

# CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA CERULOPLASMINA

I: VALÓRES NORMAIS NO SÓRO SANGÜINEO

FRANCISCO B. DE JORGE \*

HORÁCIO M. CANELAS \*\*

A ceruloplasmina foi prevista em 1944 por Holmberg <sup>7</sup>, que, mais tarde, juntamente com Laurel <sup>9, 10, 11, 12, 13</sup>, identificou, separou e determinou suas propriedades físico-químicas. É uma globulina  $\alpha_2$  do plasma, com peso molecular de cerca de 151.000, contendo 8 átomos de cobre na molécula, e com atividade enzimica do tipo oxidase. O substrato ideal é a p-fenilenodiamina <sup>7</sup> em pH 5,5. Em sua estrutura são encontradas frações de hexose, hexosamina e ácido neurâmico <sup>25</sup>. Parece haver duas formas de ceruloplasmina humana <sup>1, 2, 26</sup>, porém, elas podem ser devidas a modificações da mesma forma, ocorridas durante o processo de separação. Morell e Scheinberg <sup>18</sup> referiram-se a quatro formas, mas não encontraram, in vitro, diferenças, quer na atividade enzimica, quer no conteúdo de cobre. Humoller e col. <sup>15</sup> sugeriram que os nomes cobre-oxidase, polifenol-oxidase, catecolase, monaminoxidase e aminoxidase, dados ao sistema enzimico responsável pelas propriedades oxidativas do plasma, se referem à ceruloplasmina. Holmberg <sup>8</sup> acreditava que uma das funções da ceruloplasmina fôsse o transporte do cobre, embora se necessitasse de experiências conclusivas para confirmação da hipótese. Outra possível função desta proteína é a enzimica, porém, seu substrato, in vivo, ainda não é conhecido; entretanto, as pesquisas têm sido orientadas para um metabólito do triptofânio.

A ceruloplasmina possui atividade oxidásica sobre vários substratos, in vitro: p-fenilenodiamina, hidroquinona, catecol, pirogalol, DOPA, adrenalina, ácido ascórbico <sup>11</sup>; 5-hidroxitriptamina, 2-metil-5-hidroxitriptamina <sup>19</sup>; noradrenalina, adrenocromo, diidroxinoradrelina <sup>22</sup>; ácido 5-hidroxiindolacético <sup>2</sup>; 4-hidroxitriptamina, 6-hidroxitriptamina, bufotenina <sup>16</sup>; N,N-dimetil-p-fenilenodiamina <sup>3</sup>. A atividade para a N,N-dimetil-p-fenilenodiamina é proporcional à quantidade de ceruloplasmina presente e também ao tempo de incubação <sup>3</sup>; encontramos a mesma relação com o substrato de p-fenilenodiamina.

A oxidação é inibida pelos ânions tiocinato, fluoreto, cloreto, brometo e sulfato <sup>3</sup>. Altas concentrações de ânions inibem a reação e baixas concen-

---

\* Médico Assistente do Hospital das Clínicas, chefe do Laboratório da 1ª Clínica Médica (Prof. A. B. Ulhoa Cintra) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. \*\* Professor Assistente de Clínica Neurológica (Prof. Adherbal Tolosa) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

trações a ativam<sup>12</sup>. Parece que o íon ferroso é o cation que mais ativa a reação<sup>3</sup>; a ceruloplasmina oxida o íon ferroso a férrico, o qual, por sua vez, oxida o substrato e é reduzido novamente a ferroso<sup>3</sup>. Mercúrio, alumínio e índio são poderosos inibidores da oxidação<sup>3</sup>.

A grande importância da determinação da concentração de ceruloplasmina do soro reside, como se sabe, em sua acentuada redução ou mesmo ausência na degeneração hepatolenticular.

Têm sido descritos vários métodos para a determinação da atividade cobre-oxidase do soro: determinações espectrofotométrica<sup>10</sup>, enzimica<sup>24</sup>, imunológica<sup>4</sup>, pela oxidação da p-fenilenodiamina e determinação gasométrica<sup>13</sup>, pela oxidação da benzidina e leitura espectrofotométrica<sup>20</sup>.

#### MATERIAL E MÉTODO

Estudamos o soro sanguíneo de 65 indivíduos normais (40 homens e 25 mulheres), com idades variando entre 20 e 45 anos, todos da raça branca.

O sangue foi colhido da veia da dobra do cotovelo e colocado em tubo simples, sem anticoagulante. O soro foi separado por centrifugação.

A atividade cobre-oxidase (ceruloplasmina) foi determinada pelo método de Houchin<sup>14</sup>.

