

Determinación de Ornitin Carbamil Transferasa en Tejidos Normales y en Hepatitis Tóxica por Tetracloruro de Carbono

DRES. G. JIMÉNEZ; G. MIRANDA; L. SOLANO S. Y R. GUTIÉRREZ S.*

Es un aforismo bien conocido de todos los que laboran en los campos clínicos y de investigación, que no existe ninguna prueba de Laboratorio que permita evaluar con certeza la actividad funcional del hígado en salud o en enfermedad. La búsqueda de este tipo de prueba ha sido, por años, afán de investigación, cuyo fruto nos permite contar hoy día con una serie grande de pruebas que en forma más o menos específica complementan el estudio clínico de los pacientes con hepatopatías, permitiendo afinar el diagnóstico hasta grados nunca antes alcanzados, pero careciendo siempre de la certeza para proporcionarnos datos tales como total de masa hepática funcionante, índole y extensión de la lesión que sufre, la fase de la enfermedad, los cambios en la distribución del riego sanguíneo hepático, su capacidad regenerativa, etc.

De acuerdo con los trabajos de Reichard, la determinación de la actividad de la ornitín carbamil transferasa (OCT) se ha mostrado valiosa en el diagnóstico de las enfermedades hepáticas. Igualmente este autor (1) trabajando especialmente en perros, ha determinado los contenidos normales de dicha enzima en diferentes tejidos sanos (2), con lo cual evidenció la mayor concentración de la enzima en el tejido hepático en comparación con la concentración en otros órganos de la economía. Debido a ello, puede esperarse que la determinación de la OCT sérica, constituya una prueba de alta especificidad para demostrar alteraciones de la función hepática, en forma especial la necrosis de las células, cuando se realiza su determinación en el suero (2-3-6).

Con estas ideas en mente, el propósito del presente trabajo ha sido evaluar en forma experimental, la actividad de la ornitín carbamil transferasa (OCT) en tejidos diversos de ratas adultas sanas, así como el comportamiento de la misma enzima bajo los efectos de la intoxicación experimental por tetracloruro de carbono, en su forma intratisular y en su nivel en el suero sanguíneo.

La ornitín carbamil transferasa (OCT), también llamada Ornitín Transcarbamilasa, es una enzima que interviene en el ciclo de formación de la urea, descrito por Krebs y Henseleit, el cual incluye la formación intermedia de ornitina, citrulina y arginina, catalizando la reacción reversible ornitina a citrulina.

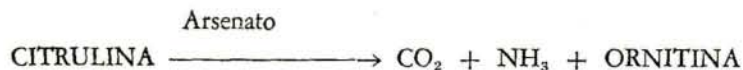
En la formación enzimática de la citrulina se ha descrito una transferencia de un grupo carbamil "activado" al grupo amino de la ornitina y se le ha identificado como el carbamil fosfato.

* H. C. C. S. S.

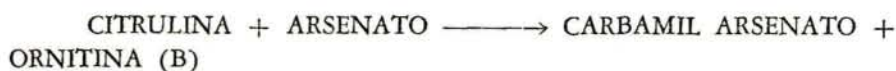
La citrulina se forma según la siguiente reacción:



La enzima que cataliza esta reacción (OCT) ha sido purificada del hígado de rata por Reichard y es la misma enzima descrita por Krebs con el nombre de citrulina fosforilada.



La reacción anterior ocurre en dos etapas:



El carbamil arsenato es un compuesto muy inestable y sin participación enzimática se transforma en la siguiente forma:



La reacción B. es la inversa de la reacción A., en la cual el fosfato es sustituido por arsenato y se cataliza por la OCT.

La actividad de OCT puede ser medida por la formación de $\text{CO}_2 + \text{NH}_3$ durante la arsenolisis de la citrulina, por lo que existen dos métodos para su determinación:

- a. Utilizando citrulina marcada con C^{14} y midiendo la cantidad que se forma con CO_2 radioactivo.
- b. Valorando la cantidad de NH_3 producido a partir del DL CITRULINA, utilizando una técnica de microdifusión.

Ambas técnicas se han considerado de igual sensibilidad.

MATERIAL Y METODO

Se hicieron dos grupos de ratas blancas, machos adultos, del tipo Wistar, con un promedio de peso de 317 gms, que se aislaron en cajas metálicas individuales y que recibieron dieta balanceada (Purina Rat Chow) y agua ad lib.

GRUPO — A

Constituido por 25 ratas que fueron sacrificadas en masa. Se obtuvieron dos muestras de cada uno de los siguientes órganos: hígados, intestino delgado, pulmón, corazón, riñón y cerebro. Además, se obtuvo suero sanguíneo por punción intracardíaca directa, previa al sacrificio del animal.

