



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Posgrado de Especialidades en Microbiología

Especialidad en Química Clínica

"Estudio de correlación para la determinación de ceruloplasmina sérica de un método que evalúa actividad enzimática versus la cuantificación de la proteína por inmunturbidimetría"

Trabajo final de investigación aplicada sometido a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología para optar al grado y título de Especialista en Química Clínica

Vernon Rojas Montero

B25866

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

Diciembre, 2020

Agradecimientos

A Dios y a la Virgen de los Ángeles por darme la oportunidad de vivir y regalarme una grandiosa familia.

Al Laboratorio Clínico del Hospital San Juan de Dios Dr. Clodomiro Picado Twight por permitirme observar la labor que realizan con excelencia y dedicación en beneficio del paciente.

Dedicatoria

A mami por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A papi por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre.

A Karol por ser el ejemplo de una hermana mayor y de la cual aprendí de momentos difíciles.

A Herson por el valor mostrado para salir adelante y por motivarme a ser mejor persona cada día.

A Emilito y Santi por inspirar alegría y darme más razones para ser su ejemplo.

A la memoria de la Dra. Nancy Carballo Salazar Q.E.P.D, por su dedicación a su labor y apoyo brindado en el presente trabajo de investigación.



SISTEMA DE ESTUDIOS EN POSGRADO
PROGRAMA DE POSGRADO EN ESPECIALIDADES EN MICROBIOLOGÍA

ACTA-46-2020

Acta presentación de Requisito Final de Graduación Trabajo de Investigación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el miércoles 16 de diciembre de 2020 con el objeto de recibir el informe oral del estudiante Vernon José Rojas Montero carné # B25866, quien se acoge al Reglamento General del Sistema de Estudios de Posgrado para presentar el Trabajo Final de Graduación, para optar por el grado académico de Especialista en Química Clínica. Están presentes los siguientes miembros del Tribunal Examinador: Ileana Holst Schumacher, MSc., quien preside, lectora, Manuel Jiménez Díaz, PhD., lector y Marianela Vargas Umaña, MSc., tutora.

ARTICULO 1

Quien preside solicita al postulante realizar la presentación oral de su Trabajo de Investigación titulado: "Estudio de correlación para la determinación de ceruloplasmina sérica de un método que evalúa actividad enzimática versus la cuantificación de la proteína por inmunoturbidimetría"

ARTICULO 2

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan al postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 3

El Tribunal Examinador declara el Trabajo Final de Graduación: Aprobado [X] Reprobado []

ARTICULO 4

Se da lectura al acta que firman los miembros del Tribunal Examinador y el Postulante, a las 16:45 horas.

Table with 3 columns: Nombre, Firma, No. Cédula. Rows include Ileana Holst Schumacher, Marianela Vargas Umaña, Manuel Jiménez Díaz, and Vernon José Rojas Montero.

Observaciones: _____



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Vernon José Rojas Montero, con cédula de identidad 1-1556-0902, en mi condición de autor del TFG titulado, *"Estudio de correlación para la determinación de ceruloplasmina sérica de un método que evalúa actividad enzimática versus la cuantificación de la proteína por inmunoturbidimetría"*

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Vernon José Rojas Montero

Número de Carné: B25866 Número de cédula: 1-1556-0902

Correo Electrónico: Vernon.rojasjm@gmail.com

Fecha: 09-02-2021 Número de teléfono: 83020191

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Marianela Vargas Umaña

VERNON JOSE
ROJAS MONTERO
(FIRMA)

Firmado digitalmente por
VERNON JOSE ROJAS
MONTERO (FIRMA)
Fecha: 2021.02.09
21:32:01 -06'00'

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

ÍNDICE

Resumen.....	10
Introducción.....	11
Problema.....	14
Justificación.....	14
Objetivos.....	15
Marco teórico.....	16
Antecedentes.....	16
Ceruloplasmina.....	18
Fisiopatología y características clínicas de la enfermedad de Wilson.....	19
Diagnóstico clínico.....	24
Tratamiento.....	27
Métodos de diagnóstico de laboratorio.....	27
Materiales y métodos.....	33
Resultados	34
Discusión.....	37
Conclusiones.....	40
Referencias	42
Anexo 1. Exoneración de permiso investigación médica por parte del Comité Ético Científico del Hospital San Juan de Dios.	44
Anexo 2. Inseto determinación de concentración sérica de ceruloplasmina analizador Cobas c311 de Roche.	45
Anexo 3. Procedimiento determinación de actividad enzimática ceruloplasmina realizado en LCHSJD.....	48

Índice de cuadros

Cuadro 1: Sistema de puntuación desarrollado en la 8ª Reunión Internacional sobre la enfermedad de Wilson	28
---	----

Índice de Figuras

Figura 1: Estudio de correlación entre la actividad enzimática y la concentración de la ceruloplasmina sérica.....	34
Figura 2. Estudio de correlación entre la actividad enzimática y la concentración de la ceruloplasmina sérica para la categoría valores menores al límite inferior de referencia....	35
Figura 3. Estudio de correlación entre la actividad enzimática y la concentración de la ceruloplasmina sérica para la categoría valores dentro del intervalo de referencia	35
Figura 4. Estudio de correlación entre la actividad enzimática y la concentración de la ceruloplasmina sérica para la categoría valores mayores al límite superior de referencia...	36

Índice de Abreviaturas

AASLD: Asociación Americana para el estudio de enfermedades hepáticas

ApoCp: Apoceruloplasmina

ATP7B: polipéptido beta de la ATPasa transportadora de cobre

Cp: Ceruloplasmina

Ctr1: Transportador de cobre 1

Cu: Cobre

EW: Enfermedad de Wilson

HCp: Holoceruloplasmina

IRM: Resonancia Magnética Cerebral

LCHSJD: Laboratorio Clínico Hospital San Juan de Dios

MT: Metalotioneínas

Resumen

La enfermedad de Wilson es un trastorno autosómico recesivo del metabolismo del cobre, que produce cirrosis hepática y degeneración neuronal. Se realizó un estudio analítico, experimental, con el objetivo principal de determinar la concentración sérica y la actividad enzimática de remanentes de muestras de pacientes para diversos estudios en las Divisiones de Inmunología y Nefrología del Laboratorio Clínico del Hospital San Juan de Dios. Se analizaron 165 muestras de suero por dos metodologías distintas para determinar ceruloplasmina sérica y se realizó un estudio de correlación de Pearson para las 165 muestras entre el método considerado como referencia que es la actividad enzimática y la concentración sérica que es el método de estudio. Adicionalmente, se segregaron en tres grupos distintos según el resultado obtenido por la metodología de actividad enzimática y basados en los valores de referencia definidos por esta metodología de referencia en “valores por debajo del valor inferior de referencia”, “valores dentro del intervalo de referencia” y “valores superiores al límite superior de referencia” y se realizó un estudio de correlación de Pearson para cada grupo. Se evidenció que existe una pobre correlación para los 4 escenarios planteados obteniendo $r = 0,84$, $r = 0,40$, $r = 0,44$ y $r = 0,74$ respectivamente. Se recomienda no realizar determinaciones de ceruloplasmina sérica basadas únicamente en la concentración de esta proteína llevadas a cabo por inmunoturbidimetría, especialmente en pacientes con sospechas diagnósticas por Enfermedad de Wilson, ya que como se demostró en el presente trabajo existe una baja correlación entre las 2 metodologías disponibles en todo su intervalo analítico, a valores menores al límite inferior de referencia, a valores dentro del intervalo de referencia y a valores mayores al límite superior de referencia determinados por la metodología de la actividad enzimática que es considerado aún el estándar de oro para la determinación de esta proteína.

Palabras clave: Ceruloplasmina, Holoceruloplasmina, Apoceruloplasmina, Enfermedad de Wilson, actividad enzimática, inmunoturbidimetría.

Introducción

La enfermedad de Wilson (EW) es un trastorno autosómico recesivo del metabolismo del cobre, que produce cirrosis hepática y degeneración neuronal. La enfermedad es progresiva y, en última instancia, mortal si no se trata y es probablemente la causa más frecuente de enfermedad hepática crónica en los niños. Se ha sugerido que al menos la mitad de los pacientes con EW nunca son diagnosticados y mueren por una enfermedad no tratada (Ferenci, Pathophysiology and Clinical Features, 2004).

La acumulación de cobre ocurre tanto en el hígado como en el sistema nervioso central, especialmente en los ganglios basales. Cuando se trata a los pacientes con agentes quelantes orales y se le somete a una dieta baja en cobre antes de que desarrollen daño tisular permanente, podrían llevar una vida normal. Sin embargo, los pacientes diagnosticados con EW después de la aparición de cirrosis hepática o deficiencias neurológicas tienen un pronóstico desfavorable. A pesar del tratamiento agresivo, su calidad de vida a menudo se ve comprometida de forma permanente (Ferenci, Guías de Práctica Clínica de la EASL: Enfermedad de Wilson, 2012).

La edad al inicio varía ampliamente, y aunque varios parámetros clínicos se asocian constantemente con la EW, incluida la ceruloplasmina sérica disminuida, la presencia de anillos de Kayser-Fleischer, concentraciones altas de cobre en el hígado o la orina, enfermedad hepática y temblor o distonía (Ferenci, Pathophysiology and Clinical Features, 2004).

Estudios indicaron que la concentración sérica de la holoceruloplasmina (HCp) y la actividad oxidasa eran bajas en el 95% de los pacientes sintomáticos con EW. Por tanto, un resultado de ceruloplasmina sérica disminuida en asociación con algunos otros parámetros clínicos y genéticos suele conducir a un diagnóstico de EW. Sin embargo, las personas que reciben el

diagnóstico de EW pueden preseleccionarse sobre la base de un nivel bajo de ceruloplasmina sérica (Yapur, Bustos, González, & Negri, 2007).

Por otra parte, pacientes con EW que presentan concentraciones normales de ceruloplasmina se han documentado y se siguen identificando muchos casos. En un estudio de pacientes con EW confirmada por técnicas moleculares y mutaciones que presentaban enfermedad hepática crónica, encontraron que aproximadamente un tercio tenían concentraciones séricas normales de ceruloplasmina, determinadas por métodos inmunológicos (Steindl, 1997). Gow y colaboradores (2000) también describen la dificultad de diagnosticar la EW en 4 pacientes con concentraciones normales de ceruloplasmina sérica.

En la actualidad, el desarrollo y la aplicación de ensayos inmunológicos disponibles comercialmente es cada vez mayor en los laboratorios clínicos, generalmente nefelometría automatizada o inmunturbidimétricos para detectar ceruloplasmina sérica (Walshe, 2003).

Los anticuerpos usados en estos ensayos reconocen tanto la HCp funcional como la apoceruloplasmina (ApoCp) no funcional. Por el contrario, el ensayo de la actividad oxidasa mide solo HCp, que es la forma funcionalmente activa de la proteína (Gow, y otros, 2000).

El ensayo de tipo inmunológico puede conducir a una sobreestimación de la cantidad total de ceruloplasmina funcional en el suero en individuos que producen niveles más altos de ApoCp circulante, esta teoría está respaldada por el trabajo de Gow y colaboradores (2000). Por otra parte, Walshe (2003) en un análisis extenso de la medición de ceruloplasmina y cobre en 106 pacientes con EW, demostró que los valores de ceruloplasmina obtenidos inmunológicamente eran consistentemente más altos que los valores de ceruloplasmina oxidasa.

Debido a la dinámica de trabajo del Laboratorio Clínico del Hospital San Juan de Dios (LCHSJD), las muestras que se reciben para el análisis de ceruloplasmina sérica pueden ser referidas al Laboratorio de Nefrología o bien pueden ser enviadas la Laboratorio de Inmunología. Existe en la oferta de análisis del LCHSJD dos determinaciones de

ceruloplasmina sérica, en un caso se determina la concentración en suero por una metodología inmunturbidimétrica realizada en el Laboratorio de Inmunología, y en el otro caso se realiza la determinación de la actividad enzimática de la ceruloplasmina en el Laboratorio de Nefrología.