Em virtude de alguns soros apresentarem ligeira coloração, seguimos a técnica de Houchin, mas subtraímos a leitura da coloração própria do soro. Esta precaução é particularmente importante em soros de casos patológicos, principalmente em soros ictericos.

A técnica usada foi a seguinte<sup>14</sup>:

*Reagentes* — 1) Tampão de acetato: 20 ml de ácido acético glacial (Baker) e 163 g de acetato de sódio ( $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) (Facchina). Diluir a 1.000 ml com água destilada. O pH deve ser  $5,20 \pm 0,05$ . Acertar com ácido acético ou acetato de sódio. Com o acetato de sódio (Facchina) e ácido acético glacial (Baker) encontramos sempre o pH esperado.

2) Solução de azida sódica 0,02% em água (Azida sódica Merck).

3) Solução de p-fenilenodiamina 0,1 g/100 ml, em tampão de acetato. Preparar no momento de usar. Para fazer 4 determinações, pesar 10 mg de p-fenilenodiamina e dissolver em 10 ml de tampão de acetato.

*Técnica* — Pipetar em tubo de ensaio 0,1 ml de soro e 1 ml de solução de p-fenilenodiamina. Para o blank pipetar 0,1 ml de água destilada e 1 ml da solução de p-fenilenodiamina. Misturar. Colocar os tubos em banho-maria a 37°C durante 15 minutos. Retirar os tubos e juntar a cada um 5 ml de solução de azida sódica. Misturar. Deixar repousando por 10 minutos. Preparar testemunhos de cada amostra tomando 0,1 ml de soro, 1 ml de solução de p-fenilenodiamina e 5 ml de solução de azida sódica e misturar. Fazer a comparação espectrofotométrica no Beckman, modelo B, em 525 m $\mu$ , ou no colorímetro Klett-Summerson com filtro nº 52, contra o blank.

*Cálculo* — Leitura do substrato oxidado menos a leitura do testemunho = L.

(L . 150) — 1,7 = mg de ceruloplasmina por 100 ml de soro

Investigamos a atividade de alguns soros antes e depois da diálise em tubo de celofane (Dialyzer Tubing, Dellophane Fisher Scientific Co.) contra água destilada, assim como a de amostras de urina de 20 indivíduos normais, bem como de amostras de esperma de 2 normais.

RESULTADOS

Os resultados estão resumidos nas tabelas 1 e 2.

Não encontramos atividade cobre-oxidase na urina nem no esperma.

Caso	Sexo	Cerulo- plasmina	Caso	Sexo	Cerulo- plasmina	Caso	Sexo	Cerulo- plasmina
1	M	32,7	23	M	32,7	44	F	32,5
2	M	37,5	24	M	28,9	45	F	33,2
3	M	30,5	25	M	28,5	46	F	38,6
4	M	38,6	26	M	27,4	47	F	30,5
5	M	30,5	27	M	34,9	48	F	31,4
6	M	33,6	28	M	31,6	49	F	32,7
7	M	36,5	29	M	34,9	50	F	32,5
8	M	29,5	30	M	31,6	51	F	39,8
9	M	33,6	31	M	30,0	52	F	37,5
10	M	35,7	32	M	32,5	53	F	38,4
11	M	30,5	33	M	34,8	54	F	34,3
12	M	36,8	34	M	30,8	55	F	31,3
13	M	32,5	35	M	28,4	56	F	38,6
14	M	38,6	36	M	27,8	57	F	37,4
15	M	30,5	37	M	28,5	58	F	28,4
16	M	28,6	38	M	33,5	59	F	34,9
17	M	33,5	39	M	32,5	60	F	32,8
18	M	36,8	40	M	30,2	61	F	35,8
19	M	33,8	41	F	32,5	62	F	36,4
20	M	36,1	42	F	36,8	63	F	35,8
21	M	35,8	43	F	30,5	64	F	38,4
22	M	33,8				65	F	34,5

Tabela 1 — Resultados da determinação de ceruloplasmina (mg/100 ml) em 65 indivíduos normais.

Caso	Sexo	Cobre-oxidase (mg/100 ml)		Porcentagem da atividade perdida
		Antes da diálise	Após a diálise	
1	M	33,8	12,1	64,2
2	M	35,8	13,5	62,3
3	M	33,8	12,8	62,1
4	F	34,3	12,5	63,6
5	M	32,5	12,0	63,1
6	M	34,9	13,2	62,2
7	M	30,8	11,8	61,7
8	F	32,8	12,0	63,4
9	M	30,2	11,2	62,9
10	M	34,8	13,0	62,7

Tabela 2 — Valores da atividade cobre-oxidase do soro de indivíduos normais antes e depois da diálise.

