
93. Sinei SK, Schulz KF, Lamptey PR, et al. Preventing IUCD-related pelvic infection: the efficacy of prophylactic doxycycline at insertion. Br J Obstet Gynaecol 1990;97:412-9.
94. Pap-Akeson M, Solheim F, Thorbert G, Akerlund M. Genital tract infections associated with the intrauterine contraceptive device can be reduced by inserting the threads into the uterine cavity. Br J Obstet Gynaecol 1992;99:676-9
95. Walsh TL, Bernstein GS, Grimes DA, et al. Effect of prophylactic antibiotics on morbidity associated with IUD insertion: results of a pilot randomized controlled trial. Contraception 1994; 50: 319- 27.
96. McCormack WM. Pelvic inflammatory disease. N Engl J Med. 1992; 30:115.

Referencias bibliográficas

97. Morrison CS, Sekadde-Kigundu C, Miller WC, Weiner DH, Sinei SK. Use of sexually transmitted disease risk assessment algorithms for selection of intrauterine device candidates. *Contraception* 1999; 59: 97– 106.
98. Solís JA, Vidal JV, Colina F, Castellano G, Muñoz MT, Morillas JD. Clinic-biochemical evolution and late hepatic lesions in the toxic oil syndrome. *Gastroenterology*. 1987; 93: 558-568.
99. Britton RS. Metal-induced hepatotoxicity. *Sem Liv Dis*. 1996; 16: 3-12.
100. Myers BM, Prendergast FG, Holman R, et al. Alterations in hepatocyte lysosomes in experimental hepatic copper overload in rats. *Gastroenterology* 1993; 105: 1814-23.

XI. ANEXOS

11.1. Cuestionario para la inclusión de donadoras

Nombre: _____

Edad: _____ Peso _____ Kg. Talla: _____ m Ocupación: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____ Fecha: _____

1. Consumo de bebidas alcohólicas en un mes:

a) 0 días	b) 1-3 días	c) 4-6 días
d) 7-10 días	e) 11-15 días	f) más de 16 días

2. ¿Padece alguna enfermedad?

b) No	a) Si
-------	-------

Cuál: _____

3. ¿Ha sufrido enfermedades hepáticas?

a) Si	b) No
-------	-------

Cual: _____

4. Si en la actualidad consume algún medicamento anote el nombre:

5. ¿Utiliza algún método anticonceptivo?

a) Si	b) No
-------	-------

6. El método anticonceptivo que utiliza es a base de

a) Pastillas	b) Inyecciones	c) Espumas o pomadas
d) Condón	e) DIU	f) Ninguno

7. Si su método anticonceptivo es el DIU, ¿cual es el tiempo de su uso?

a) 21 a 90 días	b) 91 a 365 días	c) 1 año un día a 3 años
d) 3 años un día a 5 años	e) 5 años un día a 7 años	f) 7 años un día a 9 años
g) 9 años un día ó más		

8. Marque con una X los síntomas que ha padecido después de la inserción del DIU

a) Inflamación en vientre	
b) Inflamación en caderas	
c) Inflamación en estomago	
d) Dolores de cabeza frecuentes	
e) Adelanto de la menstruación	
f) Retrazo de la menstruación	
g) Hemorragias	
h) Fatiga	
i) Ninguno	

¿Cuántos días dura su menstruación? _____

Yo _____ acepto participar como voluntaria para la realización de la investigación que lleva por nombre: Determinación de enzimas hepáticas en mujeres usuarias y no usuarias del DIU TCu 380A.

Firmo como voluntaria

11.2. Obtención de anticuerpos en conejo para Ceruloplasmina humana

Tratamiento especial merecen los datos sobre Ceruloplasmina, ya que en este caso particular se obtuvieron resultados adicionales en relación al método de análisis; ya que la técnica empleada para su determinación no tiene antecedentes en la literatura. La técnica establecida está basada en el método de inmunodifusión radial que facilita el análisis de esta proteína. La técnica es de bajo costo y de fácil ejecución.

11.2.1 Descripción de la Técnica

El establecimiento de esta técnica tuvo por objetivo determinar ceruloplasmina humana. El desarrollo de la técnica se basó en el método de inmunodifusión radial, por lo que fue necesario elaborar un anticuerpo para ceruloplasmina humana en conejo ya que este es considerado un modelo adecuado para tal fin. ⁽⁹⁾

A continuación se describe puntualmente el material y método empleado para el desarrollo de esta técnica.

