

Reconocimiento a la trayectoria de la Prof. Dra. Regina L. W. de Wikinski

Ceruloplasmina: determinación de su actividad ferroxidasa*

Ceruloplasmin: measurement of serum ferroxidase activity

► Viviana Mónica Yapur¹, María Fernanda Bustos¹, Analía Silvia González¹, Gustavo Alberto Negri²

1. Bioquímica.
2. Doctor en Bioquímica.

* Gastroenterología y Enzimología Clínica. Departamento de Bioquímica Clínica. INFIBIOC - Hospital de Clínicas "José de San Martín". Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Córdoba 2353. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Resumen

La Ceruloplasmina (Cp) es la principal proteína transportadora de cobre en circulación. Su concentración es abundante en plasma; se considera un reactante de fase aguda y su función fisiológica no se encuentra fehacientemente establecida. Fundamentalmente se sintetiza en los hepatocitos. También se encuentra en otros tipos celulares como monocitos, astrocitos y células de Sertoli. Su concentración sérica se utiliza en el diagnóstico diferencial de enfermedad de Wilson. La concentración total en plasma se considera igual a la suma de las concentraciones de apo y holo Cp, de manera que la cantidad de esta proteína determinada por un método inmunológico no indica que la enzima se encuentre presente solamente en su forma activa. Entonces, al utilizar esta metodología, se sobreestima la proteína funcionalmente activa. Existen diversos métodos para determinar su actividad. En este trabajo se describe un método automatizado para medir su actividad ferroxidasa que utiliza iones Fe^{2+} como sustrato. Los valores de referencia de actividad de Cp se diferenciaron estadísticamente entre el grupo de mujeres y el de hombres, siendo de 424-796 UI/L y 397-733 UI/L, respectivamente. Además, se obtuvo una correlación significativa entre la actividad ferroxidasa y la concentración proteica ($r=0,7285$; $p<0,0001$).

Palabras clave: ceruloplasmina * enfermedad de Wilson * actividad ferroxidasa * proteínas multifuncionales

Summary

Ceruloplasmin (Cp) is the principal copper carrier in human plasma. It is an abundant protein that participates in the acute phase reaction to stress, but its physiological function is unknown. Although Cp is synthesised predominantly in the liver, other cell types express the protein, including monocytes, astrocytes and Sertoli cells. The serum concentration of the copper protein ceruloplasmin has been an important diagnostic indicator of Wilson's disease. Measurement of the total amount of Cp protein may not

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

reflect Cp enzyme activity in the serum. The immunologic assay may lead to overestimation of the total amount of functional Cp in the serum due to this method's capacity to determine both the functional holo Cp and non-functional apo Cp. Several methods for determining ferroxidase activity have been reported. In this study, a method is described for automated measurement of the activity. In this method, Fe²⁺ ions are used as the substrate. The range for serum Cp ferroxidase activity in healthy persons was 424-796 UI/L for women, and 397-733 UI/L for men. Significant correlations between serum ferroxidase activity and Cp concentration ($r=0,7285$; $p < 0,0001$) were found.

Key words: ceruloplasmin * Wilson's disease * ferroxidase activity * moonlighting protein

Introducción

La ceruloplasmina Cp (ferroxidasa - I, EC 1.16.3.1.) se sintetiza principalmente en hígado como una cadena polipeptídica simple y se secreta como una α_2 -glicoproteína a nivel plasmático. Pertenece a la familia de las multicuprooxidadas. Estas enzimas constituyen un grupo de proteínas evolutivamente conservado. Se caracterizan desde el punto de vista estructural por presentar tres tipos de sitios de unión para el cobre con características espectroscópicas diferentes y, desde el punto de vista funcional, por catalizar la reducción de una molécula de oxígeno con formación de una de agua, sin la liberación de intermediarios potencialmente tóxicos (O₂⁻, H₂O₂).