## COMENTARIOS

No soro de indivíduos normais encontramos atividade cobre-oxidase (ceruloplasmina) de  $33,4 \pm 3,1$  mg/100 ml ( $n = 65$ ). Contudo, no sexo masculino o valor médio foi de  $32,6 \pm 3,1$  mg/100 ml ( $n = 40$ ), enquanto no sexo feminino, encontramos  $34,6 \pm 2,8$  mg/100 ml ( $n = 25$ ). Embora pequena aparentemente, a diferença de atividade da cobre-oxidase entre os sexos é estatisticamente significativa ( $P < 0,01$ ). É provável que os valores mais altos observados nas mulheres sejam devidos a alterações hormonais, pois é sabido que certos hormônios, principalmente os estrógenos, fazem aumentar a concentração de ceruloplasmina no sangue circulante<sup>21</sup>.

Nossos resultados concordam com os de Scheinberg e Gitlin<sup>23</sup>, que encontraram, em 7 normais, valores de 23,6 a 38,7 mg/100 ml, e de Markowitz e col.<sup>17</sup>, que verificaram, em 10 normais, valores de 27 a 38 mg/100 ml.

No soro dialisado há uma perda da atividade cobre-oxidase que, em 10 normais, foi de  $62,8 \pm 0,8\%$ . É difícil a interpretação deste resultado. Fato semelhante encontramos no sangue do molusco *Strophocheilus oblongus musculus*<sup>5</sup>. Entre as hipóteses explicativas lembramos que o fato pode ser devido à perda de algum íon ativador da oxidação durante a diálise, ou então que a atividade cobre-oxidase possa ser devida a outras moléculas, de peso molecular baixo, além da ceruloplasmina, de maneira aditiva; na diálise estas moléculas pequenas seriam perdidas. Estas hipóteses se justificam em virtude da ceruloplasmina ter peso molecular elevado, sendo pouco provável que atravesse a membrana dialisadora.

Na urina e no esperma de indivíduos normais, assim como havíamos observado anteriormente na saliva<sup>4</sup>, não encontramos atividade cobre-oxidase.

## RESUMO

Foi determinada a atividade cobre-oxidase (ceruloplasmina), pelo método de Houchin, no soro de 65 indivíduos normais, de raça branca, com idades entre 20 e 45 anos. Foi obtido o seguinte valor médio neste grupo:  $33,4 \pm 3,1$  mg/100 ml. Todavia, nos homens ( $n = 40$ ) a média foi de  $32,6 \pm 3,1$  mg/100 ml, enquanto nas mulheres ( $n = 25$ ) foi de  $34,6 \pm 2,8$  mg/100 ml; a diferença entre estes subgrupos é significativa.

O soro dialisado em 10 indivíduos normais perdeu  $62,8 \pm 0,8\%$  da atividade cobre-oxidase.

Não encontramos atividade cobre-oxidase na urina de 20 indivíduos normais nem no esperma de 2 outros indivíduos normais.

## SUMMARY

*Studies on ceruloplasmin. I — Normal concentrations in blood serum.*

Copper-oxidase activity (ceruloplasmin) was determined, according to Houchin's method, in the blood serum of 65 normal white subjects, aged 20 to 45. The average concentration in this group was  $33.4 \pm 3.1$  mgm./100

ml. In men ( $n = 40$ ), however, the mean was  $32.6 \pm 3.1$  mgm./100 ml, while in women ( $n = 25$ ) it was  $34.6 \pm 2.8$  mgm./100 ml; the difference between these means is significant.

The dialysed blood serum of 10 normal subjects lost  $62.8 \pm 0.8$  per cent of the copper-oxidase activity.

No copper-oxidase activity was found neither in the urine of 20 normal subjects nor in the sperm of other 2 normal subjects.

