

# EL SISTEMA FERROXIDASA I EL METABOLISME DEL FERRO EN ALGUNS OCELLS I MAMÍFERS

Comunicació presentada el dia 24 de gener de 1974  
pel doctor

JOSEP PLANAS i MESTRES

Cap del Departament de Fisiologia Animal de la Facultat  
de Biologia de la Universitat de Barcelona

## INTRODUCCIÓ

L'estudi del metabolisme del ferro en els animals, concretament en ocells i mamífers, ha estat objecte de la nostra atenció fa molts anys<sup>21, 22, 23, 24, 25, 3, 13, 32</sup>.

El conjunt d'aquests treballs ens ha permès de remarcar la notable intensificació del metabolisme del ferro en els ocells quan ponen<sup>22</sup>, que ha estat posteriorment analitzat mitjançant estudis de ferrocínètica, que han permès de constatar l'augment del valor del *turnover* en totes les espècies considerades<sup>26, 3</sup>.

El coneixement més íntim dels mecanismes que intervenen en l'absorció, en el transport, en la mobilització i en la utilització del ferro dins l'organisme viu ha permès a E. FRIEDEN de postular que el procés fonamental que regeix el metabolisme del ferro és pròpiament el cicle d'oxidació del Fe (II) a Fe (III) en el plasma (fig. 1), per tal com és el que permet de constituir el complex transferrina-Fe (III), que és el sistema clau de tot el metabolisme del metall. En la reacció d'oxidació intervé un sistema de ferroxidases que és format en l'home per la ferroxidasa-I (ceruloplasmina) i la ferroxidasa-II<sup>36</sup>.

L'activitat ferroxidasa del plasma és deguda principalment a la ceruloplasmina, una cuproproteïna plasmàtica corresponent a  $\alpha_2$  — globulina, que constitueix la ferroxidasa-I, però, en general, el sistema ferroxidasa és format per compostos diferents en cada una de les espècies estudiades pel grup de FRIEDEN (home, *Rana catesbyana*, gall, *Thyonella*).

Els primers estudis de FRIEDEN i del seu grup a la Universitat de l'Estat de Florida de Tallahassee (Florida, EE. UU)<sup>18, 9, 19</sup>, assenyalen que l'acti-

vitat ferroxidasa de la ceruloplasmina ha de jugar un paper significatiu en el metabolisme del ferro. L'evidència experimental d'aquesta afirmació, proporcionada per CARTWRIGHT i collab. a la Universitat d'Utah<sup>30, 33, 14</sup> en el porc, demostra que la ceruloplasmina (ferroxidasa-I) és essencial per a la mobilització del ferro de les cèl·lules al plasma. La constitució cuproproteínica de la ferroxidasa-I ha permès també de descriure-la com a enllaç

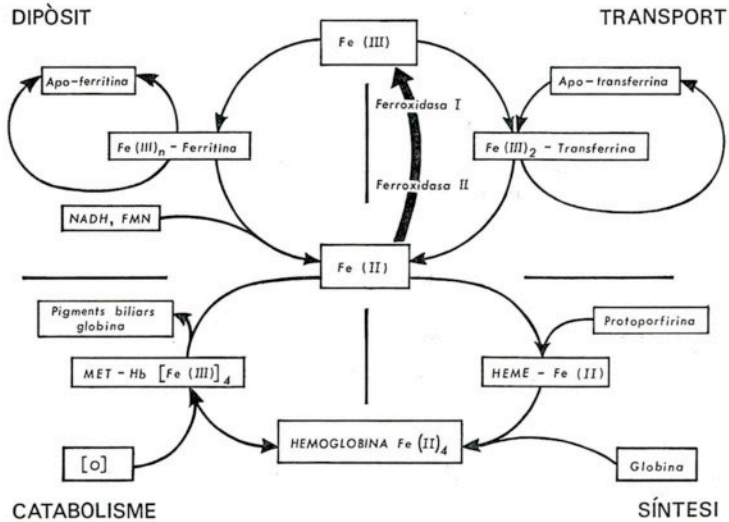


FIGURA 1

molecular entre el metabolisme del ferro i el del coure<sup>9</sup>, relació ja sospitada fa 45 anys.

Les anèmies per manca de coure troben una explicació amb la vinculació esmentada. La contradicció que pot representar la malaltia de Wilson (absència congènita de ceruloplasmina i normalitat en el metabolisme del ferro) és explicada per l'existència de la ferroxidasa-II en els pacients<sup>36</sup>.

Les correlacions entre nivells de coure i de ferro en el plasma de diferents espècies d'ocells i de mamífers ha estat posada en evidència per nosaltres<sup>25</sup>, i en els ocells hem pogut demostrar que els estrògens incrementen conjuntament els nivells plasmàtics d'ambdós metalls<sup>2, 28</sup>. Tanmateix, estats patològics aportats per la clínica humana mostren que els nivells plasmàtics dels metalls esmentats es comporten inversament. Hom observa igualment una correlació inversa entre els dipòsits hepàtics de ferro i de coure en rates alimentades amb dietes mancades d'aquests metalls<sup>34</sup>.