Actualmente el LCHSJD es el centro de referencia a nivel de la Caja Costarricense de Seguro Social que realiza la determinación de ceruloplasmina sérica, sin embargo existe un desconocimiento por parte del personal médico sobre la existencia de dos metodologías distintas que pueden ser realizadas en este centro médico, por lo que no existe un criterio o consenso estandarizado sobre cuáles ameritan la determinación de concentración sérica y cuáles deben ser procesadas para su determinación de la actividad enzimática. Ciertamente, en muchos casos la solicitud médica indica en el diagnóstico que es por estudio de Enfermedad de Wilson, por lo que a criterio del Microbiólogo Químico Clínico se realiza la determinación de la actividad enzimática, pero en otros casos no se especifica en la orden médica la sospecha diagnóstica y se procesa por la metodología para determinar la concentración sérica.

Se tiene evidencia en la literatura sobre las diferencias significativas en cuanto al desempeño analítico que poseen ambas metodologías, así como la utilidad diagnóstica de la determinación de ceruloplasmina sérica principalmente para la Enfermedad de Wilson al cuantificar su concentración sérica y su actividad enzimática.

Problema

Se desconoce cuál metodología de determinación de ceruloplasmina sérica es la que debe ser utilizada para que brinde al paciente y al médico solicitante la mejor información clínica en la toma de decisiones según sospecha médica, o bien, si ambas metodologías poseen la misma capacidad y desempeño analítico que generarán un resultado confiable para el usuario interno y externo.

Justificación

El LCHSJD es considerado el laboratorio clínico de referencia de la red de centros de salud de la Caja Costarricense de Seguro Social que en la actualidad realiza la determinación de ceruloplasmina sérica, razón por la cual se reciben muestras provenientes de todas las partes del país. Así las cosas, se considera de suma importancia cuidar meticulosamente cada aspecto básico relacionado con dicho análisis, especialmente en las metodologías analíticas disponibles para que sean de mayor utilidad diagnóstica en cuanto a la Enfermedad de Wilson.

Objetivo general

- Determinar el grado de relación que existe entre la actividad enzimática y la concentración de la ceruloplasmina sérica a través de un estudio de correlación para valorar su utilidad clínica.

Objetivos específicos

- Conocer la fisiopatología y características clínicas de la Enfermedad de Wilson para relacionar la importancia del aporte diagnóstico de la determinación de la ceruloplasmina sérica.
- Realizar un análisis estadístico de correlación de actividad enzimática versus concentración de ceruloplasmina en un grupo de muestras con valores bajos, valores dentro del intervalo de referencia y valores altos para valorar su utilidad clínica.
- Recomendar una estrategia diagnóstica con el fin de reducir la duplicidad de pruebas realizadas de ceruloplasmina sérica en el laboratorio clínico del Hospital San Juan de Dios.

MARCO TEÓRICO

Antecedentes

La enfermedad de Wilson, también denominada degeneración hepatolenticular, es un trastorno genético poco común que causa una acumulación excesiva de cobre en el hígado y el cerebro y es fatal si no se detecta y trata. La enfermedad recibió su nombre en honor al médico Samuel Alexander Kinnier Wilson, quien en 1912 informó sobre hallazgos patológicos de degeneración lenticular en el cerebro asociada con cirrosis hepática (Urrutia, Ileana, Sanabria, & Sánchez, 2017).

La epidemiología de la EW varía en todo el mundo, se estima que la patología afecta aproximadamente a 1 de 30 000 personas. Países como Costa Rica y Japón muestran la prevalencia más alta, casi duplicando los informes a nivel mundial, aspecto que se ha convertido en un problema de salud (Urrutia, Ileana, Sanabria, & Sánchez, 2017).

El elevado número de casos en Costa Rica podría explicarse por las altas tasas de consanguinidad en el país, en las que hubo un pequeño número de familias fundadoras y que se remonta al siglo XVIII y bajas tasas de migración. A pesar de la alta incidencia de EW en Costa Rica, en la actualidad, la relación entre el número de muertes por degeneración hepatolenticular y la mortalidad por otras enfermedades hepáticas no está muy definida. Por ello, un grupo de pioneros ha estado trabajando juntos en los últimos años con el objetivo de estudiar a fondo esta enfermedad y crear pautas de tratamiento y diagnóstico específicas para la región (Urrutia, Ileana, Sanabria, & Sánchez, 2017).

En 1970, el médico Antillón-Salazar informó del primer paciente con EW en Costa Rica, un hombre de 17 años. Casi al mismo tiempo, en Canadá, Karl Schosinsky, un costarricense

contribuyó al desarrollo de un método enzimático cuantitativo preciso para la determinación de ceruloplasmina sérica. Aproximadamente trece años después, el Dr. Hevia Urrutia, trató a dos pacientes jóvenes con insuficiencia hepática fulminante en el mismo mes, una condición rara en ese momento. En 1989, la incidencia de EW en Costa Rica se informó de 4,9 por 100 000 habitantes, la más alta del mundo. Dado que la determinación varía mucho según la ubicación, las regiones costarricenses con alta incidencia fueron identificadas y ubicadas en la parte central del país, mostrando una gran similitud con los núcleos de colonización (Urrutia, Ileana, Sanabria, & Sánchez, 2017).

En 2009, se describió la presentación clínica y las características demográficas de los pacientes pediátricos con EW de Costa Rica, que mostraron características similares a las de los niños diagnosticados en otros países. Como en todo el mundo, en Costa Rica los pacientes con EW con insuficiencia hepática fulminante son prioritarios para el trasplante de hígado, sin embargo, cuando esto no es una opción, se administra un tratamiento médico innovador con prostaglandinas, vitamina E y hemoperfusión. En Costa Rica este protocolo de manejo se ha utilizado en los últimos 10 años y ha mostrado resultados positivos en al menos cuatro pacientes. En 2015 se creó una alianza de colaboración que incluye gastroenterólogos, investigadores, neurólogos, psicólogos, psiquiatras, cirujanos, genetistas, así como otros proveedores de atención médica. El propósito principal de esta alianza nacional es modificar la forma en que se brinda atención médica a los pacientes con EW (Urrutia, Ileana, Sanabria, & Sánchez, 2017).

En 1990, se informó que entre 1972 y 1989, se diagnosticaron 150 casos de EW en Costa Rica, de estos 120 fueron tratados en el Hospital San Juan de Dios, y 7 pacientes murieron de insuficiencia hepática aguda, anemia hemolítica, encefalopatía, hemorragia gastrointestinal o insuficiencia renal (Herra, Hevia, Vargas, & Schosinsky, 1989). Al mismo tiempo, debido a la alta prevalencia de la EW en Costa Rica, se establecieron grupos de trabajo interhospitalarios a nivel nacional, integrados por médicos, microbiólogos y patólogos, para analizar diferentes métodos de diagnóstico del metabolismo del cobre en busca de precisión y efectividad. El Dr. Hevia Urrutia y un grupo de pacientes fundaron en 1989 la Asociación Costarricense de Pacientes con Enfermedad de Wilson, cuyo objetivo de

esta asociación era reunir a los pacientes con EW y sus familias para informar, educar y discutir información valiosa sobre medicamentos, atención médica, investigación, detección familiar y apoyo (Urrutia, Ileana, Sanabria, & Sánchez, 2017).

Durante 1997, la determinación de las mutaciones genéticas específicas para los pacientes con EW de Costa Rica demostró ser diferente de las mutaciones en los pacientes estadounidenses y en la mayor parte de Europa; sin embargo, las mutaciones observadas en estos pacientes fueron las mismas que las encontradas en pacientes con EW en Sicilia, Italia. Desde entonces, el mapeo genético familiar de la enfermedad de Wilson ha sido una importante línea de investigación y ha identificado otras mutaciones genéticas que afectan tanto a la población como a las familias más afectadas del país (Urrutia, Ileana, Sanabria, & Sánchez, 2017).

Ceruloplasmina

La ceruloplasmina (Cp) (ferroxidasa - I, EC 1.16.3.1.) es sintetizada en el hígado como una cadena polipeptídica simple, la ceruloplasmina se secreta como una α -2-glicoproteína a nivel plasmático. Si bien, puede ser igualmente sintetizada por células integrantes de otros tejidos como los monocitos, astrocitos y células Sertoli, desde un punto de vista funcional, interviene transportando el 90% del cobre existente en el plasma sanguíneo ya que el otro 10% lo transportará la albúmina (Gow, y otros, 2000).

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 (Ferenci, Guías de Práctica Clínica de la EASL: Enfermedad de Wilson, 2012).

La ceruloplasmina posee una actividad oxidasa inespecífica, participando en reacciones de oxidación de múltiples sustratos orgánicos e inorgánicos, como el ión Fe^{2+} , benzidina, p-

fenilendiamina, N y N-dimetilfenilendiamina entre otros. No obstante, únicamente el ión Fe^{2+} se considera un sustrato biológico para esta enzima. Por otra parte, se ha descrito una acción moduladora en procesos como la coagulación, la angiogénesis, así como una capacidad inactivadora de aminas biogénicas y de defensa frente al estrés oxidativo. Asimismo, forma parte de la familia de proteínas sensibles a la inflamación que incluye la α -1-antitripsina, haptoglobina, Proteína C Reactiva, orosomucoide y fibrinógeno cuyos niveles se han visto asociados a factores de riesgo cardiovascular como hipercolesterolemia, aumento del peso corporal, diabetes e hipertensión arterial y en general son marcadores de inflamación al actuar como proteínas de fase aguda positivas (Aguilar, González, Perona, & Álvarez, 2011).

El gen de la Cp está localizado en el cromosoma 3, siendo sintetizada ésta como una apoproteína (apoceruloplasmina) primordialmente en el hígado, a la que se le incorpora el cobre a nivel del aparato de Golgi, siendo entonces liberada en la sangre como holoceruloplasmina, conteniendo 6 átomos de cobre por molécula. La concentración intracelular de cobre no afecta la síntesis o secreción de apoceruloplasmina (Yapur, Bustos, González, & Negri, 2007).

Fisiopatología y características clínicas de la enfermedad de Wilson

El cobre (Cu) es un nutriente dietético esencial y facilita las reacciones de transferencia de electrones cuando se incorpora a cuproproteínas específicas. Reviste vital importancia para procesos tan diversos como la respiración mitocondrial, la biosíntesis de melanina, el metabolismo de la dopamina, la homeostasis del hierro, la defensa antioxidante, la formación de tejido conectivo y la amidación de péptidos (Culotta & Gitlin, 2001).

Existen vías específicas que permiten el tráfico intracelular y la compartimentación de cobre, asegurando una adecuada síntesis de cuproproteínas evitando la toxicidad celular. Los estudios en humanos que utilizan isótopos de cobre revelan una eliminación rápida y eficiente del cobre de la circulación portal (Sternlieb, 1990). Cuatro horas después de una dosis trazadora de Cu, más del 95% de este isótopo es eliminado de la circulación por el hígado, y en 24 horas reaparece del 6 al 8% incorporado a la ceruloplasmina, que como se ha

mencionado es una ferroxidasa que contiene más del 95% del cobre que se encuentra en el plasma. La excreción biliar es el único mecanismo para la eliminación del cobre y la cantidad de cobre excretada en la bilis es directamente proporcional al tamaño de la reserva de cobre hepático (Hellman & Gitlin, 2002).

El tráfico de cobre en y a través de los hepatocitos implica varias proteínas de transporte:

Transportador de cobre 1 (Ctr1): es una proteína de membrana involucrada en la captación de cobre en la membrana plasmática de los hepatocitos. Ctr1 se expresa en múltiples tipos de células, incluidos hepatocitos y líneas celulares derivadas de hepatoma, y transporta cobre con alta afinidad de una manera saturable y específica de metal (Hellman & Gitlin, 2002).