#### REFERÊNCIAS

1. BROMAN, L. — Separation and characterization of two caeruloplasmins from human serum. *Nature (Lond)* 182:1655-1657, 1958.
2. CURZON, G. — Studies on the oxidase properties of caeruloplasmin. In Walshe, J. M. & Cumings, J. N.: *Wilson's Disease, some Current Concepts*. Blackwell, Oxford, 1961, p. 96-104.
3. CURZON, G.; VALLET, L. — The purification of human caeruloplasmin. *Biochem. J.* 74:279-287, 1960.
4. De JORGE, F. B.; CANELAS, H. M.; DIAS, J. C.; CURY, L. — Studies on copper metabolism. III: Copper contents of saliva of normal subjects and of salivary glands and pancreas of autopsy material. *Clin. Chim. Acta*, 9:148-150, 1964.
5. De JORGE, F. B.; CINTRA, A. B. U.; HAESER, P. E.; SAWAYA, P. — Biochemical studies on the snail *Strophocheilus oblongus musculus* (Becquaert). *Comp. Biochem. Physiol. In press*.
6. GITLIN, D. — Use of ultraviolet absorption spectroscopy in the quantitative precipitin reaction. *J. Immunol.* 62:437-451, 1949.
7. HOLMBERG, C. G. — Presence of a laccase-like enzyme in serum and its relation to the copper in serum. *Acta physiol. scand.* 8:227-229, 1944.
8. HOLMBERG, C. G. — Development of knowledge of caeruloplasmin. In Walshe, J. M. & Cumings, J. N.: *Wilson's Disease, some Current Concepts*. Blackwell, Oxford, 1961, p. 64-68.
9. HOLMBERG, C. G.; LAURELL, C. B. — Investigations in serum copper. I: Nature of serum copper and its relation to the iron-binding protein in human serum. *Acta chem. scand.* 1:944-950, 1947.
10. HOLMBERG, C. G.; LAURELL, C. B. — Investigations in serum copper. II: Isolation of the copper containing protein, and a description of some of its properties. *Acta chem. scand.* 2:550-556, 1948.
11. HOLMBERG, C. G.; LAURELL, C. B. — Investigations in serum copper. III: Caeruloplasmin as an enzyme. *Acta chem. scand.* 5:476-480, 1951.
12. HOLMBERG, C. G.; LAURELL, C. B. — Investigations in serum copper. IV: Effect of different anions on the enzymatic activity of caeruloplasmin. *Acta chem. scand.* 5:921-930, 1951.
13. HOLMBERG, C. G.; LAURELL, C. B. — Oxidase reactions in human plasma caused by caeruloplasmin. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 3:103-107, 1957.
14. HOUCHIN, O. B. — A rapid colorimetric method for the quantitative determination of copper oxidase activity (ceruloplasmin). *Clin. Chem.* 4:519-523, 1958.
15. HUMOLLER, F. L.; MOCKLER, M. P.; HOLTHAUS, J. M.; MAHLER, D. J. — Enzymatic properties of ceruloplasmin. *J. Lab. clin. Med.* 56:222-234, 1960.
16. LEVINE, W. G. — Observations on hydroxyindole oxidases. *Biochem. J.* 76:43P, 1960.
17. MARKOWITZ, H.; GUBLER, C. J.; MAHONEY, J. P.; CARTWRIGHT, G. E.; WINTROBE, M. M. — Studies on copper metabolism. XIV: Copper, ceruloplasmin and oxidase activity in sera of normal human subjects, pregnant women, and patients with infections, hepatolenticular degeneration and the nephrotic syndrome. *J. clin. Invest.* 34:1498-1508, 1955.
18. MORELL, A. G.; SCHEINBERG, I. H. — Heterogeneity of human caeruloplasmin. *Science*, 131:930-932, 1960.
19. PORTER, C. C.; TITUS, D. C.; SANDERS, B. E.; SMITH, E. V. — Oxidation of serotonin in the presence of ceruloplasmin. *Science* 126:1014-1015, 1957.
20. RAVIN, H. A. — An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin. *J. Lab. clin. Med.* 58:161-168, 1961.
21. RUSS, E. M.; RAYMUNT, J. — Influence of estrogens on total serum copper and caeruloplasmin. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 92:465-466, 1956.
22. SANKAR, D. V. S. — Enzymatic activity of ceruloplasmin. *Fed. Proc.* 18:441, 1959.
23. SCHEINBERG, I. H.; GITLIN, D. — Deficiency of ceruloplasmin in patients with

hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *Science*, 116:484-485, 1952. 24. SCHEINBERG, I. H.; MORELL, A. G. — Exchange of ceruloplasmin copper with ionic  $Cu^{64}$  with reference to Wilson's disease. *J. clin. Invest.* 36:1193-1201, 1957. 25. SCHEINBERG, I. H.; STERNLIEB, I. — Copper metabolism. *Pharmacol. Rev.* 12:355-381, 1960. 26. URIEL, J. — Colorimetric detection of human caeruloplasmin oxidase activity after electrophoresis in agar plates or after immunoelectrophoresis. *Nature (Lond.)* 181:999-1000, 1958.

*Clínica Neurológica — Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo — Caixa Postal 3461 — São Paulo, Brasil.*