Su actividad oxidasa es inespecífica y participa en reacciones de oxidación de diversos sustratos orgánicos e inorgánicos *in vitro*, como por ejemplo: Fe²⁺, benzidina, p-fenilendiamina, N,N'-dimetilfenilendiamina y otros. Sin embargo, sólo el ión Fe²⁺ se considera un sustrato biológico para esta enzima (1).

El hígado es la mayor fuente de Cp sérica y un aumento en el *pool* hepático de cobre resulta en un aumento sostenido en la concentración de Cp, mientras que en el suero de individuos que presentan deficiencia nutricional de este oligoelemento, se observa una disminución en la concentración de Cp circulante.

La Cp es una proteína multifuncional. La función que la misma cumpla dependerá de los cambios en las condiciones fisiológicas y patológicas presentes en el organismo frente a una situación determinada (2) (3).

Aunque su aumento después de procesos inflamatorios y traumáticos se usó para clasificarla como proteína de fase aguda, su función fisiológica puede ser amplia y variada. Además de participar en la homeostasis del hierro, se le reconocen propiedades antioxidantes contra la peroxidación lipídica y oxidantes frente a varias aminas (4).

En circulación, la proteína se encuentra como apoceruloplasmina y holoceruloplasmina. La primera de estas formas corresponde a la enzima sin actividad,

mientras que la segunda corresponde a la enzima activa. La incorporación de cobre en su estructura proteica promueve un cambio conformacional esencial desde la forma apo hacia la de holoenzima (5). La apoceruloplasmina contribuye aproximadamente en un 10% a la concentración proteica total de Cp en adultos presumiblemente sanos. Este porcentaje puede variar en algunas situaciones patológicas (6-8).

La principal aplicación clínica de la determinación de concentración de Cp en el laboratorio de análisis clínicos ha sido al diagnóstico de la enfermedad de Wilson. Sin embargo, en la literatura se describe un porcentaje variable de casos de estos pacientes con concentración de Cp dentro de los valores de referencia. Para este grupo de pacientes sería de gran utilidad clínica la determinación de su actividad catalítica en lugar de la medida de su concentración.

Según lo expresado en los párrafos anteriores se puede considerar importante la determinación de esta proteína a través de la medida de su actividad enzimática.

Materiales y Métodos

MUESTRAS

- Para la obtención de los valores de referencia de actividad de Cp, se utilizaron 122 muestras de suero de adultos (51 mujeres y 71 hombres) provenientes del banco de sangre del Hospital de Clínicas "José de San Martín".
- Para determinar la precisión metodológica se utilizó un *pool* sérico con actividad ferroxidasa media a partir de sueros pertenecientes a pacientes adultos del Hospital de Clínicas "José de San Martín".
- Para determinar la correlación entre la concentración proteica y la actividad enzimática se utilizaron 46 muestras séricas de adultos provenientes del banco de sangre del Hospital de Clínicas "José de San Martín".

REACTIVOS

- *Buffer* acetato 0,45 mol/L, pH 5,80, solución estable 6 meses a temperatura ambiente.
- $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 367 $\mu\text{mol/L}$ (SIGMA), sustrato estable 6 meses a 4 °C.
- 3-(2-piridil)-5,6-bis (2-[5-furilsulfonato])-1,2,4 - triazina, 18 mmol/L (SIGMA), reactivo cromogénico estable 6 meses a 4 °C.
- Tiourea 130 mmol/L.
- Sal disódica del ácido etilén- diaminotetracético: 25 mmol/L, calibrador estable 6 meses a temperatura ambiente.
- Agua destilada.

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD FERROXIDASA DE CP SÉRICA

Fundamento de la determinación:

El método desarrollado por Erel O. (9) se fundamenta en la oxidación del sustrato sulfato amónico ferroso hexahidratado ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

La muestra sérica que contiene a la enzima se incubaba con una solución de concentración conocida de ión ferroso (proveniente del sustrato) en *buffer* acetato.

Luego del período de incubación correspondiente, se agrega el reactivo cromogénico el cual forma un complejo color azul con los iones ferrosos. Este complejo presenta un pico de absorción en el espectro visible a una longitud de onda comprendida entre 590-610 nm.