Metalotioneínas (MT): son un grupo de proteínas intracelulares ricas en cisteína capaces de unirse a iones metálicos, incluidos cobre, cadmio y zinc. MT I y MT II, se expresan ubicuamente en todos los tipos de células, incluidos los hepatocitos, y tienen un papel fundamental para proteger las proteínas intracelulares de la toxicidad del cobre (Hellman & Gitlin, 2002).

Metalochaperonas: median la entrega de cobre a proteínas específicas en circunstancias fisiológicas y están implicados en la transferencia de cobre de la metalotioneína al sitio de síntesis de proteínas que contienen cobre. La chaperona citoplasmática de cobre atox1 es necesaria para la entrega de cobre a la ATPasa de Wilson (ATP7B) en la vía secretora de hepatocitos. Los estudios bioquímicos y estructurales de atox1 revelan que la transferencia de cobre a ATP7B está mediada por la interacción directa proteína-proteína. El análisis de mutaciones específicas en pacientes con enfermedad de Wilson revela que la unión de Atox1 y la transferencia de cobre en esta región amino-terminal son necesarias para el metabolismo hepático normal del cobre. En el entorno de la célula que limita el cobre, la liberación de cobre por atox1 es responsable de iniciar la actividad catalítica y el tráfico intracelular de ambas ATPasas transportadoras de cobre (Hellman & Gitlin, 2002).

ATP7B: es el producto del gen de la enfermedad de Wilson localizado en el cromosoma 13 y reside en hepatocitos en la red trans-Golgi, que transporta el cobre a la vía secretora para su incorporación en apoceruloplasmina y excreción en la bilis (Hellman & Gitlin, 2002).

Hasta ahora, se han descrito más de 200 mutaciones distintas que causan enfermedades en este gen y aproximadamente la mitad de estas mutaciones son de tipo “*non-sense*” o “*sin sentido*”. Se desconocen las consecuencias funcionales de la mayoría de las mutaciones, la más estudiada es la mutación H1069Q. En altas concentraciones de cobre intracelular, esta mutación resultó en una inestabilidad sensible a la temperatura de ATP7B, mientras que el plegado y la estabilidad se mantuvieron en condiciones de bajo contenido de cobre. Por tanto, esta mutación permite la síntesis de ceruloplasmina hasta cierto punto y se asocia con una enfermedad neurológica de aparición tardía. H1069Q también es responsable de la orientación adecuada de ATP en el sitio catalítico de ATP7B antes de la hidrólisis de ATP (Sternlieb, 1990).

La patogenia de la enfermedad hepática de Wilson es una consecuencia directa de la acumulación de cobre en los hepatocitos. Inicialmente provoca daño mitocondrial con alteración de la oxidación de lípidos, lo que resulta en una esteatosis hepática marcada. El patrón de defectos enzimáticos sugiere que la formación de radicales libres y el daño oxidativo, probablemente mediado por la acumulación de cobre mitocondrial, son importantes en la patogénesis de la EW (Ferenci, Pathophysiology and Clinical Features, 2004).

La acumulación de cobre prooxidante dentro de las mitocondrias hepáticas conduce al envejecimiento oxidativo prematuro del ADN mitocondrial al causar mutaciones somáticas del genoma mitocondrial. La liberación de cobre de los hepatocitos necróticos da como resultado un estrés oxidativo que conduce a un mayor daño de los hepatocitos, inflamación y fibrogénesis. La patogenia de la enfermedad de Wilson neurológica es menos clara. Si se agota la capacidad del hígado para almacenar cobre, el cobre se libera a la circulación y prácticamente todos los órganos lo absorben, pero la toxicidad del cobre afecta principalmente al sistema nervioso central. Dado que el cobre no es absorbido por las

neuronas, el aumento de las cantidades de cobre extracelular puede explicar el mecanismo del daño neuronal en la enfermedad de Wilson. La variación genética de la apolipoproteína E tiene un impacto importante en la aparición de síntomas neurológicos en homocigotos H1069Q (Ferenci, Pathophysiology and Clinical Features, 2004).

La enfermedad de Wilson puede presentarse en una variedad de condiciones clínicas, siendo las más comunes la enfermedad hepática y los trastornos neuropsiquiátricos. Ninguno de los signos clínicos es típico y diagnóstico. Uno de los rasgos más característicos de la enfermedad de Wilson es que no hay dos pacientes, ni siquiera dentro de una familia, que sean iguales. Los primeros síntomas, si es que están presentes, no son característicos ni específicos. Las manifestaciones infrecuentes de la enfermedad de Wilson son hipercalciuria y nefrocalcinosis, condrocalcinosis y osteoartritis y manifestaciones cardíacas (Ferenci, Guías de Práctica Clínica de la EASL: Enfermedad de Wilson, 2012).

Anillos Kayser-Fleischer

Este anillo es un sello distintivo de la enfermedad, pero no siempre está presente. Los anillos de Kayser-Fleischer se encuentran en 95% de los pacientes con síntomas neurológicos, pero sólo en 50 a 60% de los pacientes sin síntomas neurológicos y en 10% de los hermanos asintomáticos. Estos anillos se manifiestan como una franja oscura de color dorado o verdoso que está situada en la periferia de la córnea, en el punto en donde esta se une con la esclerótica y se debe a la acumulación de cobre en la membrana de Descemet (Ferenci, Pathophysiology and Clinical Features, 2004).

Enfermedad del hígado

La mayoría de los pacientes con enfermedad de Wilson, cualquiera que sea su presentación clínica o estado presintomático, tienen algún grado de enfermedad hepática. La enfermedad hepática crónica (si no se diagnostica ni se trata) puede preceder a la manifestación de los síntomas neurológicos durante muchos años. La edad común de manifestación hepática es entre 8 y 18 años, pero la cirrosis ya puede presentarse en niños menores de 5 años. Por otro

lado, la enfermedad de Wilson también se diagnostica en pacientes que presentan enfermedad hepática crónica avanzada en sus 50 o 60 años. Además, la enfermedad hepática puede imitar todas las formas de afecciones hepáticas comunes, que van desde transaminasemia asintomática, hepatitis aguda o crónica, insuficiencia hepática fulminante y cirrosis. La hepatitis wilsoniana aguda es indistinguible de otras formas de enfermedades hepáticas agudas (virales o tóxicas). La enfermedad puede deteriorarse rápidamente y parecerse a una insuficiencia hepática fulminante (Steindl, 1997).

Grandes cantidades de cobre almacenado se liberan de los hepatocitos necróticos e inducen una severa anemia hemolítica que complica la enfermedad hepática aguda. El diagnóstico rápido puede resultar muy difícil. La combinación de anemia, ictericia marcada y actividades de las aminotransferasas relativamente bajas en pacientes jóvenes siempre debe suscitar la sospecha de enfermedad de Wilson aguda (Ferenci, Pathophysiology and Clinical Features, 2004).

Los anillos de Kayser-Fleischer y las anomalías neurológicas están ausentes en la mayoría de los pacientes. La mejor prueba de diagnóstico es la cuantificación de cobre en material de biopsia o en el hígado explantado. La enfermedad hepática wilsoniana crónica puede presentarse con un síndrome clínico indistinguible de la hepatitis crónica de otra etiología. Con cierta frecuencia, los anillos de Kayser-Fleischer están ausentes y la ceruloplasmina plasmática se encuentra en el rango normal. Sin tratamiento, los pacientes se deterioran progresivamente y eventualmente mueren de insuficiencia hepática (Ferenci, Pathophysiology and Clinical Features, 2004).

Presentación neurológica

Los síntomas neurológicos generalmente se desarrollan en la mediana edad o en los años veinte, pero también puede presentarse mucho más tarde entre los 45 a 55 años. Los síntomas iniciales pueden ser muy sutiles, como temblores leves, problemas del habla y de la escritura, y con frecuencia se diagnostican erróneamente como problemas de conducta asociados con la pubertad (Ferenci, Guías de Práctica Clínica de la EASL: Enfermedad de Wilson, 2012).

El sello distintivo de la enfermedad de Wilson neurológica es un trastorno progresivo del movimiento. Los síntomas más comunes son disartria, disfagia, apraxia y síndrome de temblor-rigidez (parkinsonismo juvenil) (Ferenci, Guías de Práctica Clínica de la EASL: Enfermedad de Wilson, 2012).

Presentación psiquiátrica

Aproximadamente un tercio de los pacientes presentan inicialmente anomalías psiquiátricas. Los síntomas pueden incluir rendimiento reducido en la escuela o en el trabajo, depresión, estado de ánimo muy lábil, exhibicionismo sexual y psicosis franca. Con frecuencia, los adolescentes con problemas en la escuela o el trabajo son remitidos para recibir asesoramiento psicológico y psicoterapia. Algunos pacientes son hospitalizados en instituciones psiquiátricas por psicosis (Gow, y otros, 2000).

Diagnóstico clínico

El diagnóstico de la enfermedad de Wilson generalmente se basa en hallazgos clínicos típicos y anomalías de laboratorio y puede realizarse sin más pruebas si se presentan dos de los siguientes síntomas: anillos de Kayser-Fleischer, síntomas neurológicos típicos y niveles bajos de ceruloplasmina sérica (Sternlieb, 1990). Un examen clínico cuidadoso realizado por un neurólogo experimentado es más sensible que cualquier otro método para detectar anomalías neurológicas. La resonancia magnética cerebral (IRM) es útil para documentar el alcance de los cambios en el sistema nervioso central. Las anomalías más comunes son cambios en la intensidad de la señal de la sustancia gris y blanca y atrofia del núcleo caudado, tronco encefálico, hemisferios cerebrales y cerebelosos. Con el tratamiento, algunas de las anomalías de la resonancia magnética son completamente reversibles (Ferenci, Pathophysiology and Clinical Features, 2004).

El diagnóstico es mucho más complejo en pacientes que presentan enfermedades hepáticas. Ninguno de los parámetros comúnmente utilizados por sí solo permite un diagnóstico seguro

de la enfermedad de Wilson. Por lo general, es necesaria una combinación de varios parámetros de laboratorio para establecer con firmeza el diagnóstico. Por ejemplo, los anillos Kayser-Fleischer puede estar ausente en hasta el 50% de los pacientes con enfermedad hepática wilsoniana, la ceruloplasmina sérica puede estar en el rango normal bajo en hasta el 45% de los pacientes con enfermedad hepática (Steindl, 1997). Por otro lado, incluso un nivel bajo de ceruloplasmina no es diagnóstico de enfermedad de Wilson en ausencia de anillos de Kayser-Fleischer. Puede ser bajo en sujetos con hipoceruloplasminemia familiar, en sujetos gravemente desnutridos, en enfermedad celíaca y en portadores heterocigotos del gen de la enfermedad de Wilson. Por tanto, en pacientes con enfermedad hepática, un nivel normal de ceruloplasmina no puede excluir, ni un nivel bajo es suficiente para hacer el diagnóstico de enfermedad de Wilson. La excreción de cobre en orina aumenta notablemente en pacientes con enfermedad de Wilson, sin embargo, su utilidad en la práctica clínica es limitada. La estimación de la excreción urinaria de cobre puede ser engañosa debido a una recolección incorrecta del volumen de orina de 24 horas o debido a la contaminación por cobre. En pacientes presintomáticos, la excreción urinaria de cobre puede ser normal, pero puede aumentar después de tratamiento con D-penicilamina. Por otro lado, la excreción urinaria de cobre también aumenta en cualquier enfermedad con necrosis hepatocelular extensa (Gow, y otros, 2000).

Los hallazgos de biopsia hepática generalmente son inespecíficos y no ayudan directamente a hacer el diagnóstico de la enfermedad de Wilson. El contenido de cobre hepático aumenta en el 82% de los pacientes con enfermedad de Wilson y suele superar los 250 $\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco. En ausencia de otras pruebas que sugieran un metabolismo anormal del cobre, el diagnóstico de la enfermedad de Wilson no se puede realizar basándose únicamente en un aumento del contenido de cobre hepático (Ferenci, Pathophysiology and Clinical Features, 2004).