11.2.2. Material y equipo

- QAE A-50 Sephadex, (Sigma Chemical Company)
- 400 mL de plasma fresco humano certificado
- Columna para tamices moleculares 54X 1X 100 cm, (Sigma Chemical Company)
- Soluciones de fosfato de potasio (0.1M, 0.2M, 0.3M y 0.05M), (Monterrey.S.A)
- Sulfato de amonio al 30%, (Baker)
- Espectrofotómetro, (Jenway 6305)
- Centrifuga (Hamilton Bell V6500 BIOHAZARD)
- Centrifuga (IEC B-20A DAMON)

- Membrana de diálisis PM 12 000 – 14 000. (Spectra)
- Refrigerador (Whirlpool)
- Tubos (Eppendorf)
- Congelador (Revco)
- Cronómetro (Timex)
- Placa de agitación (Bellco Glass, Inc)
- Tubos de ensaye (Kimax)
- 1 matraz Erlenmeyer de 250 mL (Kimax)

11.2.3. Método

11.2.3.1. Obtención de Ceruloplasmina humana

1. Se colocaron 400mL de plasma humano y 200 mL de QAE A-50 Sephadex en un recipiente limpio con agitación suave durante 4hrs a 4°C.
2. Después del transcurso de este tiempo se colocó en una columna y se eluyó con 0.1M de fosfato de potasio.
3. Se recolectó el eluido (cada 4mL) en tubos de ensaye limpios y secos, el contenido de estos tubos se leyó en espectrofotómetro a 280nm.
4. Se detuvo la elusión hasta que ya no se presentó lectura en los tubos.
5. Posteriormente se eluyó con fosfato de potasio 0.2M de igual manera que el anterior.
6. Al término de esto se prosiguió con fosfato de potasio 0.3M, repitiendo el paso 3 y 4.
7. Los volúmenes que presentaron mayor lectura en el espectrofotómetro se recolectaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se precipitaron con 52 mL de sulfato de amonio al 30%.
8. El precipitado se centrifugó a 27 000 G (en centrifuga IEC B-20A) durante 30 minutos.

9. El sobrenadante se precipitó con 151 mL de sulfato de amonio al 50% y se centrifugó de igual manera que el anterior.
10. Se resuspendió el precipitado con fosfato de potasio 0.05M y se colocó en la membrana de diálisis.
11. La membrana se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL que contenía buffer fosfato de potasio 0.05M durante 48 horas en refrigeración, el buffer se cambio cada 24 horas.
12. La muestra obtenida se colocó en tubos Eppendorf, y se congeló hasta su utilización.

11.2.3.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida para la identificación de Ceruloplasmina humana.

a) Material

- Vidrios de 12x11 y 12x10
- Separadores de teflón de 0.05mm
- Agarosa al 2%.
- Gel separador
- Agua bidestilada (Theissier)
- Gel concentrador
- Peine para electroforesis
- Amortiguador 4x
- Tubos Eppendorf 600 µL
- Amortiguador de corrimiento
- Marcador de peso molecular (Sigma Chemical Company)

b) Equipo

- Baño María
- Centrífuga

- Cámara de electroforesis miniprotean (Bio-Rad)
- Secador de geles (Bio-Rad)

c) Método

1. Se unieron dos cristales de 12x11 y 12x10 cm con separadores de teflón de 0.05mm.
2. Se sellaron los lados y la parte inferior con agarosa al 2%.
3. Se colocó el gel separador a nivel aproximado de 4cm del borde superior evitando que se formaran burbujas.
4. Se le agregó agua destilada por los extremos para observar la polimerización.
5. Una vez polimerizado se inclino el armazón para desalojar el agua.
6. Se eliminó el excedente de agarosa con agua bidestilada y se dejó reposar unos minutos.
7. Se llenó el armazón del gel concentrador y se insertó el peine cuidando de que no se generaran burbujas bajo los dientes, se dejó reposar por 10 minutos.
8. Para el tratamiento de muestras se combinaron 3 partes de la muestra de la Ceruloplasmina con una parte del amortiguador 4x, en un tubo Eppendorf.
9. El tubo se colocó en un baño de agua hirviendo durante 4 minutos y se centrifugó a 2000 rpm durante 30 segundos.
10. Se continuó con el corrido de los geles retirando el peine, y cuidando de que no se destruyeran los pozos, se llenó cada pozo con agua y se drenó invirtiendo la cámara tres veces.
11. El armazón se colocó dentro de la cámara de electroforesis.
12. La cámara interna y cada pozo se llenaron con amortiguador de corrimiento.
13. Una vez realizado esto la muestra se colocó en 5 carriles, en el sexto carril se colocó el marcador de peso molecular.
14. Finalmente se llenó el compartimiento inferior de la cámara con amortiguador de corrimiento.
15. Se realizó la electroforesis a 80 V de corriente constante, hasta que llegó al gel separador, a partir del cual se le cambió el voltaje a 120.