La descripció del sistema ferroxidasa del plasma i la vinculació que té amb el metabolisme del ferro ens suggerí la possibilitat de fer-ne un estudi en els ocells. L'exaltació del metabolisme del ferro durant el període de la posta que nosaltres havíem observat en els ocells<sup>22, 25, 26, 3</sup> ens podia proporcionar un excellent material d'estudi. El treball que nosaltres hem dut a terme a la Universitat de l'Estat de Florida en col·laboració amb el professor FRIEDEN permeté d'estudiar l'activitat ferroxidàsica, i de comparar-la a diversos paràmetres sanguinis (ferro plasmàtic, transferrina, hemoglobina i hematòcrit) en pollastres normals, en lots de pollastres deficients en coure i en exemplars tractats amb estrògens<sup>27</sup>. En un treball posterior, aquest portat a terme novament en el nostre Departament de Fisiologia Animal de la Universitat de Barcelona, ha estat completat l'estudi esmentat amb les anàlisis de gallines en posta i en no posta i comprovat que en l'estat fisiològic de la posta s'incrementa unes 20 vegades l'activitat ferroxidàsica del plasma, conseqüència de l'efecte de l'augment d'estrògens circulants<sup>28</sup>.

Ens ha semblat que l'extensió de l'estudi del sistema ferroxidasa a d'altres animals podria aportar una nova informació per a abordar l'estudi del metabolisme del ferro, el qual, per bé que presenta unes característiques comunes en tots els vertebrats, no presenta una resposta constant als estrògens. És per això que analitzem en el present treball l'activitat ferroxidàsica en alguns mamífers (rata, conill i cobai), comparada amb els valors obtinguts en els ocells.

#### MATERIAL I MÈTODES

Els animals d'experimentació han estat mantinguts a l'estabulari amb dietes comercials adequades, i les mostres de sang heparinitzada han estat obtingudes després d'un dejuni de dotze hores. En les gallines han estat extrets 3-5 ml de la vena de l'ala i en els conills de l'orella. En rates i en cobais hom obté mostres d'1,5-2 ml per punció cardíaca amb els animals anestesiats per pentabarbital (Narcovenol<sup>R</sup>).

El ferro plasmàtic ha estat determinat pel mètode de RAMSAY amb  $\alpha, \alpha'$ -dipiridil<sup>31</sup>.

El coure plasmàtic ha estat valorat per una tècnica també espectrofotomètrica.

L'activitat ferroxidàsica ha estat determinada en sèrum (gallina, conill) o bé en plasma fresc (rata i cobai) pel mètode específic de JOHNSON i *al.*<sup>11</sup> adaptat a un espectrofotòmetre Hitachi-Perkin Elmer, model 139, connectat a un registrador de la mateixa marca, model 56. La mescla de reacció és formada per 0,050 ml de sèrum de gallina (o 0,025 ml de plasma de rata,

o 0,010 ml de plasma de cobai o de sèrum de conill); 0,6 ml d'acetat sòdic 0,36 M (pH = 6) com a amortidor; 0,375 ml d'apo-transferrina 1 % (Boehringer); 0,45 ml de Fe (II) 400 mM. L'activitat ferroxidàsica és expressada en mM Fe (II) que són oxidats per minut i per mil·límetre de sèrum o plasma, a Fe (III).

Els estrògens utilitzats han estat: a) Dietilestilbestrol (Merck) <sup>(R)</sup> dissolt en 1,2-propanediol; b) Benzoat d'estradiol (Progynon B, Schering); c) Gonadotrofina sèrica de cavall (Anitex Leo).

### RESULTATS

Els valors d'activitat ferroxidàsica en les diferents espècies analitzades són indicats en el quadre I; hom hi compara lots d'animals d'ambdós sexes i d'edats properes per a cada espècie.

En general hom aprecia que el ferro sèric és superior en les femelles. Hom observa clarament una diferència sexual significativa en la rata i en el cobai (quadre I).

#### QUADRE I

*Valors de ferro sèric i d'activitat ferroxidasa en diferents espècies d'animals.  
Mitjana i desviació standard*

ESPÈCIES	Nombre	Ferro plasmàtic ( $\mu\text{g Fe}/100 \text{ ml}$ )	Activitat ferroxidasa ( $\mu\text{M Fe(II) min/ml}$ )
<i>Gallina</i>			
* Pollastres 2 mesos	6	115 $\pm$ 5	27 $\pm$ 5
Gallines 4 mesos	8	145 $\pm$ 31	76 $\pm$ 31
<i>Conill</i>			
Conills ♂	11	188 $\pm$ 49	573 $\pm$ 151
Conills ♀	10	211 $\pm$ 48	431 $\pm$ 168
<i>Rata</i>			
Rates ♂	22	140 $\pm$ 10	330 $\pm$ 11
Rates ♀	10	207 $\pm$ 23 a)	306 $\pm$ 14
<i>Cobais</i>			
** Mascles	21	184 $\pm$ 45	496 $\pm$ 107
Femelles	29	256 $\pm$ 67 b)	891 $\pm$ 228 b)
a) P < 0.01	b) P < 0.001		

\* La significació estadística no ha estat determinada per tal com ja és coneguda en exemplars madurs.<sup>28</sup>

\*\* Els lots (mascles i femelles) són de races i procedència diferents.

La comparació entre gallines i pollastres mostra que la diferència s'inicia ja clarament en els animals joves i s'accentua notablement amb la maduresa sexual.

L'activitat ferroxidàsica del plasma en aquests animals mostra la gran diferència que hi ha entre els ocells i els mamífers. En pollastres i gallines immaturs l'activitat ferroxidàsica és de 10 a 30 vegades inferior a la dels mamífers estudiats. La comparació entre les diferents espècies de mamífers mostra variacions específiques en les activitats ferroxidàsiques que es corresponen amb els respectius valors del ferro plasmàtic.