Los pacientes con enfermedades colestáticas crónicas, recién nacidos, niños y sujetos con sobrecarga de cobre exógeno tienen una concentración de cobre hepática aumentada mayor a 250 $\mu\text{g} / \text{g}$. Por lo tanto, aunque el contenido de cobre en el hígado es un parámetro útil, no prueba ni excluye la EW con certeza. El diagnóstico requiere una combinación de una

variedad de pruebas clínicas y bioquímicas. Recientemente, un grupo de expertos internacionales propuso una puntuación basada en una variedad de pruebas y síntomas clínicos. La validez de esta puntuación debe evaluarse de forma prospectiva (Ferenci, Pathophysiology and Clinical Features, 2004).

Análisis de mutaciones

El análisis de mutaciones para el diagnóstico es engorroso debido a la aparición de muchas mutaciones, cada una de las cuales es rara. Además, la mayoría de los pacientes son heterocigotos compuestos (es decir, portan dos mutaciones diferentes). El diagnóstico directo de la mutación es útil solo si una mutación ocurre con una frecuencia razonable en la población. En Europa del Norte, Central y del Este, las mutaciones más comunes son: mutación H1069Q (frecuencia alélica: 43,5%), mutaciones del exón 8 (6,8%), 3400delC (3%) y P969Q (1,6%) (Ferenci et al., 2004).

Una vez que se hace el diagnóstico de la enfermedad de Wilson en un paciente, la evaluación de su familia es obligatoria. La prueba de familiares de segundo grado solo es útil si la mutación se detectó en uno de los miembros inmediatos de su familia. Ninguna otra prueba es capaz de identificar hermanos afectados o portadores heterocigotos del gen de la enfermedad de Wilson con certeza suficiente. Si se desconoce la mutación en el caso, se puede utilizar el análisis de haplotipos. Se han descrito varios marcadores microsatélites altamente polimórficos que flanquean estrechamente el gen y son muy variable. Para tal análisis, se requiere el ADN de al menos un pariente de primer grado y el paciente (Ferenci, Guías de Práctica Clínica de la EASL: Enfermedad de Wilson, 2012).

Tratamiento

Los tratamientos para la EW históricamente progresaron hasta la penicilamina oral de administración más fácil. El desarrollo de agentes alternativos a la penicilamina se vio estimulado por la incapacidad de algunos pacientes para tolerar este fármaco. La trientina se desarrolló e introdujo específicamente para pacientes que desarrollaron reacciones adversas a la penicilamina. El zinc se desarrolló por separado, al igual que el tetratiomolibdato, que los veterinarios usaban para el envenenamiento por cobre en animales. En ausencia de datos comparativos fiables, la elección del fármaco se ha convertido casi en una religión entre los especialistas. Hoy en día, el pilar del tratamiento de la EW sigue siendo una terapia farmacológica de por vida. Según la guía práctica reciente de la AASLD sobre la enfermedad de Wilson, el tratamiento inicial para pacientes sintomáticos debe incluir un agente quelante (penicilamina o trientina). El tratamiento de pacientes presintomáticos o la terapia de mantenimiento de pacientes sintomáticos tratados con éxito se puede lograr con el agente quelante penicilamina o trientina, o con zinc (Ferenci, Guías de Práctica Clínica de la EASL: Enfermedad de Wilson, 2012).

El trasplante de hígado, que corrige el defecto hepático subyacente en la EW, se reserva para casos severos o resistentes. Es el tratamiento de elección en pacientes con enfermedad fulminante o con cirrosis descompensada. El papel del trasplante de hígado en el tratamiento de pacientes con enfermedad de Wilson neurológica en ausencia de insuficiencia hepática es incierto (Herra, Hevia, Vargas, & Schosinsky, 1989).

Métodos de diagnóstico de laboratorio

En general, la combinación de anillos de Kayser-Fleischer y un nivel de concentración de ceruloplasmina sérica bajo (< 10 mg / dL) es suficiente para establecer un diagnóstico. Cuando los anillos de Kayser-Fleischer no están presentes (como es común en la enfermedad de Wilson con manifestación hepática), los niveles de ceruloplasmina en sangre no siempre son fiables, ya que pueden ser bajos por otros motivos (por ejemplo, hepatitis autoinmune, insuficiencia hepática severa, enfermedad celíaca, aceruloplasminemia familiar) o en los

portadores heterocigotos de mutaciones ATP7B que no muestran enfermedad por acumulación de cobre (Ferenci, Guías de Práctica Clínica de la EASL: Enfermedad de Wilson, 2012).

Por otra parte, la inflamación del hígado u otra zona puede hacer que la concentración de ceruloplasmina aumente a los niveles normales, lo que refleja su identidad como una proteína de fase aguda. Esto también es aplicable para el tratamiento con estrógenos. Por ello, para muchos pacientes, podría ser necesaria una combinación de pruebas. Ninguna de las pruebas es específica por sí sola y, por lo tanto, se debe aplicar una serie de pruebas (Ferenci, Guías de Práctica Clínica de la EASL: Enfermedad de Wilson, 2012).

Una puntuación de diagnóstico basada en todas las pruebas disponibles fue propuesta en el 8º Encuentro Internacional sobre la enfermedad de Wilson, Leipzig 2001. El sistema de puntuación propuesto para la enfermedad de Wilson proporciona una buena precisión diagnóstica. El algoritmo diagnóstico basado en esta puntuación se muestra en la tabla 1 (Ferenci, Guías de Práctica Clínica de la EASL: Enfermedad de Wilson, 2012).

Cuadro 1. Sistema de puntuación desarrollado en la 8ª Reunión Internacional sobre la enfermedad de Wilson.

Síntomas y signos clínicos típicos		Otros tests	
Anillos de Kayser-Fleischer		Cobre hepático (en ausencia de colestasis)	
Presentes	2	>5x LSN (>4µmol/g)	2
Ausentes	0	0,8-4µmol/g	1
Síntomas neurológicos**		Normal (<0,8µmol/g)	-1
Severos	2	Gránulos Rodanina-positivos*	1
Moderados	1	Cobre urinario (en ausencia de hepatitis aguda)	
Ausentes	0	Normal	0
Ceruloplasmina sérica		1-2xLSN	1
Normal (>0,2g/L)	0	>2xLSN	2
0,1-0,2g/L	1	Normal, pero >5xLSN después de la D-penicilmamina	2
<0,1g/L	2	Análisis de mutaciones	
Anemia hemolítica Coombs-negativa		Detectadas en ambos cromosomas	4
Presente	1	Detectadas en 1 cromosoma	1
Ausente	0	Sin mutaciones detectadas	0
PUNTUACIÓN TOTAL		Resultado evaluación:	
4 o más		Diagnóstico confirmado	
3		Diagnóstico posible, se necesitan más tests	
2 o menos		Diagnóstico poco probable	

*Si no hay cobre hepático disponible cuantitativamente; ** O anomalías típicas en imágenes de resonancia magnética del cerebro. LSN, límite superior de la normalidad.

Ceruloplasmina sérica

Los niveles de ceruloplasmina en suero se pueden medir enzimáticamente por su actividad oxidasa dependiente de cobre frente sustratos específicos, o mediante ensayos con anticuerpos, como los radioinmunoensayos, la inmunodifusión radial, nefelometría e inmunoturbidimetría. Los ensayos inmunológicos pueden sobreestimar las concentraciones de ceruloplasmina, ya que no discriminan entre apoceruloplasmina y holoceruloplasmina. La concentración normal de ceruloplasmina medida por ensayo enzimático varía entre laboratorios (con un límite inferior entre 15 y 20 mg / dL). En la enfermedad de Wilson, por lo general, es inferior a 10 mg / dL. Las concentraciones séricas de ceruloplasmina se elevan por inflamación aguda, en estados asociados con hiperestrogenemia, como el embarazo y la suplementación con estrógenos. Los niveles de ceruloplasmina sérica se encuentran típicamente bajos en pacientes con afectación neurológica debido a enfermedad de Wilson, pero pueden estar en el rango normal o bajo en aproximadamente la mitad de los pacientes con enfermedad hepática activa. Por otro lado, la ceruloplasmina sérica puede estar disminuida en otras enfermedades o condiciones con gran pérdida de proteínas por vía renal o entérica, en síndromes de malabsorción o con enfermedad hepática grave en fase terminal de cualquier etiología (Ferenci, Guías de Práctica Clínica de la EASL: Enfermedad de Wilson, 2012).

Los pacientes con aceruloplasminemia carecen de la proteína en su totalidad debido a mutaciones en el gen de la ceruloplasmina en el cromosoma 3. Estos pacientes pueden presentar hemosiderosis, pero no presentan acumulación de cobre. Por lo tanto, la ceruloplasmina sérica por sí sola no es suficiente para diagnosticar o descartar la enfermedad de Wilson (Ferenci, Guías de Práctica Clínica de la EASL: Enfermedad de Wilson, 2012).

Un estudio prospectivo sobre la ceruloplasmina sérica, utilizándola como prueba de cribado para la enfermedad de Wilson en pacientes remitidos con enfermedad hepática, mostró que el valor predictivo de presentar un nivel de ceruloplasmina por debajo de lo normal era del 6 %. En niños con enfermedad de Wilson, 15-36 % tenían una concentración de ceruloplasmina en el rango normal (Perman, Werlin, Grand, & J, 1979).

En un estudio de series de casos, 12 de los 55 pacientes con enfermedad de Wilson tenían niveles de ceruloplasmina normal y no presentaban anillos de Kayser-Fleischer (Steindl, 1997). El valor predictivo positivo de la ceruloplasmina sérica para el diagnóstico de la enfermedad de Wilson en la insuficiencia hepática aguda es muy bajo (Korman, y otros, 2008).

En un estudio publicado en la década pasada, la medición de la actividad oxidasa de la ceruloplasmina sérica fue superior a los ensayos inmunológicos para el diagnóstico de la enfermedad de Wilson, pero estas pruebas no están disponibles en los laboratorios comunes (Merle, Eisenbach, Weiss, Tuma, & Stremmel, 2009).

Cobre sérico

Aunque es una enfermedad en la que se produce acumulación de cobre, el cobre sérico total (que incluye el cobre incorporado en la ceruloplasmina) en la enfermedad de Wilson suele disminuir en proporción a la disminución de la concentración de ceruloplasmina en sangre. En pacientes con daño hepático grave, el cobre sérico puede estar dentro del rango normal, independientemente de si los niveles de ceruloplasmina sérica son elevados o bajos (Gow, y otros, 2000).

En el contexto de la insuficiencia hepática aguda debida a la enfermedad de Wilson, los niveles de cobre sérico pueden incluso estar especialmente elevados debido a la liberación repentina del metal desde los almacenes hepáticos. Los niveles de cobre sérico normales o elevados, junto a una disminución de los niveles de ceruloplasmina, indican un aumento en la concentración de cobre que no está unido a la ceruloplasmina en la sangre. En la mayoría de pacientes no tratados, se eleva por encima de 200 $\mu\text{g} / \text{L}$. La concentración de cobre sérico no unido a ceruloplasmina puede estar elevada en la insuficiencia hepática aguda de cualquier etiología, en la colestasis crónica, y en la intoxicación por cobre. El principal problema de utilizar el cobre no unido a ceruloplasmina como prueba diagnóstica para la enfermedad de Wilson es que depende de la adecuación de los métodos para medir tanto el cobre como la ceruloplasmina séricos. Es de más valor en el control de la farmacoterapia que en el diagnóstico de la enfermedad de Wilson (Korman, y otros, 2008).