16. Se desconectó cuando el corrimiento quedo en un límite aproximado de 0.5 cm del límite inferior de los cristales.

17. Posteriormente se realizó la tinción, decoloración y secado del gel.

11.2.3.3. Determinación de la concentración de Ceruloplasmina humana

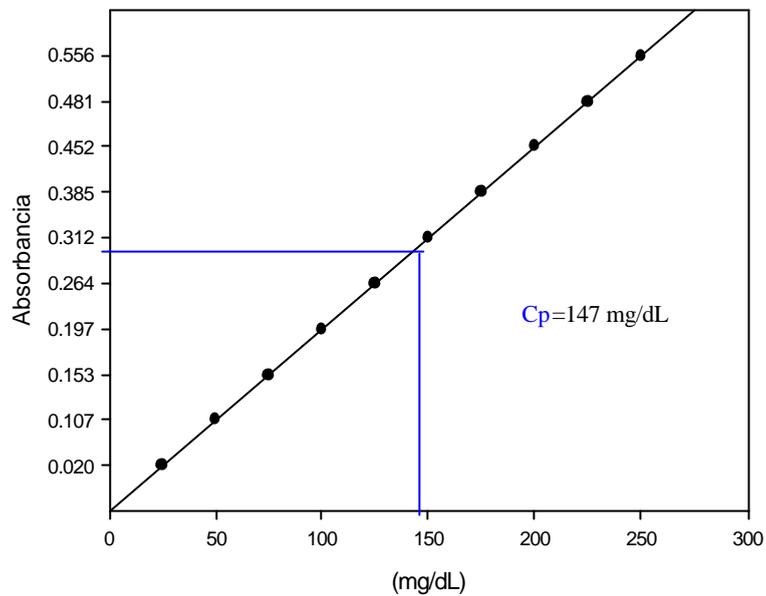
Cuadro 12. Determinación de la concentración de ceruloplasmina por el método de Lowry. México D.F 2005.

Reactivos	Número de tubos										Muestra
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Estándar (mL)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	0.1
H ₂ O (mL)	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	----	0.9
Reactivo C (mL)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Se dejó reposar durante 10 minutos											
Reactivo Folin-Ciocalteus	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Se dejó reposar durante 30 minutos											
Se leyó a 640 nm de Absorbancia											

Se colocaron 11 tubos de ensaye en una gradilla y se prosiguió de acuerdo al Cuadro 12.

Se leyó la curva estándar que contenía concentraciones conocidas de albúmina de suero de bovino (250 µg/ml). La concentración de ceruloplasmina se interpoló en esta de absorbancia para proteínas.

Gráfica 8. Curva estándar para la determinación de ceruloplasmina. La absorbancia de Cp presento un valor de 0.305 nm, obteniéndose así una concentración de 147 mg/dL.



11.2.3.4. Inmunización del conejo

a) Material

- Conejo de 8 meses de edad y 2.5 Kg de peso
- 1 caja de madera
- Torundas con alcohol
- Jeringa estéril para insulina
- Solución salina
- Adyuvante completo de Freund
- Vasos de precipitados de 100, 250 y 500 mL (Kimax)
- Probeta graduada de 100 mL (Kimax)
- Azida de sodio (Sigma)
- Pipetas Pasterur
- Bulbo para pipeta Pasteur

b) Material

- Refrigerador
- Baño de agua a temperatura de 37° C

a) Método

1. El conejo se inmovilizó en una caja de madera y esta se colocó verticalmente.
2. Se limpió el lomo en el margen exterior con una torunda de alcohol.
3. Se le inyectó la Ceruloplasmina con una jeringa de insulina de acuerdo al esquema siguiente:

día 0	Se colocó en un tubo de ensaye 1 mg de Ceruloplasmina, 1 mL de solución salina y 1 mL de adyuvante completo de Freud, se homogenizó y se le aplicó al conejo en sitios múltiples por vía subcutánea.
día 14	Se colocó 1 mg de Ceruloplasmina, 1 mL de solución salina y 1 mL de adyuvante incompleto de Freud, se homogenizaron y se le aplicó en sitios múltiples por vía subcutánea.
día 35	Se colocaron 0.5 mg de Ceruloplasmina, 1 mL de solución salina, se homogenizaron y se le aplicó en sitios múltiples, por vía subcutánea.
día 40	Se aplicó igual que el paso anterior.
día 45	Se sangró el conejo en blanco.