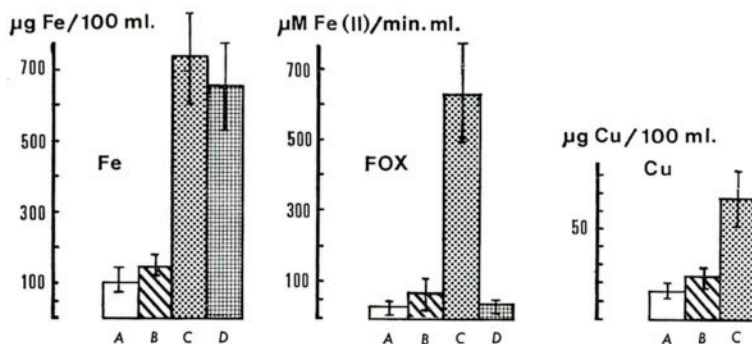


FIGURA 2

Els nivells d'activitat ferroxidàsica (quadre I) són alts en el conill i encara més en el cobai, i molt baixos en la gallina; la rata presenta uns valors que s'aproximen als de l'home. En aquests valors, en general, no hi són apreciades diferències sexuals, i, bé que és significativa en els cobais, cal fer notar que es tracta de lots d'exemplars de procedència i varietat diferents.

Hi ha una gran variabilitat en els valors de ferroxidasa dins cada espècie, que es reflecteix clarament en la quantia de les desviacions estàndard. Aquesta variabilitat pot ésser deguda a factors molt diversos, com és ara l'edat, la raça i el *stress* de manipulació de l'animal. La possible influència d'aquest darrer factor ha fet necessària l'anestèsia per a les mostres per punció cardíaca en rata i cobai.

L'efecte inhibitori de l'azida sòdica sobre l'activitat ferroxidàsica a una concentració final de 5 mM, ha estat observat en les gallines. Hom ha apreciat que la inhibició creix amb l'edat fins que assoleix valors del 60-80%. En els mamífers, per contra, la inhibició és en tots plegats de l'ordre del 93 al 100%.

L'increment del ferro plasmàtic en la maduresa sexual és molt evident

en les gallines, i va precedit per un augment molt acusat de l'activitat ferroxidàsica durant la posta, i també és seguit d'un increment significatiu del coure en el plasma (fig. 2). La relació coure/ceruloplasmina (ferroxidasa) és evident, i també el paral·lisme entre els increments d'ambdós metalls. Això ha pogut ésser evidenciat experimentalment mitjançant la injecció repetida de benzoat d'estradiol (3 mg diaris, durant 3 dies seguits).

D'altra banda, l'administració parenteral d'estrògens produeix un increment immediat del ferro plasmàtic i de l'activitat ferroxidàsica tant en pollastres com en gallines immatures.

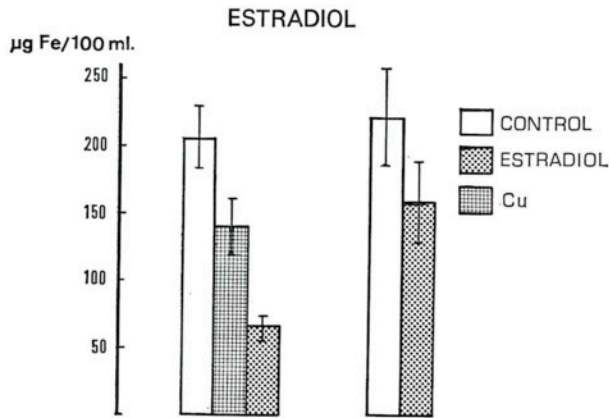


FIGURA 3

La resposta que provoca l'estrògen constitueix una mobilització de les reserves d'aquest metall. És, per això, variable, per tal com depen de l'estat de repleció o de depleció de tals reserves.

En el quadre II, hom pot apreciar l'efecte de l'administració d'estrògens (diètilstilbestrol i estradiol) en algunes espècies (gallina, cobai, rata i conill) per comparació dels valors basals amb els que han estat obtinguts després de dos dies de tractament.

És convenient d'observar que, amb l'excepció dels de rates, els lots d'animals no ofereixen uniformitat de raça. La discrepància hi és marcada especialment en els cobais, on els lots de mascles pertanyen a una raça diferent dels de femelles, tal com passa en els lots de pollastres, el detall dels quals és indicat al peu de la taula.

La injecció de gonadotrofines en conills (150 U/animal) durant 6 dies no ocasiona cap canvi significatiu en llurs nivells de ferroxidasa ni de ferro plasmàtic. La injecció de coure (3 injeccions intraperitoneals de 2 mg

cadascuna) augmenta significativament la ferroxidasa sense modificar el ferro.

L'efecte en l'administració de coure contrasta, però, amb l'efecte sinèrgic que presenta a l'acció hiposiderèmica de l'estrogen. Hom pot observar que l'administració per injecció de 2 dosis de 1000 mg de Cu en dies seguits, prèvia al tractament usual amb l'estrogen, ocasiona un descens del ferro plasmàtic, que és doble al que ha estat obtingut en conills sense aportació de coure (fig. 3).