GRUPO — B

Constituido por 22 ratas a las cuales se les administró tetracloruro de carbono a la dosis de 500 mgms, por kilo de peso, por vía intraperitoneal, dosis previamente valorada como consistentemente productora de lesión tisular (4). De este grupo se sacrificaron dos ratas cada día, posteriores al día en que se provocó la injuria experimental, obteniéndose dos muestras de cada uno de los tejidos mencionados y sangre mediante punción cardíaca, previa al sacrificio.

Los tejidos así obtenidos, fueron de inmediato puestos en congelación (temperatura menor de 4°C) y homogenizados bajo la técnica descrita por Bengmark (5).

La titulación de la actividad enzimática se realizó en el sobrenadante del centrifugado de los homogenizados, mediante la técnica de microdifusión de NH_3 .

Se utilizó la técnica de microdifusión de NH_3 . Se le agregó a 1 ml. de substrato conteniendo 200 micromoles de DL-CITRULINA y 500 micromoles de buffer arsenato sodio a pH.7.5, 1 ml. de suero u homogenizado del órgano en estudio y se incubó durante 24 horas a 37°C. Las suspensiones de intestino e hígado se diluyeron 1:10.

Pasado el período de incubación se agregó ácido perclórico (0.2 ml. 4N) y se centrifugó para separar el precipitado 1 ml. del sobrenadante se transfirió a la cámara externa de una cápsula de microdifusión de Conway; en la cámara interna se colocó 1.5. ml. de HCL. 0.01 N. Sobre el sobrenadante de la cámara externa se agregó 3 ml. de buffer el borato de potasio (12.3 gms. H_3BO_3 + 80 ml. de KOH 4 N + agua dest. csp. 500 ml.) y se incubó durante 21/2 horas a 37°C., determinándose la cantidad de amonio de la cámara interna por nesslerización.

Se utilizó un blanco de buffer arsenato de sodio, sin citrulina, que se trató exactamente en la misma forma descrita anteriormente para cada muestra.

La cantidad de amonio formada en el blanco fue restada del amonio formada en la incubación conteniendo citrulina. Esta diferencia mide la actividad de OCT y sus resultados se expresan en micromoles de amonio formado a partir de citrulina por cada 1 gm. o 1 ml. del órgano o suero sanguíneo, respectivamente. Se utilizó un standar de sulfato de amonio neutro.

RESULTADOS

El contenido de ornitín carbamil transferasa en los tejidos normales de muestra en la gráfica N° 1.

En la Gráfica N° 2 que muestra el contenido de OCT en pulmón normal e intoxicado se puede observar que existe un descenso apreciable de la concentración enzimática al sétimo día posterior a la intoxicación, recuperando sus niveles normales al octavo día.

Las Gráficas N° 3, 5 y 6, no muestran alteración de OCT en el contenido intratisular, ya que en ningún momento los niveles descienden bajo el nivel mínimo normal.

El comportamiento de los niveles enzimáticos en corazón (Gráfica N° 4), permite observar un descenso de pequeña magnitud al segundo día posterior a la inyección con recuperación completa 96 horas después de la inyección de tetracloruro de carbono.

Los contenidos intratisulares de la OCT en hígado (Gráfica N° 7) nos muestra niveles de actividad que se mantienen dentro de lo normal durante los dos primeros días, para iniciar luego un descenso progresivo que llega a su sima al quinto día posterior a la intoxicación, después en forma gradual recupera la concentración normal al octavo día.

El análisis de la Gráfica N° 8 nos muestra los siguientes puntos de interés:

- 1.—Contenido de ornitín carbamil transferasa en el suero normal, con una fluctuación de 0.10 micromoles por $\frac{1}{2}$ cc. a un máximo 0.40 micromoles por $\frac{1}{2}$ cc. de suero sanguíneo.

Una vez provocada la intoxicación se observa un ascenso violento desde las primeras 24 horas, ascenso que se hace progresivo alcanzando su máximo a las 48 horas posteriores a la intoxicación por tetracloruro de carbono, iniciándose luego un descenso progresivo que lleva a límites de normalidad al sexto día posterior a la intoxicación.

COMENTARIO Y CONCLUSIONES

Según los trabajos de Reichard, la OCT es una enzima que alcanza las mayores concentraciones dentro de la célula hepática, en proporciones tales que resultan de alta especificidad, para detectar el grado de compromiso del parénquima hepático. Reichard ha realizado las determinaciones de esta enzima en homogenizados de tejidos caninos de: hígado, intestino, corazón, pulmón y riñón. Por nuestra parte, hemos realizado las mismas determinaciones en ratas, obteniendo niveles sensiblemente iguales para intestino delgado. Los niveles homogenizados de hígado fueron menores, lo que atribuimos a la diferencia de especie. Esta misma explicación la hacemos válida para las concentraciones más elevadas en otros tejidos en nuestro reporte.

El contenido en suero sanguíneo normal en ambas especies, resulta sensiblemente igual, hecho que es corroborado también por Vallard.