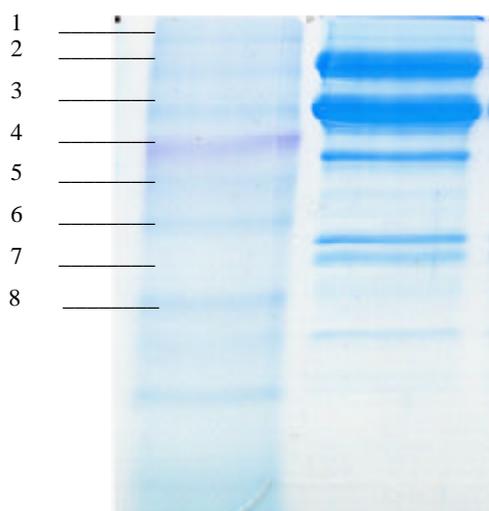
4. La sangre del conejo se colocó en un vaso de precipitados y se colocó en un baño de agua a temperatura de 37° C durante 3 horas.
5. Posteriormente se colocó en refrigeración a 4° C para que se retrajera el coagulo.
6. Una vez retraído el coagulo se separó el suero por centrifugación y se colocó en una probeta graduada para observar el volumen.

7. Se transfirió a un frasco boca ancha color ámbar de 250 mL y se le agregó una pizca de azida de sodio para evitar la contaminación de bacterias.
8. El suero inmunizado se refrigeró hasta su utilización.

11.3 Resultados

A continuación se incluyen los resultados obtenidos. En el carril de Cp se marcan dos bandas anchas de arriba hacia abajo, la primera corresponde a Cp de peso molecular 126 000 Daltons y la segunda de menor peso molecular 115 000 Daltons.

Gráfica 9. Núm. Banda



Fuente: Directa

Cuadro 13. Valores del marcador de Peso Molecular.

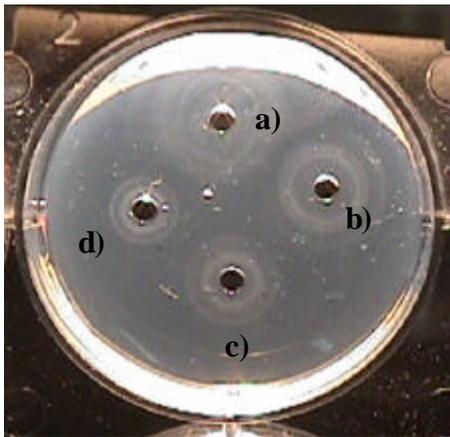
Núm Banda	Peso molecular (KDa)
1	179.3
2	120
3	83.3
4	65.8
5	50.1
6	38.6
7	27.5
8	20.5

Fuente: BenchMark™
Invitrogen Corporation. All rights reserved. 1997-2002

Gráfica 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida para la identificación de Ceruloplasmina humana. Los carriles marcan de izquierda a derecha, Marcador de PM y Ceruloplasmina respectivamente.

La ceruloplasmina no es homogénea; 80 % del total corresponde a la fracción C con peso molecular de 148 000; la fracción D (PM 125 000) corresponde al 20 % restante y se divide en tres subfracciones cuando menos. Parte de esta heterogeneidad puede deberse a una tendencia a formar polímeros; parte también puede ser de origen genético.

Se puede observar en la placa de Falcon, iniciando de arriba hacia abajo en sentido de las manecillas del reloj, las diluciones y concentraciones del estándar. (Figura 10)



Cuadro 14. Concentración de la Cp obtenida.

Muestra	Diámetro	Concentración mg/dL
a) Sin diluir	8 mm	140
b) 1:2	7 mm	73.5
c) 1:4	6 mm	36.7
d) 1:8	5 mm	18.37

Fuente: Directa

Imagen 1. Foto de la Inmunodifusión radial del estándar de Ceruloplasmina:

Estas concentraciones fueron utilizadas en la elaboración de una curva estándar para poder determinar las concentraciones de las muestras de suero de las 80 mujeres.

Grafica 11. Curva estándar de la obtención de anticuerpos para Ceruloplasmina humana.