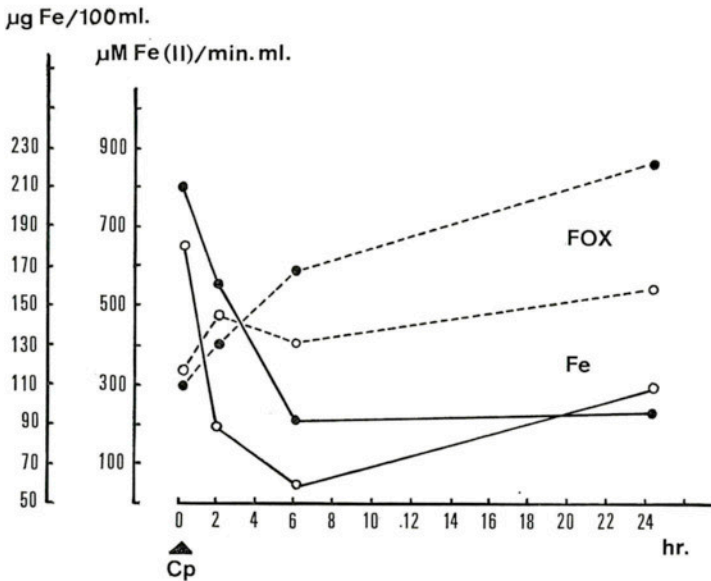


FIGURA 4

Hom ha injectat igualment per via endovenosa una dosi de ceruloplasmina humana Hubber a dues conills i, en mostres obtingudes a les 0, 1, 2, 6 i 24 hores, ha estat observat un descens del ferro plasmàtic, juntament amb un increment de l'activitat ferroxidàsica (fig. 4).

#### DISCUSSIÓ

La descripció de l'activitat ferroxidàsica en el pollastre i la relació que té amb el metabolisme del ferro ja fou posada en evidència durant la nostra estada a la Universitat de l'Estat de Florida<sup>27</sup>.

Allí fou comprovada igualment en animals sotmesos a una alimentació mancada de coure o bé que comportava antagonistes de la seva absorció com el Zn i l'Ag, la dependència de l'activitat ferroxidàsica respecte d'aquest metall, així com l'efecte que provoquen els estrògens en l'activitat esmentada i, per tant, en el ferro sèric. L'estudi en gallines, dut a terme al nostre retorn, permeté de confirmar aquests resultats en femelles en posta<sup>28</sup>. La comparació dels valors de ferro i de coure plasmàtic, i de l'activitat ferroxidàsica en gallines d'edats i d'estat sexual diferents mostra que, en condicions fisiològiques, els estrògens són responsables de l'increment dels tres valors esmentats, els quals es troben lligats entre ells per una relació de causa a efecte (augment previ del coure i la ferroxidasa, i mobilització subsegüent del ferro).

La claredat dels resultats obtinguts en l'espècie *Gallus domesticus* ens proporciona arguments per a poder generalitzar-los a d'altres espècies; i encara més si tenim en compte el paper primordial reconegut a la ceruloplasmina en la mobilització del ferro i l'acció estimuladora dels estrògens sobre la síntesi d'aquesta proteïna<sup>7</sup>.

Així i tot, l'estudi comparat en diferents mamífers ens mostra resultats que ofereixen diferències notables. Així, doncs, el fenomen més eloqüent, com és indicat en el quadre II, consisteix en el fet que els estrògens no es comporten uniformement sobre el ferro plasmàtic en les diferents espècies. Aquest fet ja havia estat citat en la bibliografia<sup>23, 12, 20, 15, 16</sup>. És per això que havíem cregut que l'estudi del sistema ferroxidàsic ens podria aportar algun aclariment que ens permetés d'explicar aquestes diferències.

El primer punt fonamental per a abordar el problema és, al nostre entendre, que l'activitat ferroxidàsica (i amb ella la mobilització del ferro dels dipòsits) pot ésser produïda per diferents substàncies i no pas solament per la ceruloplasmina. TOPHAM i FRIEDEN<sup>36</sup> identifiquen en el sèrum humà una altra ferroxidasa (ferroxidasa II), d'un contingut baix en coure i diferent de la ceruloplasmina (ferroxidasa I), les proporcions de la qual són diferents segons els individus fins al punt que, en la malaltia de Wilson, és l'únic constituent del sistema ferroxidasa; però, això sí, es mostra suficient per a la mobilització de ferro per tal com l'esmentada malaltia no va associada a cap alteració del metabolisme d'aquest metall. La sensibilitat de la ferroxidasa I a l'acció inhibidora de l'azida sòdica i l'absència d'efecte sobre d'altres ferroxidasas ha demostrat que també el sistema ferroxidasa és complex en *Rana Catesbyana* (TRIPP, dades no publicades), en el pollastre<sup>27</sup> i en l'holotúria *Thyonella* (SEXTON; dades no publicades).

L'heterogeneïtat del sistema ferroxidasa entre les espècies pot ésser relacionada també amb la forma particular de respondre cada espècie a



QUADRE II

Efecte de la injecció d'estrògens (dietilestilbestrol —DES—, benzoat d'estradiol —BE—) sobre el ferro plasmàtic i sobre l'activitat ferroxidasa del plasma. Mitjana i desviació standard