Excreción urinaria de cobre

La cantidad de cobre excretada por vía urinaria en un período de 24 horas puede ser útil para el diagnóstico de la enfermedad de Wilson y para el seguimiento del tratamiento. En los pacientes no tratados, la excreción urinaria de cobre en 24 horas refleja la cantidad de cobre no unido a ceruloplasmina circulante. El volumen de orina exacta y la excreción total de creatinina en 24 horas son importantes para la determinación precisa de la excreción urinaria de cobre. En caso de insuficiencia renal, la prueba no es aplicable. En los pacientes sintomáticos no tratados, una excreción de cobre superior a $1,6 \mu\text{mol} / 24\text{h}$ ($100 \mu\text{g} / 24\text{h}$) se toma como el diagnóstico de la enfermedad de Wilson. Sin embargo, la excreción urinaria basal de cobre en 24 horas puede ser menor que $1,6 \mu\text{mol} / 24\text{h}$ en la presentación de la enfermedad en el 16-23% de los pacientes, especialmente en niños y hermanos asintomáticos (Ferenci, Guías de Práctica Clínica de la EASL: Enfermedad de Wilson, 2012).

Debido a que la excreción urinaria de cobre es insignificante en individuos sanos, excreciones urinarias de cobre superiores a $0,64 \mu\text{mol} / 24 \text{ h}$ pueden ser sugestivas de enfermedad de Wilson en niños asintomáticos. Los problemas que pueden surgir en la medición del cobre excretado en 24 horas incluyen recogida incompleta de orina, y, por otra parte, la contaminación del dispositivo de recogida de cobre (esta última menos problemática con la aparición de envases desechables) (Ferenci, Guías de Práctica Clínica de la EASL: Enfermedad de Wilson, 2012).

La interpretación de la excreción urinaria de cobre en 24 horas puede ser difícil debido a la coincidencia con los niveles encontrados en otros tipos de enfermedad hepática (por ejemplo, hepatitis autoinmune, enfermedad hepática crónica activa o colestasis y, en particular, durante la insuficiencia hepática aguda de cualquier origen). Los heterocigotos pueden tener también una mayor excreción de cobre que los controles, que raramente sobrepasan los niveles normales del rango (Ferenci, Guías de Práctica Clínica de la EASL: Enfermedad de Wilson, 2012).

Concentración de cobre en el parénquima hepático

La acumulación de cobre en el hígado es la característica distintiva de la enfermedad de Wilson. Sin embargo, los colorantes específicos como rodamina y la orceína revelan acumulaciones de cobre en menos del 10 % de los pacientes, ya que sólo detectan las deposiciones de cobre lisosomal. Por lo tanto, la acumulación hepática de cobre no puede ser descartada únicamente por la evaluación histoquímica de una biopsia de hígado. Por ello, la medición de la concentración de cobre del parénquima hepático es el método de elección para el diagnóstico de la enfermedad de Wilson. Las biopsias para la determinación cuantitativa del cobre deben ser colocadas en un recipiente seco libre de cobre. El envío de muestras para la determinación cuantitativa del cobre no requiere precauciones especiales, como la congelación. En general, la exactitud de la medición se mejora con el tamaño de la muestra adecuada: se necesita para el correcto análisis al menos 1cm de longitud en el centro de la biopsia (Ferenci, Guías de Práctica Clínica de la EASL: Enfermedad de Wilson, 2012).

Materiales y métodos

Se realizó un estudio analítico, experimental, con el objetivo principal de determinar la concentración sérica y la actividad enzimática de remanentes de muestras de pacientes para diversos estudios en las Divisiones de Inmunología y Nefrología del LCHSJD. Adicionalmente se contó la exoneración del permiso del Comité Ético Científico del Hospital San Juan de Dios para el desarrollo de esta investigación (Anexo 1).

Se analizaron 165 muestras de suero por dos metodologías distintas para determinar ceruloplasmina sérica en el LCHSJD. En primer lugar, se determinó la actividad enzimática de la ceruloplasmina sérica por el método utilizando o-dianisidina dihidrocloruro como sustrato (Schosinsky, Lehmann, & Beeler, Measurement of Ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-Dianisidine dihydrochloride , 1974) y posteriormente se determinó la concentración sérica de la ceruloplasmina de las mismas muestras por un método inmunturbidimétrico (Anexo 2) en un analizador automatizado *COBAS c311* de *ROCHE*.

Se realizó un estudio de correlación de Pearson para las 165 muestras entre el método considerado como referencia que es la actividad enzimática y la concentración sérica que es el método de estudio.

Adicionalmente, se segregaron en tres grupos distintos según el resultado obtenido por la metodología de actividad enzimática y basados en los valores de referencia definidos por esta metodología (Schosinsky, y otros, 1989) en “valores por debajo del valor inferior de referencia”, “valores dentro del intervalo de referencia” y “valores superiores al límite superior de referencia” y se realizó un estudio de correlación de Pearson para cada grupo.

Resultados

El análisis de correlación de Pearson realizado a las 165 muestras mostró un coeficiente de correlación $r = 0,84$ (Figura 1) obtenido en el software Excel. El valor mínimo de actividad enzimática fue de 0,6 UI/L, mientras que el valor máximo obtenido fue de 332 UI/L. Por su parte el valor mínimo de concentración sérica fue de 3 mg/dL, mientras que el valor máximo obtenido fue de 74 mg/dL.

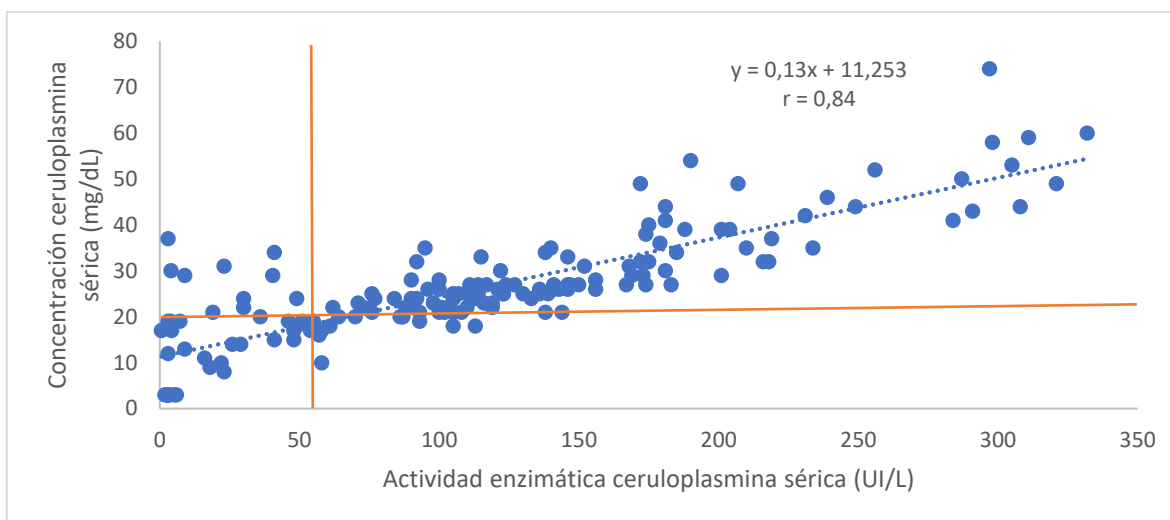


Figura 1. Estudio de correlación entre la actividad enzimática y la concentración de la ceruloplasmina sérica.

Dentro de la categoría “valores menores al límite inferior de referencia” se tomaron en cuenta todos aquellos valores con un resultado de actividad enzimática menores a 55 UI/L, para un $n = 43$. Al realizar el análisis de Pearson se obtuvo un coeficiente de correlación $r = 0,40$ (Figura 2). El valor mínimo de actividad enzimática fue de 0,6 UI/L, mientras que el valor máximo obtenido fue de 54 UI/L. Por su parte el valor mínimo de concentración sérica fue de 3 mg/dL, mientras que el valor máximo obtenido fue de 37 mg/dL.

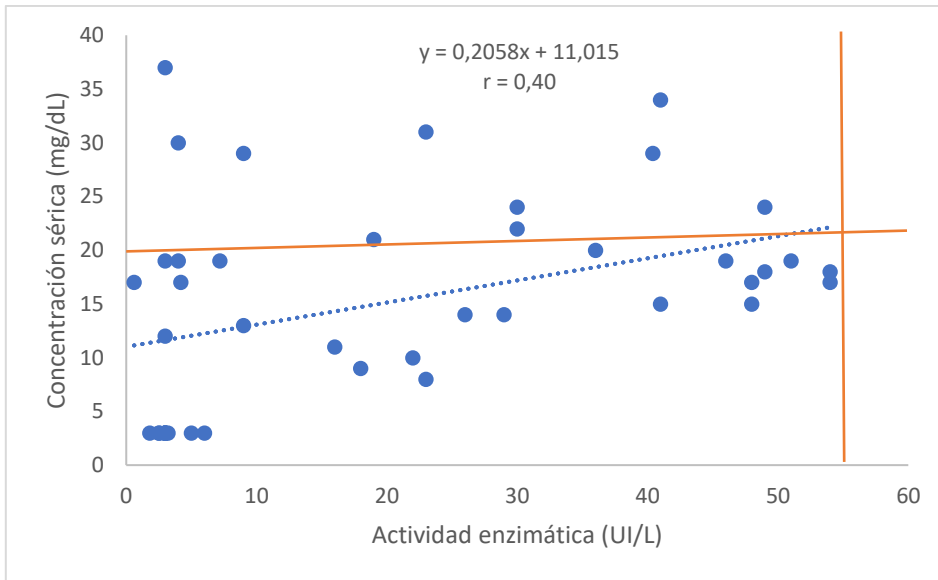


Figura 2. Estudio de correlación entre la actividad enzimática y la concentración de la ceruloplasmina sérica para la categoría “valores menores al límite inferior de referencia”.

Dentro de la categoría “valores dentro del intervalo de referencia” se tomaron en cuenta todos aquellos valores con un resultado de actividad enzimática entre 55 UI/L y 150 UI/L, para un $n = 79$. Al realizar el análisis de Pearson se obtuvo un coeficiente de correlación $r = 0,44$ (Figura 3). El valor mínimo de actividad enzimática fue de 57 UI/L, mientras que el valor máximo obtenido fue de 150 UI/L. Por su parte el valor mínimo de concentración sérica fue de 10 mg/dL, mientras que el valor máximo obtenido fue de 42 mg/dL.

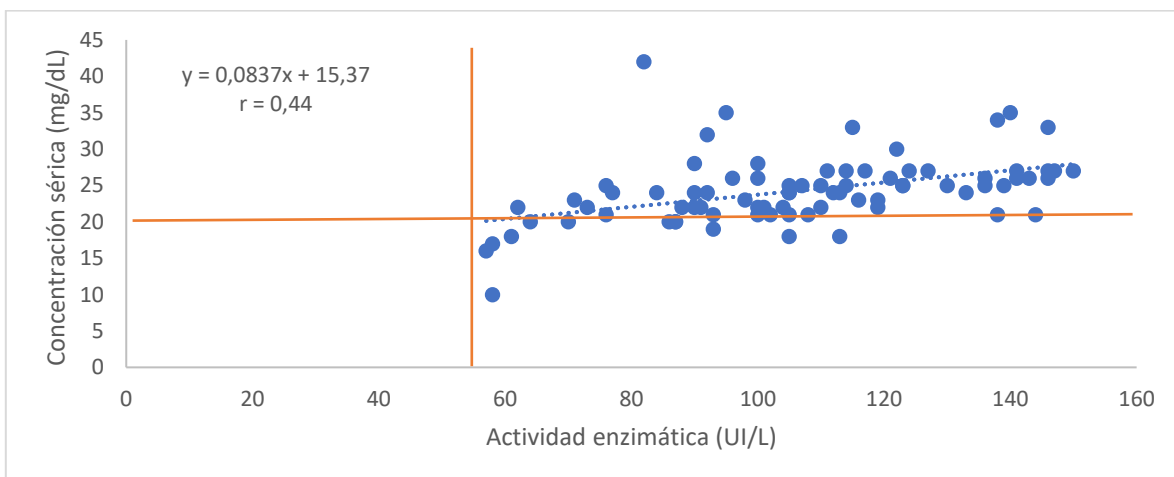


Figura 3. Estudio de correlación entre la actividad enzimática y la concentración de la ceruloplasmina sérica para la categoría “valores dentro del intervalo de referencia”

Dentro de la categoría “valores mayores al límite superior de referencia” se tomaron en cuenta todos aquellos valores con un resultado de actividad enzimática mayor a 150 UI/L, para un $n = 43$. Al realizar el análisis de Pearson se obtuvo un coeficiente de correlación $r = 0,74$ (Figura 4). El valor mínimo de actividad enzimática fue de 152 UI/L, mientras que el valor máximo obtenido fue de 332 UI/L. Por su parte el valor mínimo de concentración sérica fue de 26 mg/dL, mientras que el valor máximo obtenido fue de 74 mg/dL.