Durante el proceso de oxidación, catalizado por la Cp, los iones ferrosos se oxidan a iones férricos. La diferencia entre la concentración de iones ferrosos antes y después de la reacción, indica la cantidad de sustrato que se oxida en la misma. La actividad enzimática presente en la muestra se considera inversamente proporcional a esta diferencia. Con el propósito de evitar la autooxidación espontánea de los iones ferrosos se agrega una solución de tiourea durante la preparación y el almacenamiento del sustrato. Los iones férricos formados en la mezcla reactiva se deben solamente a los aportados al medio luego de la catálisis enzimática.

La actividad catalítica se expresó en unidades por litro de líquido biológico. La unidad se definió como la cantidad de enzima que transformó 1 μmol de sustrato en producto por minuto de reacción.

CALIBRACIÓN

Se realizó una calibración de dos puntos inversa, debido a que hay una relación inversa entre los valores de absorbancia y la actividad ferroxidasa. Se utilizaron dos calibradores: agua destilada y EDTA.

Los valores de actividad de los calibradores se expresaron como actividad enzimática a partir de la realización del siguiente cálculo:

CÁLCULO DE ACTIVIDAD

$$\text{Actividad} = \text{Cci} \times \frac{V_f}{V_m} \times \frac{t}{\Delta t}$$

donde

- V_f = Volumen final de reacción
- V_m = Volumen de muestra
- t = 1 minuto
- Δt = Tiempo de incubación
- Cci = Concentración inicial de sustrato.

El período de incubación y la concentración del sustrato se indican en el procedimiento de medida.

Entonces, una actividad enzimática de 0 UI/L se calculó a partir de la concentración inicial de ión Fe^{2+} en el primer calibrador (agua destilada). Un valor de absorbancia igual a 1,200 se obtuvo en este punto. Cuando se usa EDTA como segundo calibrador no habrá iones Fe^{2+} remanentes en la cuba de reacción. Una actividad enzimática igual a 1.863 UI/L se calculó en este punto de calibración y representó la máxima actividad posible de acuerdo con las condiciones metodológicas. Un valor de absorbancia igual a 0,0000 se obtuvo en este caso. Aquellas muestras que presenten actividades superiores a 1.863 UI/L, por fuera de la región lineal de la curva de calibración, se deben procesar nuevamente previa dilución.

INSTRUMENTO

Para la determinación de la actividad de Cp se utilizó un autoanalizador Hitachi 917 (Roche, Alemania).

PROCEDIMIENTO

El autoanalizador se programó para llevar a cabo el procedimiento analítico de acuerdo a las siguientes especificaciones:

Volumen de muestra:	3 μL
Volumen de <i>buffer</i> acetato:	270 μL
Volumen de sustrato:	58 μL
Volumen de cromógeno:	23 μL
Volumen de EDTA:	3 μL
Tipo de calibración:	Dos puntos inversa
Actividad del calibrador 1:	0 UI/L
Actividad del calibrador 2:	1.863 UI/L
Longitud de onda primaria:	600 nm
Longitud de onda secundaria:	700 nm
Tiempo de incubación:	3,8 min
Temperatura de incubación:	37 °C

Brevemente, 3 μL de muestra o calibrador se incubaron con 270 μL de *buffer* acetato durante 1 min. Al cabo de ese tiempo, se agregaron 58 μL de sustrato y se incubaron 3,8 minutos a 37 °C. Luego del período de incubación, se hizo reaccionar con 23 μL del cromógeno y la absorbancia del complejo azul formado

se midió a una longitud de onda de 600 nm. La absorbancia se puede medir en un intervalo de 1 hora ya que el complejo coloreado se mantiene estable durante este período de tiempo.

Se usó una segunda longitud de onda de 700 nm para descontar variaciones de absorbancia inespecíficas.

MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA DE CERULOPLASMINA

Fundamento de la determinación por inmunodifusión radial

El procedimiento consiste en una inmunoprecipitación en agarosa entre la ceruloplasmina (antígeno) y su anticuerpo homólogo que se encuentra presente en el gel de agarosa.