ESPÈCIES	Nombre	VALORS BASALS		Estrògen	DESPRÉS DEL TRACTAMENT AMB ESTRÒGENS	
		Fe (g Fe/100 ml)	Fox ( $\mu$ M Fe (II) min/ml)		Fe ( $\mu$ g Fe/100 ml)	Fox ( $\mu$ M Fe (II) min/ml)
<i>Gallina</i>						
Femelles	6	117 $\pm$ 40	25 $\pm$ 5	1 DES 2 mg/kg	227 $\pm$ 80 b)	47 $\pm$ 8 c)
Masclles	12	115 $\pm$ 22	28 $\pm$ 6	2 DES 2 mg/kg	445 $\pm$ 100 d)	60 $\pm$ 28 b)
* Masclles	9	139 $\pm$ 25	73 $\pm$ 22	2 BE 1 mg/kg	598 $\pm$ 180 d)	99 $\pm$ 7 a)
<i>Conill</i>						
Masclles	4	242 $\pm$ 48	668 $\pm$ 113	2 DES 4 mg/kg	166 $\pm$ 15 a)	624 $\pm$ 100
Femelles	4	196 $\pm$ 21	515 $\pm$ 113	2 DES 4 mg/kg	138 $\pm$ 28 a)	708 $\pm$ 76
Masclles	4	185 $\pm$ 29	426 $\pm$ 85	2 BE 2 mg/kg	125 $\pm$ 25 a)	525 $\pm$ 80
Femelles	4	231 $\pm$ 48	455 $\pm$ 126	2 BE 2 mg/kg	160 $\pm$ 38 a)	605 $\pm$ 107
<i>Rata</i>						
Masclles	4	177 $\pm$ 14	347 $\pm$ 13	2 DES 4 mg/kg	130 $\pm$ 26	224 $\pm$ 11 d)
Femelles	4	223 $\pm$ 43	327 $\pm$ 15	2 DES 4 mg/kg	127 $\pm$ 13 a)	206 $\pm$ 11 d)
Masclles	5	194 $\pm$ 26	360 $\pm$ 22	2 BE 2 mg/kg	250 $\pm$ 19 a)	371 $\pm$ 27
Femelles	7	233 $\pm$ 18	300 $\pm$ 27	2 BE 2 mg/kg	334 $\pm$ 29 d)	330 $\pm$ 18
<i>Cobai</i>						
Femelles	4	231 $\pm$ 20	862 $\pm$ 144	2 DES 4 mg/kg	191 $\pm$ 44 d)	1,093 $\pm$ 238
Femelles	6			2 DES 4 mg/kg	211 $\pm$ 30	1,424 $\pm$ 243
Femelles	4	285 $\pm$ 20	1,037 $\pm$ 122	2 BE 2 mg/kg	160 $\pm$ 18 d)	1,502 $\pm$ 1000 b)

\* Lot constituït per pollastres de més d'un any d'edat i de més de 2,5 kg de pes.

l'administració dels estrògens pel que fa a l'activitat ferroxidàsica del plasma. És evident que els estrògens produeixen una elevació del coure plasmàtic i de la ceruloplasmina en l'home i en la rata, els quals es troben igualment augmentats durant l'embaràs o bé per efecte de l'ús de contraceptius orals; una col·lecció de cites pot ésser obtinguda de la revisió recent d'EVANS<sup>7</sup>. El mecanisme d'aquest efecte consisteix en la inducció pels estrògens d'una síntesi *de novo* de ceruloplasmina, tal com ha estat demostrat en la rata<sup>6</sup> en actuar a nivell de la transcripció de l'ADN. Uns altres autors<sup>17</sup>, valent-se de rates mascles, troben el mateix efecte mitjançant dosis de 50 mg de benzoat d'estradiol (injecció diària durant 7 dies); mitjançant dosis iguals de 17  $\beta$ -estradiol durant 16 dies, SUNDERMAN i col·laboradors<sup>35</sup> troben la mateixa resposta tant en mascles com en femelles.

La influència dels estrògens sobre el coure i la ceruloplasmina és, doncs, evident en la rata i en l'home. Tanmateix, si ens ho mirem bé, els estrògens no són necessaris per a regular l'homeòstasi del coure, i per això no hi ha diferències sexuals en els nivells de ceruloplasmina en sang o de coure hepàtic<sup>8</sup>.

D'altra banda, després dels treballs de RAGAN i col·lab.<sup>30</sup> i ROESER i col·lab.<sup>33</sup> en el porc, ha restat establert el paper de la ceruloplasmina en el metabolisme del ferro. En fetge perfós del mateix animal i en gos, OSAKI i col·lab.<sup>19</sup>, han demostrat la sensibilitat de la reacció, fins al punt que la velocitat d'alliberament del ferro és ja màxima a concentracions de 0,2  $\mu$ M de ferroxidasa.

Hom considera<sup>8</sup> que la funció primària de la ceruloplasmina és la mobilització del ferro, i que secundàriament actua com a mitjà de transport o de dipòsit circulant de coure.

Així, l'administració de coure (0,1 mg Cu/kg) en porcs deficients en coure<sup>14</sup> o bé en rates<sup>6</sup> estimula la formació de ceruloplasmina, i, per tant, provoca un increment de ferro plasmàtic.

La ceruloplasmina (ferroxidasa I) és, doncs, considerada l'enllaç molecular entre el metabolisme del ferro i del coure<sup>9,7</sup>.

Tanmateix, el paper assignat a la ceruloplasmina en el metabolisme del ferro i l'efecte dels estrògens sobre la ceruloplasmina contrasten amb l'absència d'uniformitat de l'acció de les hormones sexuals sobre aquell metabolisme.

KALDOR<sup>12</sup>, en la rata, assenyala que les femelles presenten uns valors de ferro plasmàtic significativament superiors als dels mascles i com la castració els fa disminuir i tendeix a fer-los igualar amb els dels mascles.