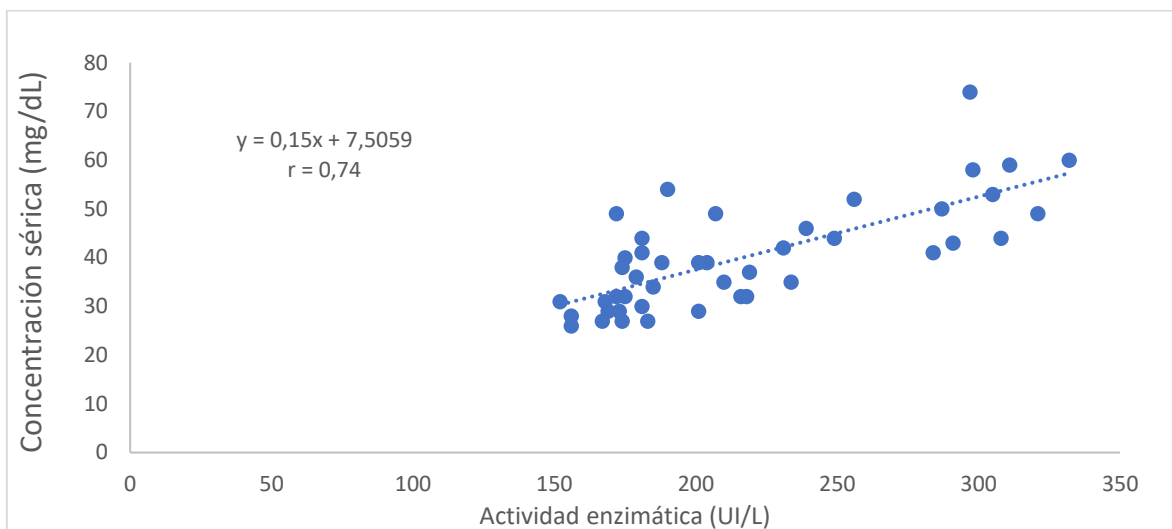


Figura 4. Estudio de correlación entre la actividad enzimática y la concentración de la ceruloplasmina sérica para la categoría “valores mayores al límite superior de referencia”.

Discusión

El diagnóstico temprano de la EW es esencial porque un tratamiento específico de por vida puede prevenir una mayor lesión hepática y complicaciones neurológicas en la mayoría de los casos. Especialmente en pacientes con enfermedad hepática, el diagnóstico de EW es a menudo difícil, ya que ninguno de los parámetros de diagnóstico comúnmente utilizados proporciona un grado razonable de certeza para establecer o excluir el diagnóstico de EW (Merle, Eisenbach, Weiss, Tuma, & Stremmel, 2009).

Aunque la deficiencia de ceruloplasmina, por lo tanto, podría representar solo un epifenómeno de EW, la concentración sérica de ceruloplasmina se considera una prueba de laboratorio útil para el diagnóstico de EW. Sin embargo, en un estudio sólo el 73% de los pacientes con EW con mutación confirmada por métodos moleculares, que presentaban enfermedad hepática crónica, tenían concentraciones de ceruloplasmina sérica menores a 20 mg/dL (Steindl, 1997).

Walshe y colaboradores (2003) mostraron que en pacientes con deterioro de la función hepática debido a una enfermedad hepática grave (aguda o crónica), el valor diagnóstico de la ceruloplasmina puede verse afectado, ya que su nivel sérico puede disminuir, presumiblemente debido a la falla de las funciones sintéticas del hígado.

La mayoría de los laboratorios de rutina utilizan el método inmunológico para determinar la ceruloplasmina sérica, que desafortunadamente reconoce tanto la apoceruloplasmina biológicamente inactiva como la holoceruloplasmina biológicamente activa cargada con cobre. En los pacientes con EW, la ceruloplasmina no se carga adecuadamente con cobre y, por lo tanto, se excreta parcialmente en el suero como apoceruloplasmina que carece de actividad enzimática (Merle, Eisenbach, Weiss, Tuma, & Stremmel, 2009).

Por tanto, especialmente en pacientes con EW, la actividad enzimática de la ceruloplasmina sérica debería tener un valor diagnóstico mayor que su concentración medida inmunológicamente (Merle, Eisenbach, Weiss, Tuma, & Stremmel, 2009).

Se sabe que los parámetros de diagnóstico establecidos: excreción urinaria de cobre, concentración sérica de ceruloplasmina y nivel sérico de cobre tienen sensibilidades y especificidades de sólo 80-90%. La medición del contenido de cobre hepático tiene una alta sensibilidad de 96,5%, pero requiere una biopsia hepática invasiva. En un estudio (Merle, Eisenbach, Weiss, Tuma, & Stremmel, 2009), se demostró que el ensayo enzimático de ceruloplasmina tiene una especificidad mucho mayor para diagnosticar la EW que el ensayo inmunológico (100% vs. 78,8%), mientras que ambas pruebas tienen las mismas sensibilidades (93,6%).

El método enzimático mide la holoceruloplasmina activa biológica exclusivamente, mientras que la prueba inmunológica de ceruloplasmina mide la ceruloplasmina total, es decir tanto la ApoCp como la HCp, dado lo anterior se puede decir que el ensayo de tipo inmunológico puede conducir a una sobreestimación de la cantidad total de ceruloplasmina funcional en el suero en individuos que producen niveles más altos de ApoCp circulante, esta teoría está respaldada por el trabajo de Gow y colaboradores (2000). Por otra parte, Walshe (2003) en un análisis extenso de la medición de ceruloplasmina y cobre en 106 pacientes con EW, demostró que los valores de ceruloplasmina obtenidos inmunológicamente eran consistentemente más altos que los valores de ceruloplasmina oxidasa.

En el presente trabajo se evidencia que los coeficientes de correlación obtenidos en las 165 muestras, así como en los 3 subgrupos están muy lejos de demostrar una buena correlación estadística entre ambas metodologías. Lo anterior es consistente en un estudio realizado con pacientes diagnosticados con EW y se observa una discrepancia de los niveles de ceruloplasmina obtenidos por el ensayo enzimático e inmunológico de ceruloplasmina y se refleja en ese estudio en la correlación más débil siendo de $r = 0,70$ (Merle, Eisenbach, Weiss, Tuma, & Stremmel, 2009).

En el estudio por Merle y colaboradores en 2009, además demostraron la utilidad de la determinación de la actividad enzimática de la ceruloplasmina en pacientes con EW mediante el método descrito por Schosinsky y colaboradores en 1974, y concluyen que el método es suficientemente simple para ser adecuado para el uso clínico de rutina, y afirman que la medición de la actividad oxidasa de la ceruloplasmina en suero es una prueba bioquímica

discriminatoria para diagnosticar o excluir la EW de forma no invasiva y por último sentencian que esa prueba arrojó una excelente especificidad y una alta sensibilidad para el diagnóstico de EW.

Las concentraciones bajas de ceruloplasmina sérica, generalmente detectadas con el uso de un ensayo inmunológico, se usan comúnmente en la práctica como un indicador de diagnóstico de la EW. La prueba inmunológica es rápida (generalmente se realiza con el uso de nefelometría o turbidimetría automatizada) y proporciona una medida precisa de la ceruloplasmina total, pero no distingue entre HCp y ApoCp, sin embargo, se demostró que los valores de ceruloplasmina obtenidos con el uso de un ensayo inmunológico pueden ser considerablemente más altos que los medidos enzimáticamente, y es que la medición de la cantidad total de proteína ceruloplasmina puede no reflejar la actividad de la enzima ceruloplasmina en el suero. El uso de la prueba de oxidasa también es más apropiado para la identificación de aceruloplasminemia hereditaria, que, como la EW, puede causar enfermedad neurológica (Macintyre, y otros, 2004).

La aparición de una respuesta inflamatoria, que podría aumentar el nivel de ApoCp circulante en el rango normal, o un aumento de la concentración de una oxidasa sérica adicional puede contribuir a la mala correlación observada en estas muestras. Un componente sérico adicional con actividad oxidasa puede explicar la mayor actividad oxidasa observada en el ensayo enzimático en comparación con la concentración detectada inmunológicamente, como también se observa en la EW (Macintyre, y otros, 2004).

Un valor disminuido de ceruloplasmina sérica evaluado inmunológicamente puede ser beneficioso en el diagnóstico del diagnóstico de EW, pero el uso de la prueba de oxidasa para la evaluación de ceruloplasmina es probablemente más informativo, particularmente en el caso de disfunción neurológica. Los pacientes con niveles aparentemente normales de ceruloplasmina, pero baja actividad oxidasa podrían ser excluidos erróneamente de las pruebas adicionales para EW, y es precisamente lo que se persigue en este estudio, evitar los falsos negativos para esta enfermedad demostrando la pobre correlación existente entre la medición de ceruloplasmina sérica medida por inmunoturbidimetría y la determinada por actividad enzimática.

Conclusiones

Si bien la degeneración hepatolenticular es una enfermedad rara en todo el mundo, es mucho más común en Costa Rica. En las últimas décadas se han logrado importantes avances relacionados con la patología a través de una serie de acciones y esfuerzos en política de salud, política y trabajo multidisciplinario.

Debido a la importancia que se le da a la concentración reducida de ceruloplasmina como indicador de EW y la pobre correlación con los resultados enzimáticos, el uso de inmunoensayos automatizados para la evaluación de ceruloplasmina puede dificultar la identificación de pacientes con EW. El uso del ensayo enzimático para medir la actividad oxidasa de la ceruloplasmina es un indicador más apropiado y biológicamente relevante de la ceruloplasmina sérica.

Los síntomas neurológicos o hepáticos y los valores reducidos de ceruloplasmina oxidasa deben considerarse indicadores fuertes de una posible EW y deben estimular un análisis adicional. Sin embargo, incluso los pacientes con valores normales de ceruloplasmina sérica deben considerarse para ensayos adicionales, particularmente cobre en orina de 24 horas.

Debido a que el tratamiento de la EW es eficaz, se han realizado esfuerzos a nivel mundial para desarrollar un ensayo adecuado para el cribado de la población o subpoblación para detectar esta afección potencialmente mortal. Estudios que se basan en la detección inmunológica de ceruloplasmina en suero o sangre seca puede conducir a una subestimación de la prevalencia de la EW. El desarrollo de un ensayo de ceruloplasmina oxidasa de alto rendimiento podría ser más relevante en el diagnóstico de EW.

Finalmente, se recomienda al LCHSJD no realizar determinaciones de ceruloplasmina sérica basadas únicamente en la concentración de esta proteína llevadas a cabo por inmunoturbidimetría, especialmente en pacientes con sospechas diagnósticas por Enfermedad de Wilson, ya que como se demostró en el presente trabajo existe una baja correlación entre las 2 metodologías disponibles en todo su rango analítico, a valores menores al límite inferior de referencia, a valores dentro del intervalo de referencia y a valores

mayores al límite superior de referencia determinados por la metodología de la actividad enzimática que es considerado aún el estándar de oro para la determinación de esta proteína.