El antígeno difunde radialmente en la mezcla gel - anticuerpo y se forma un disco o anillo visible en un punto que depende de la relación estequiométrica antígeno- anticuerpo.

Se utilizaron placas de inmunodifusión radial DIF-FU- PLATE, Biocientífica S.A.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la obtención de los valores de referencia previa constatación de normalidad distributiva mediante el *test* de Wilk-Shapiro, se efectuaron estadísticas paramétricas de tendencia central tales como media aritmética y dispersión (desvío estándar).

Se aplicó el *test* de Student con el objetivo de establecer si las medias de los valores de actividad mostraban diferencias significativas entre los grupos estudiados.

La correlación entre los valores de actividad enzimática y concentración proteica se realizó usando el *test* de Pearson.

Tanto la comparación como la correlación se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE REFERENCIA DE ACTIVIDAD DE CERULOPLASMINA

La actividad ferroxidasa se determinó utilizando el método de Erel O. (9).

El rango obtenido se estableció desde 424 UI/L a 796 UI/L en una población de sexo femenino y desde 397 UI/L a 733 UI/L en una población de sexo masculino.

La diferencia entre los valores de referencia para las poblaciones de mujeres y hombres fue estadísticamente significativa ($p < 0,01$; Tabla I).

Tabla I. Actividad de ceruloplasmina en UI/L para hombres y mujeres. Los valores de referencia se expresaron como $\bar{x} \pm 2DE$

	Mujeres (UI/L)	Hombres (UI/L)
Media (\bar{x})	610	565
Desvío Estándar(DE)	93	83
Valores de referencia	424-796	397-733

CORRELACIÓN ENTRE LA MEDIDA DE LA ACTIVIDAD FERROXIDASA DE LA ENZIMA Y LA CONCENTRACIÓN DE CP

Se determinó la actividad ferroxidasa y la concentración proteica de la Cp sérica. Una correlación estadísticamente significativa ($r=0,7285$; $p < 0,0001$; $n=46$; Fig. 1) se encontró entre la actividad ferroxidasa y la concentración sérica de Cp.

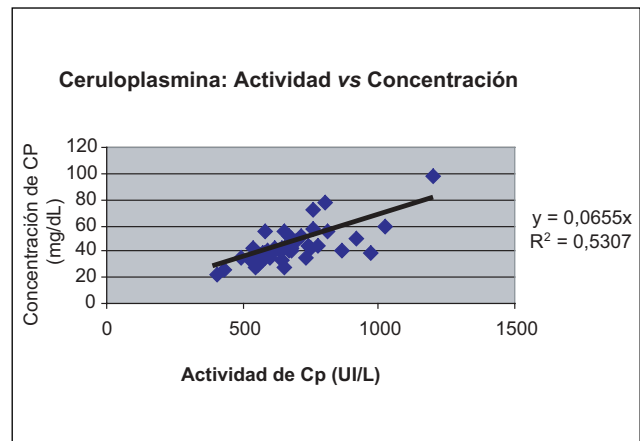


Fig. 1. Correlación entre la concentración de Cp y la actividad ferroxidasa.

El CV% obtenido procesando 20 veces el *pool* sérico es 0,7%.

Discusión y Conclusiones

La determinación de la concentración de Cp se utiliza frecuentemente en el laboratorio de análisis clínicos. La misma se considera una herramienta necesaria para el diagnóstico de enfermedad de Wilson en individuos con sospecha clínica de esta patología. Algunos de estos pacientes tienen Cp circulante con propiedades inmunológicas; ésta puede ser funcionalmente inactiva (13) o bien su actividad ferroxidasa puede llegar a valores tan bajos como 25 UI/L. En estos pacientes la medida de la concentración proteica de Cp no

siempre es reflejo de su actividad ferroxidasa. Es por ello que los métodos que determinan actividad se podrían considerar más útiles para colaborar con este diagnóstico.