MEDURI i PETRONIO<sup>16</sup> constaten igualment el mateix fenomen de la castració en les femelles i observen que la hipofisectomia provoca un descens marcat del Fe plasmàtic en ambdós sexes; d'altra banda, la injecció de dietilestilbestrol fa disminuir el ferro plasmàtic.

Aquestes dades concorden amb les que han estat trobades per nosaltres, atès que també trobem una significativa diferència sexual a favor de les femelles (quadre I). Igualment l'efecte del DES provoca també en les nostres experiències una minva de la siderèmia, acompanyada del descens en l'activitat ferroxidàsica i, per tant, ambdós descensos són significatius (quadre II). Per contra, nosaltres hem observat que el benzoat d'estradiol incrementa significativament el ferro plasmàtic amb augment de l'activitat ferroxidasa, però que no és significatiu. Aquesta observació explicaria la diferència sexual evident a favor de les femelles per acció estrogènica, cosa que també coincideix amb el descens del ferro plasmàtic que observen MEDURI i PETRONIO<sup>16</sup> en la rata femella hipofisectomitzada. D'altra banda, també nosaltres hem pogut apreciar que l'administració de gonadotrofina (quadre IV) incrementa significativament el ferro plasmàtic i la ferroxidasa.

En el conill, l'acció dels estrògens sobre el ferro produeix una minva significativa tant en les femelles com en els mascles<sup>15, 20</sup>.

Tot això ha pogut ésser constatat novament per nosaltres, tant mitjançant l'administració de DES com la d'estradiol (quadre II). Aquesta minva del ferro plasmàtic sembla que pugui ésser explicada per l'increment del ferro hepàtic que produeixen, i el cas és que en les femelles llur contingut és sempre superior, així com minva com a conseqüència de l'ovariectomia<sup>29</sup>.

L'activitat ferroxidasa en el conill s'incrementa per acció dels estrògens, però l'augment no és significatiu (quadre II) i no es presenten tampoc diferències sexuals (quadre I). La valoració de la ceruloplasmina per la seva activitat p-fenil-endiamina-oxidasa ha permès a ALIAS<sup>1</sup> de mostrar que el dipropionat d'estradiol (10 injeccions de 2,5 mg en el conill) no provoca cap canvi; això no obstant, l'administració de DES (5 mg/conill/dia; 3 injeccions per setmana durant una quinzena) incrementa la ceruloplasmina en un 150 %.

L'administració de coure en el conill ocasiona un increment significatiu de la ferroxidasa per damunt de dosis de 100 mg Cu per animal, però sense que s'hi noti modificació del ferro plasmàtic (quadre III). L'efecte de la gonadotrofina no és, però, conclusiu; en algun exemplar ha provocat un increment molt notable de l'activitat ferroxidasa, però en d'altres, per contra, no ha mostrat variació; el ferro plasmàtic no s'ha modificat, però és curiós d'assenyalar que la siderèmia minvà considerablement en els dos exemplars que mostraren una resposta positiva a l'hormona pel que fa a la ferroxidasa.

L'acció hiposiderèmica dels estrògens en el conill, amb augment de l'activitat ferroxidàsica, troba nova concordança amb l'efecte de la injecció de ceruloplasmina humana (0,028 mM) en aquest animal (fig. 4). Aquest

QUADRE III

*Efectes de la injecció intraperitoneal de coure sobre el ferro i sobre l'activitat ferroxidasa del plasma.  
Valors mitjans i desviació standard*

ESPÈCIES	Nombre	Fe (g Fe/100 ml)	Fox ( $\mu$ M Fe (II) min/ml)	Dosis Cu	Fe (g Fe/100 ml)	Fox ( $\mu$ M Fe (II) min/ml)
<i>Pollastre</i>	4	117 $\pm$ 10	36 $\pm$ 16	400 (1)	156 $\pm$ 44 a)	100 $\pm$ 28 a)
<i>Rata</i>						
Mascles	6	80 $\pm$ 20	220 $\pm$ 48	500 (4)	157 $\pm$ 21 c)	260 $\pm$ 91
<i>Conill</i>						
Femelles	3	220 $\pm$ 20	350 $\pm$ 60	2000 (4)	235 $\pm$ 42	815 $\pm$ 65 b)
Femelles	4	141 $\pm$ 96	258 $\pm$ 53	250 (3)	192 $\pm$ 41	480 $\pm$ 96 c)
Femelles	4	131 $\pm$ 72	300 $\pm$ 56	25 (3)	132 $\pm$ 52	332 $\pm$ 73
<i>Cobais</i>						
Femelles	6	250 $\pm$ 41	743 $\pm$ 158	500 (3)	310 $\pm$ 78	1.680 $\pm$ 127 d)
Femelles	5	282 $\pm$ 23	766 $\pm$ 115	150 (3)	277 $\pm$ 18	626 $\pm$ 91

a) P < 0,05

c) P < 0,01

b) P < 0,02

d) P < 0,001

*Dosis:* El nombre de dosis injectades és expressat per les xifres entre parèntesis; la mostra de sang després de l'administració de coure ha estat presa 24 hores després de l'última dosi.

resultat, bé que contradiu la reconeguda funció d'aquesta cuproproteïna, és tanmateix conseqüent amb els resultats trobats, en aquest animal, per nosaltres.

Cal assenyalar que BRITTIN i CHEE<sup>4</sup> no aprecien en la rata cap resposta a la injecció endovenosa de ceruloplasmina humana, la qual cosa podria suggerir una certa especificitat.