Referencias

- Aguilar, M., González, E., Perona, J., & Álvarez, J. (2011). Ceruloplasmina y su importancia clínica como factor indicador del riesgo cardiovascular en una población de escolares de Granada. *Nutr Hosp*, 655-658.
- Culotta, V., & Gitlin, J. (2001). *The Molecular and Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill.
- Ferenci, P. (2004). Pathophysiology and Clinical Features. *Metabolic Brain Disease*, 229-239.
- Ferenci, P. (2012). Guías de Práctica Clínica de la EASL: Enfermedad de Wilson. *Journal of Hepatology*, 671-685.
- Gow, P., R, S., Angus, P., A, S., Wall, A., & R, S. (2000). Diagnosis of Wilson's disease: an experience over three decades. *Gut*, 415-419.
- Hellman, N., & Gitlin, J. (2002). Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu. Rev. Nutr*, 439-458.
- Herra, S., Hevia, F., Vargas, M., & Schosinsky, M. (1990). Fulminant Wilson's disease in Costa Rica. Clinico-pathological study of 7 cases. *G E N*, 9-14.
- Korman, J., Volenberg, I., B. J., Webster, J., Schiodt, F., & Squires, J. R. (2008). Screening for Wilson disease in acute liver failure: a comparison of currently available diagnostic tests. *Hepatology*, 1167-1174.
- Macintyre, G., S, K., Gutfreund, W., M, W., Richard, C., & Diane, C. (2004). Value of an enzymatic assay for the determination of. *J Lab Clin Med*, 294-301.
- Merle, U., Eisenbach, C., Weiss, K., Tuma, S., & Stremmel, W. (2009). Serum ceruloplasmin oxidase activity is a sensitive and highly specific diagnostic marker for Wilson's disease. *J Hepatol*, 925-930.
- Perman, J., Werlin, S., Grand, R., & J, W. (1979). Laboratory measures of copper metabolism in the differentiation of chronic active hepatitis and Wilson disease in children. *J Pediatr*, 564-568.

- Schosinsky, K., Lehmann, H., & Beeler, M. (1974). Measurement of Ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-Dianisidine dihydrochloride . *Clin.Chem*, 1556-1563.
- Schosinsky, K., Vargas, M., Esquivel, A., Grant, S., Artavia, A., & Chavarría, M. (1989). Hallazgos de laboratorio en 61 casos de enfermedad de Wilson en Costa Rica. *BINASSS*, 11-21.
- Steindl, P. (1997). Wilson's disease in patients presenting with liver disease: a diagnostic challenge. *Gastroenterology*, 212-218.
- Sternlieb, I. (1990). Perspectives on Wilson's disease. *Hepatology*, 1234-1239.
- Urrutia, H., Ileana, A., Sanabria, A., & Sánchez, M. (2017). National alliance for Wilson's disease: health policy in Costa Rica. *Hepatology, Medicine and Policy*, 1-6.
- Walshe, J. (2003). Wilson's disease: the importance of measuring serum caeruloplasmin non-immunologically. *Ann Clin Biochem*, 115-121.
- Yapur, V., Bustos, M., González, A., & Negri, G. (2007). Ceruloplasmina: determinación de su actividad ferroxidasa. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 347-351.

ANEXO 1. Exoneración de permiso Investigación Médica por parte del Comité Ético Científico del Hospital San Juan de Dios.



Hospital San Juan de Dios
DIRECCIÓN GENERAL
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO

175 ANIVERSARIO HOSPITAL
San Juan
de Dios

02 de octubre del 2020
HSJD-133-CEC-2020

Dr. Vernon Rojas Montero
Microbiólogo y Químico Clínico
Laboratorio Clínico
Hospital San Juan de Dios

ASUNTO: RESPUESTA A SU OFICIO

Estimado Doctor:

Con base en su oficio de fecha 16 de setiembre del presente año, le informo que su investigación la cual "consiste en efectuar una comparación de métodos analíticos para la determinación de ceruloplasmina sérica..." no corresponde a una Investigación Biomédica, por lo que no requiere del análisis y autorización de un Comité Ético Científico.

Sin otro particular, se suscribe,

Atentamente,

COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO

Dr. Ronald Gutiérrez Cerdas
Presidente




ANEXO 2. Inserto determinación de concentración sérica de ceruloplasmina analizador COBAS c311 de ROCHE.

002079498222c901V13.0

CERU

Ceruloplasmin

Información de pedido



REF	CONTENT	ID del sistema	Analizadores adecuados para el cobas c pack
20764663 322	Ceruloplasmin, 100 pruebas	07 6466 3	Roche/Hitachi cobas c 311, cobas c 501/502
03555941 190	Calibrator f.a.s. PAC (3 x 1 mL)	Código 589	
04567021 190	Prealbumin/Ceruloplasmin Control Set*		
	Precinorm PC (3 x 1 mL)	Código 102	
	Precipath PC (3 x 1 mL)	Código 103	
05117003 190	PreciControl ClinChem Multi 1 (20 x 5 mL)	Código 391	
05947626 190	PreciControl ClinChem Multi 1 (4 x 5 mL)	Código 391	
05947626 160	PreciControl ClinChem Multi 1 (4 x 5 mL, para los EE.UU.)	Código 391	
05117216 190	PreciControl ClinChem Multi 2 (20 x 5 mL)	Código 392	
05947774 190	PreciControl ClinChem Multi 2 (4 x 5 mL)	Código 392	
05947774 160	PreciControl ClinChem Multi 2 (4 x 5 mL, para los EE.UU.)	Código 392	
04489357 190	Diluent NaCl 9 % (50 mL)	07 6869 3	

*No destinado al uso en los EE.UU.; se recomienda a los clientes estadounidenses el uso de otro material de control disponible en el comercio.

Español

Información del sistema

Analizadores cobas c 311/501:
CER: ACN 707

Analizadores cobas c 502:
CER: ACN 8707

Uso previsto

Test in vitro para la determinación cuantitativa de la ceruloplasmina en suero y plasma humanos en los sistemas Roche/Hitachi cobas c.

Características^{1,2,3}

La ceruloplasmina es una proteína de fase aguda y de transporte. Esta glucoproteína de color azul contiene 8 átomos de cobre por molécula y pertenece, considerando su reacción electroforética, a la fracción de la α₂-globulina.

Durante su síntesis en los hepatocitos, la ceruloplasmina incorpora cobre a su estructura. Tras secretarse del hígado, la ceruloplasmina migra a los tejidos que requieren cobre donde lo libera en un proceso catabólico. Además del transporte de cobre, la ceruloplasmina tiene también una función catalítica en la oxidación de hierro (Fe²⁺ a Fe³⁺), poliaminas, catecolaminas y polifenoles.

Concentraciones disminuidas de ceruloplasmina se encuentran en la degeneración hepatolenticular con carácter autosómico recesivo (enfermedad de Wilson). Esta enfermedad que cursa acompañada por una síntesis reducida de la ceruloplasmina, se manifiesta a nivel de la patología química como consecuencia de una deficiencia en la incorporación molecular de Cu²⁺ debido a metalotioneínas defectuosas. Como consecuencia de ello, el cobre se deposita patológicamente en el hígado (desarrollándose una cirrosis), el cerebro (con la aparición de síntomas neurológicos), la córnea (anillo de Kayser-Fleischer) y el riñón (hematuria, proteinuria, aminoaciduria). En portadores homocigotos, las concentraciones de ceruloplasmina se encuentran severamente reducidas, mientras que en los portadores heterocigotos no se registran aumentos o sólo un leve incremento de las mismas. El síndrome de Menke, poco frecuente, se caracteriza por un trastorno genético de absorción de cobre con disminución del nivel de ceruloplasmina. Las causas más importantes de la insuficiencia adquirida de ceruloplasmina son los síndromes de pérdida de proteínas y la pérdida de hepatocitos. Ya que la ceruloplasmina es un fuerte reactante de fase aguda, su concentración está elevada en inflamaciones agudas y crónicas. En caso de concentraciones muy altas, el suero puede tomar una coloración azul verdosa. Los métodos de análisis de la ceruloplasmina incluyen la inmunodifusión, la nefelometría y la turbidimetría.

Principio del test²

Prueba Inmunoturbidimétrica.

La ceruloplasmina humana forma un precipitado con un antisuero específico que se determina por turbidimetría.

Reactivos - Soluciones de trabajo

R1 Acelerador
Polietilenglicol (PEG): 50 g/L; tampón fosfato; conservante

R2 Antisuero T anti-ceruloplasmina (conejo) específico de la ceruloplasmina humana: > 0.42 g/L; tampón fosfato; conservante

R1 está en la posición B y R2 en la posición C.

Medidas de precaución y advertencias

Producto sanitario para diagnóstico in vitro.
Observe las medidas de precaución habituales para la manipulación de reactivos.
Elimine los residuos según las normas locales vigentes.
Ficha de datos de seguridad a la disposición del usuario profesional que la solicite.
Para los EE.UU.: ¡Atención! Según la ley federal estadounidense, este producto puede ser vendido exclusivamente por médicos o según prescripción médica.

Preparación de los reactivos

Los reactivos están listos para el uso.

Conservación y estabilidad

CERU

Sin abrir, a 2-8 °C: véase la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del cobas c pack.

En uso y refrigerado en el analizador: 8 semanas

Diluyente NaCl al 9 %

Sin abrir, a 2-8 °C: véase la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del cobas c pack.

En uso y refrigerado en el analizador: 12 semanas

000794-062224201V10.0

CERU

Cerutoplasmin

cobas[®]**Obtención y preparación de las muestras**

Emplear únicamente tubos o recipientes adecuados para recoger y preparar las muestras.

Sólo se ha analizado y considerado apto el tipo de muestra aquí indicado.

Suero.

Plasma tratado con heparina de litio.

Los tipos de muestra aquí indicados fueron analizados con tubos de recogida de muestras seleccionados, comercializados en el momento de efectuar el análisis, lo cual significa que no fueron analizados todos los tubos de todos los fabricantes. Los sistemas de recogida de muestras de diversos fabricantes pueden contener diferentes materiales que, en ciertos casos, pueden llegar a afectar los resultados de los análisis. Si las muestras se procesan en tubos primarios (sistemas de recogida de muestras), seguir las instrucciones del fabricante de tubos.

Centrifugar las muestras que contienen precipitado antes de realizar el ensayo.

Estabilidad: ⁴	8 días a 20-25 °C
	2 semanas a 4-8 °C
	1 año a -20 °C

Material suministrado

Consultar la sección "Reactivos - Soluciones de trabajo" en cuanto a los reactivos suministrados.

Material requerido adicionalmente (no suministrado)

- Consultar la sección "Información de pedido"
- Equipo usual de laboratorio

Realización del test

Para garantizar el funcionamiento óptimo del test, observe las instrucciones de la presente metodología referentes al analizador empleado. Consulte el manual del operador apropiado para obtener las instrucciones de ensayo específicas del analizador.

Roche no se responsabiliza del funcionamiento de las aplicaciones no validadas por la empresa. En su caso, el usuario se hace cargo de su definición.