En la actualidad, la metodología más empleada por los laboratorios para medir concentración se basa en los principios de inmunodifusión radial. Una desventaja es que para el desarrollo de esta técnica se requiere un operador entrenado que realice una lectura precisa y exacta de los halos de difusión. La concentración total determinada por esta metodología será igual a la suma de las concentraciones de las dos formas séricas: apo y holoceruloplasmina. La apoceruloplasmina contribuye en un 10% al valor total de concentración en suero en individuos normales pero se conoce que este porcentaje puede variar en distintas situaciones patológicas (10).

En cambio, la actividad catalítica de la enzima determinada mediante la implementación de la metodología descrita en la presente ficha técnica permite informar valores de actividad catalítica expresados en unidades internacionales por litro de líquido biológico. Además, este método consta de las siguientes ventajas: es fácilmente automatizable, no requiere de un calibrador comercial, es económico, es preciso con un coeficiente de precisión de 0,7% y rápido. Los valores de actividad provienen de la medida de la forma holo de la enzima, que es la forma funcionalmente activa. Los valores de referencia que se obtuvieron en este trabajo coinciden con los reportados en la literatura y se modifican según el sexo.

CORRESPONDENCIA

PROF. DR. GUSTAVO ALBERTO NEGRI
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Junín 956
1113 CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES
Argentina
E-mail: ganegri@dbc.ffyb.uba.ar

Referencias bibliográficas

- Hellman N, Gitlin J. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr* 2002; 22: 439-58.
- Calabrese L, Bielli P. Structure to function relationships in ceruloplasmin: a "moonlighting" protein. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 1413-27.
- Jeffery JC. Molecular mechanisms for multitasking: recent crystal structures of moonlighting proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2004; 14 (6): 663-8.
- Fox P, Mukhopadhyay C, Ehrenwald E. Structure, oxidant activity, and cardiovascular mechanisms of human ceruloplasmin. *Life Sci* 1995; 56: 1749-58.
- Hirano K, Ogihara T, Ogihara H, Hiroi, Hasegawa M, Tamai H. Identification of apo- and holo-forms of ceruloplasmin in patients with Wilson's disease using native polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin Biochem* 2005; 38: 9-12.
- Loudianos G, Gitlin JD. Wilson's disease. *Sem Liver Dis* 2000; 20: 353-64.
- Steindl P, Ferenci P, Dienes Hp, Grimm G, Pabinger I, Madl C, *et al.* Wilson's disease in patients presenting with liver disease: a diagnostic challenge. *Gastroenterology* 1997; 113: 212-8.
- Cauza E, Maier-Dobernsnerger T, Polli C, Kaserer K, Kramer L, Ferenci P. Screening for Wilson's disease in patients with liver diseases by serum ceruloplasmin. *J Hepatol* 1997; 27: 358-62.
- Erel O. Automated measurement of serum ferroxidase activity. *Clin Chem* 1998; 44 (11): 2313-9.
- Macintyre G, Gutfreund K, Martin W, Camicioli R, Cox D. Value of an enzymatic assay for the determination of serum ceruloplasmin. *J Lab Clin Med* 2004; 144 (6): 294-301.
- Floris G, Medda R, Padiglia A, Musci G. The physiopathological significance of ceruloplasmin: a possible therapeutic approach. *Biochem Pharm* 2000; 60: 1735-41.
- Shukla N, Maher J, Masters J, Angelini G, Jeremy J. Does oxidative stress change ceruloplasmin from a protective to a vasculopathic factor? *Atherosclerosis* 2006; 187: 238-50.
- Saenko EL, Skorobogat'ko OV, Yaropolov AL. Immunoenzyme determination of total serum ceruloplasmin. Application to Wilson's disease. *Biochem Int* 1991; 23: 819-24.
- Fleming RE, Whitman IP, Gitlin JD. Induction of ceruloplasmin gene expression in rat lung during inflammation and hyperoxia. *Am J Physiol* 1991; 260: 168-74.

Aceptado para su publicación el 8 de junio de 2007