Pel que fa al cobai, no tenim dades de referència en la bibliografia sobre aquesta qüestió, i els nostres resultats sobre el ferro plasmàtic i l'activitat ferroxidasa presenten valors més alts que en els conills i mostren una diferenciació sexual a favor de les femelles (quadre I). L'efecte dels estrògens (DES i estradiol) provoca un descens significatiu en el ferro plasmàtic amb l'increment de l'activitat ferroxidàsica que ha estat estadísticament significatiu enfront de l'estradiol (quadre II). Aquest resultat contrasta amb la diferència sexual que hom troba en aquesta espècie, i és que ara com ara no podem aportar cap explicació vàlida a aquest fet si no és la ja indicada heterogeneïtat dels lots. L'administració intraperitoneal de coure (quadre III) augmenta notòriament l'activitat ferroxidàsica. El ferro plasmàtic, per contra, no presenta modificació significativa. L'administració de gonadotrofines en el cobai femella (quadre IV) provoca una minva significativa del ferro plasmàtic i un increment no significatiu en la ferroxidasa.

La resposta als estrògens en el pollastre i en la gallina ha estat posat en evidència en estudis anteriors<sup>27, 28</sup>, i també la dependència del sistema

## QUADRE IV

*Efecte de la injecció repetida de gonadotrofina sobre ferro i sobre l'activitat ferroxidasa del plasma en diverses espècies. Valors mitjans i desviació standard*

ESPÈCIES	Nombre	TRACTAMENT AMB GONADOTROFINA			
		Fe (g Fe/100 ml)	Fox [ $\mu$ M Fe(II) min/ml]	Fe (g Fe/100 ml)	Fox [ $\mu$ M Fe(II) min/ml]
Gallina	8	124 $\pm$ 21	29 $\pm$ 13	170 $\pm$ 30 b)	54 $\pm$ 19 a)
Conill	4	287 $\pm$ 10	385 $\pm$ 7	120 $\pm$ 20 b)	625 $\pm$ 78 a)
Rata	6	214 $\pm$ 32	263 $\pm$ 53	298 $\pm$ 46 a)	318 $\pm$ 55
Cobai	6	283 $\pm$ 19	789 $\pm$ 107	215 $\pm$ 53 a)	870 $\pm$ 270

a)  $P < 0.05$

b)  $P < 0.02$

Dosis: Gallina : 30 U.I./animal/dia, durant 6 dies.  
 Conill : 150 U.I./animal/dia, durant 5 dies.  
 Rata : 100 U.I./animal/dia, durant 7 dies.  
 Cobai : 75 U.I./animal/dia, durant 6 dies.

ferroxidàsic respecte al contingut en coure de la dieta; l'esmentada activitat ferroxidasa resta anul·lada en règims deficients en coure. Aquesta espècie presenta una resposta positiva no pas solament a l'administració d'estrògens sinó també a la de coure i a la injecció repetida de gonadotrofina (quadres II, III, IV).

El sistema ferroxidasa en la gallina ja es mostrà complex per les variacions a la sensibilitat a l'azida sòdica segons l'edat i l'estat sexual<sup>27</sup>. D'altra banda la presència en el plasma dels ocells de la fosvitina (fosfoproteïna) i la seva vinculació amb la secreció d'estrògens per l'ovari presenta un interès especial, per tal com la proteïna esmentada és capaç d'oxidar el Fe (II). La presència d'un nou element de tipus ferroxidasa, però mancat de coure, concorda amb experiments nostres pendents de publicació, sobre l'administració repetida de penicil·lamida-D a pollets en els quals la injecció amb estrògens incrementa, com és general, el valor de la siderèmia, però no ocasiona augment de Cu-ferroxidasa.

#### BIBLIOGRAFIA

1. ALIAS, A. G. — *Effect of Progesterone, estradiol and stilbestrol on serum ceruloplasmin in rabbits*. «Indian J. Exp. Biol.», 9, 387-388 (1971).
2. BALASCH, J., BRASO, A. i PLANAS, J. — *Avance sobre la correlació del metabolisme Fe-Cu en algunes espècies animals*. «XII Reun. Nac. Soc. Españ. Cien. Fisiol., Santiago de Compostela», 353-355. Juliol 1970.
3. BALASCH, J. i PLANAS, J. — *Iron metabolism in duck and turkey*. «Rev. Esp. Fisiol.», 28, 125-128 (1972).
4. BRITTIN, G. M. i CHEE, Q. T. — *Relation of ferroxidase (ceruloplasmin) to iron absorption*. «J. Lab. Clin. Med.», 74, 53-59 (1969).
5. EVANS, B. W., MAJORS, P. F. i CORNATZER, W. E. — *Induction of ceruloplasmin synthesis by copper*. «Biochem. Biophys. Res. Commun.», 41, 1120-1125 (1970).
6. EVANS, G. W., CORNATZER, N. F. i CORNATZER, W. E. — *Mechanism for hormone-induced alterations in serum ceruloplasmin*. «Am. J. Physiol.», 218, 613-615 (1970).
7. EVANS, G. W. — *Copper homeostasis in the mammalian system*. «Physiol. Rev.», 53, 535-570 (1973).
8. EVANS, G. W. — *The biological regulation of copper homeostasis in rat*. «World Rev. Nutrition and Dietetics», 17, 225-249 (1973).
9. FRIEDEN, E. — *Ceruloplasmin, a link between copper and iron metabolism*. «Advan. Chem. Ser.», 100, 292-321 (1971).
10. FRIEDEN, E. — *The ferrous to ferric cycles in iron metabolism*. «Nutr. Rev.», 31, 41-44 (1973).
11. JOHNSON, D. A., OSAKI, S. i FRIEDEN, E. — *A micromethod for the determination of ferroxidase (ceruloplasmin) in humans serums*. «J. Clin. Chem.», 13, 142-150 (1967).
12. KALDOR, I. — *Studies on intermediary iron, metabolism. Haemoglobin value, serum iron and iron binding capacity in normal and castrated rats*. «Austral. J. Exp. Biol. and Med. Sci.», 32, 437-440 (1954).
13. LATORRE, J. L., RECIO, J. M. i PLANAS, J. — *Plasma iron and copper in laying hens*. «Rev. Esp. Fisiol.», 28, 65-68 (1972).