Aplicación para suero y plasma**Definición del test para el analizador cobas c 311**

Tipo de test	2 puntos finales		
Tiempo de reacción / Puntos de medición	10/6-25		
Longitud de onda (sub/princ)	700/340 nm		
Dirección de la reacción	Aumentando		
Unidades	g/L (µmol/L, mg/dL)		
Pipeteo de reactivo	Diluyente (H ₂ O)		
R1	100 µL	-	
R2	20 µL	-	
Volumenes de muestra	Muestra	Dilución de muestra	
		Muestra	Diluyente (NaCl)
Normal	11 µL	15 µL	150 µL
Disminuido	11 µL	5 µL	160 µL
Aumentado	11 µL	15 µL	150 µL

Definición del test para el analizador cobas c 501

Tipo de test	2 puntos finales		
Tiempo de reacción / Puntos de medición	10/10-36		
Longitud de onda (sub/princ)	700/340 nm		

Dirección de la reacción	Aumentando		
Unidades	g/L (µmol/L, mg/dL)		
Pipeteo de reactivo	Diluyente (H ₂ O)		
R1	100 µL	-	
R2	20 µL	-	
Volumenes de muestra	Muestra	Dilución de muestra	
		Muestra	Diluyente (NaCl)
Normal	11 µL	15 µL	150 µL
Disminuido	11 µL	5 µL	160 µL
Aumentado	11 µL	15 µL	150 µL

Definición del test para el analizador cobas c 502

Tipo de test	2 puntos finales		
Tiempo de reacción / Puntos de medición	10/10-36		
Longitud de onda (sub/princ)	700/340 nm		
Dirección de la reacción	Aumentando		
Unidades	g/L (µmol/L, mg/dL)		
Pipeteo de reactivo	Diluyente (H ₂ O)		
R1	100 µL	-	
R2	20 µL	-	
Volumenes de muestra	Muestra	Dilución de muestra	
		Muestra	Diluyente (NaCl)
Normal	11 µL	15 µL	150 µL
Disminuido	11 µL	5 µL	160 µL
Aumentado	11 µL	20 µL	90 µL

Calibración

Calibradores	S1: H ₂ O	
	S2-S6: C.f.a.s. PAC	
	Multiplicar el valor del calibrador C.f.a.s. PAC específico del lote por los factores indicados a continuación a fin de determinar las concentraciones estándar de la curva de calibración de 6 puntos.	
	S2: 0.600	S5: 3.20
	S3: 1.25	S6: 4.00
	S4: 2.10	
Modo de calibración	RCM2	
Intervalo de calibraciones	Calibración completa	
	• con cada lote de reactivos	
	• si fuera necesario según los procedimientos de control de calidad	

El intervalo de calibración puede ampliarse si el laboratorio asegura una verificación aceptable de la calibración.

Trazabilidad: el presente método ha sido estandarizado frente a la preparación de referencia BCR470/CRM470 (RPPHS - Preparación de referencia para proteínas en suero humano) del IRMM (Instituto para materiales y mediciones de referencia).⁵

Control de calidad

Efectuar el control de calidad con los controles indicados en la sección "Información de pedido".

0020794063220201010.0

CERU

Ceruloplasmin

Adicionalmente pueden emplearse otros controles apropiados.

Adaptar los intervalos y límites de control a los requisitos individuales del laboratorio. Los resultados obtenidos deben hallarse dentro de los límites definidos. Cada laboratorio debería establecer medidas correctivas a seguir en caso de obtener valores fuera del intervalo definido.

Cumplir con las regulaciones gubernamentales y las normas locales de control de calidad pertinentes.

Cálculo

Los analizadores Roche/Hitachi cobas c calculan automáticamente la concentración de analito de cada muestra.

Factores de conversión: $\text{mg/dL} \times 0.01 = \text{g/L}$ $\text{g/L} \times 7.46 = \mu\text{mol/L}$
 $\text{g/L} \times 100 = \text{mg/dL}$ $\text{mg/dL} \times 0.0746 = \mu\text{mol/L}$

Limitaciones del análisis - interferencias

Criterio: recuperación dentro de $\pm 10\%$ del valor inicial con una concentración de ceruloplasmina de 0.2 g/L (1.49 $\mu\text{mol/L}$, 20 mg/dL).

Ictericia:¹ sin interferencias significativas hasta un índice I de 60 para la bilirrubina conjugada y sin conjugar (concentración de la bilirrubina conjugada y sin conjugar: aproximadamente 1026 $\mu\text{mol/L}$ o 60 mg/dL).

Hemólisis:² sin interferencias significativas hasta un índice H de 1000 (concentración de hemoglobina: aproximadamente 621 $\mu\text{mol/L}$ o 1000 mg/dL).

Lipemia (Intralipid):³ sin interferencias significativas hasta el índice L de 200. No existe una correlación satisfactoria entre el índice L (que corresponde a la turbidez) y la concentración de triglicéridos.

Los factores reumatoideos hasta 100 UI/mL no interfieren en el test.

Efecto prozona (high-dose hook): no se obtienen resultados falsos con concentraciones de ceruloplasmina de hasta 5 g/L (37.3 $\mu\text{mol/L}$, 500 mg/dL).

Fármacos: no se han registrado interferencias con paneles de fármacos de uso común en concentraciones terapéuticas.^{4,5}

Excepción: el Intralipid proporciona resultados de ceruloplasmina falsamente aumentados.

En casos muy raros pueden obtenerse resultados falsos debidos a la gammapatía, particularmente del tipo IgM (macroglobulinemia de Waldenström).⁶

Para el diagnóstico, los resultados del test siempre deben interpretarse teniendo en cuenta la anamnesis del paciente, la exploración clínica así como los resultados de otros exámenes.

ACCIÓN REQUERIDA

Programación de lavado especial: en los sistemas Roche/Hitachi cobas c, ciertas combinaciones de test requieren de ciclos de lavado especial. La lista de las contaminaciones por posible arrastre también puede encontrarse en la versión más actual de la metodología NaOH-SMG-SmpCln1+2-S-GCCS. Para mayor información, consulte el manual del operador del analizador correspondiente. Analizador cobas c 502: todos los pasos de lavado necesarios para evitar la contaminación por posible arrastre están disponibles a través de cobas link de modo que no se requiere la entrada manual de los datos.

En caso de que sea necesario, implemente el lavado especial destinado a evitar la contaminación por posible arrastre antes de comunicar los resultados del test.

Límites e intervalos

Intervalo de medición

0.03-1.4 g/L (0.22-10.44 $\mu\text{mol/L}$, 3-140 mg/dL)

Determinar las muestras con concentraciones superiores a través de la función de repetición. La dilución de las muestras por la función de repetición es a 1:3. Los resultados de las muestras diluidas por la función de repetición se multiplican automáticamente por 3.

Límites inferiores de medición

Límite de detección inferior del test

0.03 g/L (0.22 $\mu\text{mol/L}$, 3 mg/dL)

El límite de detección inferior representa la menor concentración medible de analito que puede distinguirse de cero. Se calcula como el valor situado a 3 desviaciones estándar por encima del estándar más bajo (estándar 1 + 3 DE, repetibilidad, n = 21).

cobas[®]

Valores teóricos¹⁰

Hombres: 0.15-0.30 g/L

Mujeres: 0.16-0.45 g/L

Cada laboratorio debería comprobar si los intervalos de referencia pueden aplicarse a su grupo de pacientes y, en caso necesario, establecer sus propios valores.

Datos específicos de funcionamiento del test

A continuación, se indican los datos representativos de funcionamiento de los analizadores. Los resultados de cada laboratorio en particular pueden diferir de estos valores.

Precisión

La precisión se determinó empleando muestras humanas y controles según un protocolo interno con repetibilidad (n = 21) y precisión intermedia (3 síncuotas por serie, 1 serie por día, 21 días). Se obtuvieron los siguientes resultados:

Repetibilidad	Media	DE	CV
	g/L ($\mu\text{mol/L}$, mg/dL)	g/L ($\mu\text{mol/L}$, mg/dL)	%

Preciorm Protein 0.283 (2.11, 28.3) 0.004 (0.03, 0.4) 1.6

Precipath Protein 0.620 (4.62, 62.0) 0.007 (0.05, 0.7) 1.1

Suero humano 1 0.298 (2.23, 29.8) 0.003 (0.02, 0.25) 0.8

Suero humano 2 0.501 (3.74, 50.1) 0.004 (0.03, 0.4) 0.7

Suero humano 3 1.30 (9.70, 130) 0.009 (0.07, 0.9) 0.7

Precisión intermedia	Media	DE	CV
	g/L ($\mu\text{mol/L}$, mg/dL)	g/L ($\mu\text{mol/L}$, mg/dL)	%

Preciorm Protein 0.293 (2.19, 293) 0.004 (0.03, 0.4) 1.4

Precipath Protein 0.413 (3.08, 41.3) 0.004 (0.03, 0.4) 1.0

Suero humano 3 0.188 (1.40, 18.8) 0.005 (0.04, 0.5) 2.6

Suero humano 4 0.436 (3.25, 436) 0.007 (0.05, 0.7) 1.5

Comparación de métodos

Se han comparado los valores de ceruloplasmina en muestras de suero y plasma humanos obtenidos en un analizador Roche/Hitachi cobas c 501 (y) con los obtenidos con el reactivo correspondiente en un analizador Roche/Hitachi 917 (x).

Número de muestras (n) = 82

Passing/Bablok¹¹ $y = 0.980x + 0.012 \text{ g/L}$ $r = 0.934$
 Regresión lineal $y = 1.015x - 0.001 \text{ g/L}$ $r = 0.997$

Las concentraciones de las muestras se situaron entre 0.132 y 1.32 g/L (0.984-9.85 $\mu\text{mol/L}$, 13.2-132 mg/dL).

Referencias bibliográficas

- 1 Greiling H, Gressner AM, eds. Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3rd ed. Stuttgart/New York: Schattauer Verlag 1995:227-228.
- 2 Wolf PL. Ceruloplasmin: methods and clinical use. Crit Rev Clin Lab Sci 1982;17:229-245.
- 3 Sternlieb I. Copper and the liver. Gastroenterology 1980;78:1615-1628.
- 4 WHO Publication: Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations, WHO/DIL/LAB/99.1 Rev.2:Jan 2002.
- 5 Baudner S, Bienvenu J, Bilrup-Jensen S, et al. The certification of a matrix reference material for immunochemical measurement of 14 human serum proteins CRM470. Report EUR 15243 EN 1993:1-186.
- 6 Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry instrumentation. Clin Chem 1986;32:470-475.

ANEXO 3. Procedimiento determinación de actividad enzimática ceruloplasmina realizado en LCHSJD.

Laboratorio de Nefrología e Investigación Clínica Dr. Luis Gmo Brenes Sobrado. HSJD	Código SC4.3.5.PE04
Nombre Análisis de Ceruloplasmina	Página 2 de 2

Preparación de Reactivos :

- 1- Buffer Acetato pH = 5.0 : Pesar 1.36 g de Acetato de sodio.3H₂O + 0.26 ml Acido Acético Glacial csp de H₂O d y d para 100 ml.
Ajustar el pH a 5.0 con NaOH 0.1 mmol/l o con Acido acético.
- 2- Acido sulfúrico (9.0 mol/L) : Agregar a un volumen igual de agua el H₂SO₄ conc. (lentamente). (250 ml H₂SO₄ c. + 250 ml H₂O d y d).
- 3- O-dianisidina dihidrocloruro (9.46 mmol/L) : Disolver 300 mg en 100 ml de H₂O d y d. (O-dianisidina dihidrocloruro fast-blue se disuelve en HCl). Mantener en refrigeración en frasco ámbar. Estable 3 meses.
↓
ambiente.

Procedimiento :

- 1- Poner 0.75 ml de tampón acetato + 50 ul suero a dos tubos marcados: 5 (tubo#1) y 15 (tubo#2) minutos.
- 2- Incubar los dos tubos a 30 °C por 5 minutos.
- 3- Agregar 200 ul de O-dianisidina (pre -incubada a 30°C) a intervalos de 30 segundos.
- 4- A los 5 minutos exactos agregar 2 ml H₂SO₄ a los tubos #1.(A1) .
- 5- Mezclar bien.
- 6- A los 15 minutos exactos agregar 2 ml H₂SO₄ a los tubos #2 (A2).
- 7- Mezclar bien.
- 8- Leer las absorbancias a 540 nm contra H₂O (A 1 y A 2)
- 9- Realice los cálculos según la siguiente tabla

Cálculos :

$$(\text{Absorbancia 15 min (A2)} - \text{Absorb 5 min (A2)}) \times 625$$

Valores de referencia

55 - 150 U/L

- 10- Registre los datos obtenidos en el registro SC3.2.RA04
- 11- Registre los datos obtenidos en la boleta de análisis correspondiente
- 12- Pase la boleta para su respectivo reporte según SC4.4.-PR01.5