14. LEE, G. R., CARTWRIGHT, G. E. i WINTROBE, M. M. — *Heme biosynthesis in copper deficient swine*. «Proc. Soc. Expl. Biol. Med.», 127, 977-981 (1968).
15. LEDERER, J. i PRINZIE, A. — *Endocrine control of iron metabolism. XIV. Effect of cortisone and sex hormones on iron in blood of rabbits of both sexes*. «Boll. Atti. Soc. Ital. Endocrinol.», 10, 45-58 (1962).
16. MEDURI, D. i PETRONIO, L. — *Gonadi e ricambio marziale*. «Haematologica», 42, 911-1010 (1957).
17. MEYER, B. J., MEYER, A. C. i HORTWITT, M. K. — *Factors influencing serum copper and ceruloplasmin oxidase activity in the rat*. «Am. J. Physiol.», 194, 581-584 (1958).
18. OSAKI, S., JOHNSON, D. A. i FRIEDEN, E. — *The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum*. «J. Biol. Chem.», 241, 2746-2751 (1966).
19. OSAKI, S., JOHNSON, D. A. i FRIEDEN, E. — *The mobilization of iron from the perfused mammalian liver by serum copper enzyme, ferroxidase I*. «J. Biol. Chem.», 246, 3018-3023 (1971).
20. PALMER, H. — *The influence of sex hormones on plasma iron*. «Scand. J. Clin. and Lab. Invest.», 4, 81 (1952).
21. PLANAS, J. i CASTRO, S. — *Serum iron and total iron binding capacity in certain mammals*. «Nature», 187, 1126-1127 (1960).
22. PLANAS, J., CASTRO, S. i RECIO, J. M. — *Serum iron and its transport*. «Nature», 189, 668-669 (1961).
23. PLANAS, J. — *Serum iron in normal and castrated mammals*. «Nature», 197, 186-187 (1963).
24. PLANAS, J. — *Serum iron transport in the fowl and the mammals*. «Nature», 215, 287-290 (1967).
25. PLANAS, J. i BALASCH, J. — *Correlation between serum iron and copper in different animals*. «Rev. Esp. Fisiol.», 26, 91-94 (1970).
26. PLANAS, J. i BALASCH, J. — *Blood iron metabolism in fowl and rabbit*. «Rev. Esp. Fisiol.», 26, 307-314 (1970).
27. PLANAS, J. i FRIEDEN, E. — *Serum iron and ferroxidase activity in normal, copper-deficient, and estrogenized roosters*. «Am. J. Physiol.», 225, 423-428 (1973).
28. PLANAS, J. — *The ferroxidase activity and the iron mobilization by estrogens*. «Rev. Esp. Fisiol.», 29, 293-300 (1973).
29. PRINZIE, A. i LEDERER, J. — *Contrôle endocrinien du métabolisme du fer. — X. Action des hormones sexuelles sur la teneur en fer hépatique chez le lapin des deux sexes*. «Ann. Endocrinol.», 21, 306-313 (1960).
30. RAGAN, H. A., NACHT, S., LEE, G. R., BISHOP, C. R. i CARTWRIGHT, G. E. — *Effect of ceruloplasmin on plasma iron in copper-deficient swine*. «Am. J. Physiol.», 217, 1320-1323 (1969).
31. RAMSAY, W. N. M. — *The determination of iron in blood, plasma or serum*. «Clin. Chim. Acta», 2, 214-220 (1957).
32. RECIO, J. M., LATORRE, J. L. i PLANAS, J. — *Plasma iron turnover and egg production in hens*. «Rev. Esp. Fisiol.», 29, 65-68 (1973).
33. ROESER, H. P., LEE, G. R., NACHT, S. i CARTWRIGHT, G. E. — *The role of ceruloplasmin in iron metabolism*. «J. Clin. Invest.», 49, 2408-2417 (1970).
34. SOURKES, T. L., LLOYD, K. i BIRNBAUM, H. — *Inverse relationship of hepatic copper and iron concentration in rat fed deficient diets*. «Can. J. Biochem.», 46, 267-271 (1968).
35. SUNDERMAN, F. W., NOMOTO, S., GILLIES, C. G. i GOLDBLATT, P. J. — *Effect of estrogen administration and copper concentration in rat serum*. «Toxicol. Appl. Pharmacol.», 20, 588-598 (1971).
36. TOPHAM, R. W. i FRIEDEN, E. — *Identification and purification of a non-ceruloplasmin ferroxidase of human serum*. «J. Biol. Chem.», 245, 6398-6405 (1970).