El inducir experimentalmente la necrosis de los tejidos por tetracloruro de carbono, en dosis previamente establecida, se puede observar que la mayor parte de los tejidos analizados, mantienen concentraciones enzimáticas dentro de los límites de desviación standard.

Los descensos observados en la concentración intratisular cardíaca y pulmonar son mínimos y no parecen ser los responsables de los niveles obtenidos en el suero, si se tiene en cuenta el contenido tisular y el peso del órgano.

El principal responsable, entonces, de la elevación de la OCT en el suero es la necrosis celular hepática, por lo que esta prueba adquiere una mayor selectividad para la detección de daño de dicho órgano. Esta selectividad es mayor que la de otras pruebas enzimáticas empleadas actualmente en la clínica.

GRAFICA Nº 1

ORNITIN - CARBANIL - TRANSFERASA

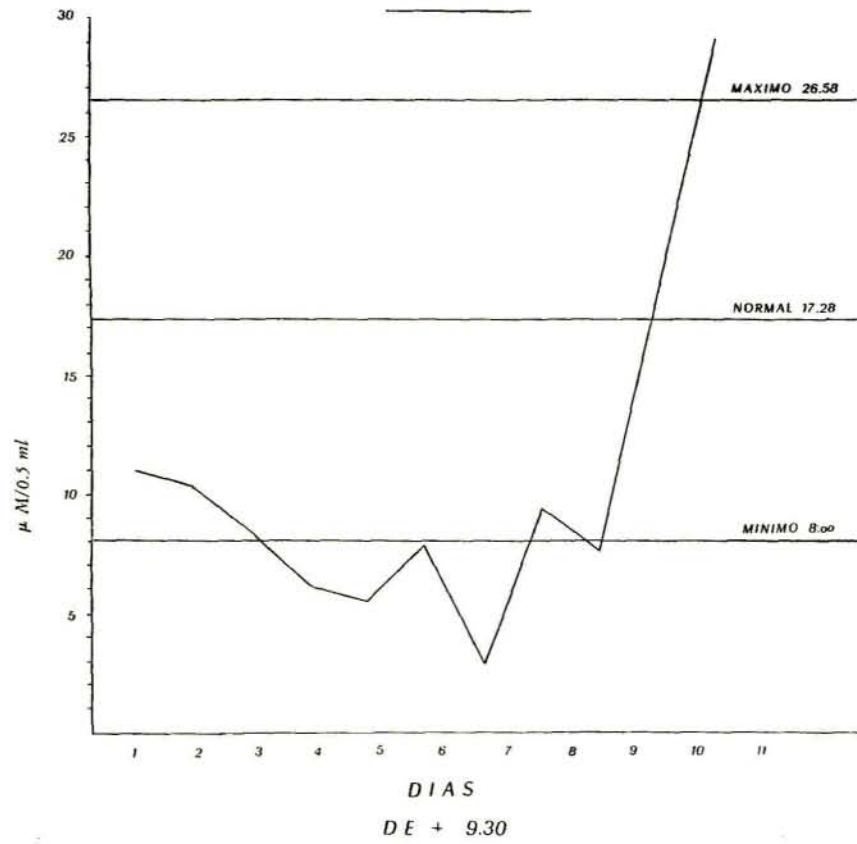
CONTENIDO EN TEJIDOS NORMALES

TEJIDO	CONTENIDO	DE +
Hígado	1.215.50	389.00
Intestino Delgado	359.50	215.00
Cerebro	47.00	43.00
Corazón	34.87	11.60
Riñón	34.50	27.50
Pulmón	17.28	9.30

BIBLIOGRAFIA

- 1.—REICHARD HANS.
Ornithine carbamyl transferase activity in human serum in diseases of the liver and the biliary system., J. Lab. Clin. Med. 57:78-87. 1961.
- 2.—REICHARD HANS.
Ornithine carbamyl transferase activity in human tissue homogenates, J. Lab. Clin. Med. 56:218-221, 1960.
- 3.—REICHARD HANS.
Ornithine carbamyl transferase in dog serum on intravenous injection of enzyme choledochus ligation, and carbon tetrachloride poisoning J. Lab. Clin. Med.: 53: 417-425, 1959.
- 4.—JIMÉNEZ G., MIRANDA G., MEKBEL S., GUTIÉRREZ R.
Nialamida en la intoxicación experimental por tetracoloruro de carbono, Acta Médica Costarricense, 6:169-178, 1963.
- 5.—BENGMARK S., OLSEN R.
Glutamic Pyruvic transaminase in rat liver after single injection of carbon tetrachloride. Proc. Soc. Esp. Biol. Med. 109:258; 1962.
- 6.—REICHARD HANS AND REICHARD PETER.
Determination of ornithine carbamyl transferase in serum, J. Lab. Clin. Med., 52: 709-717, 1958.

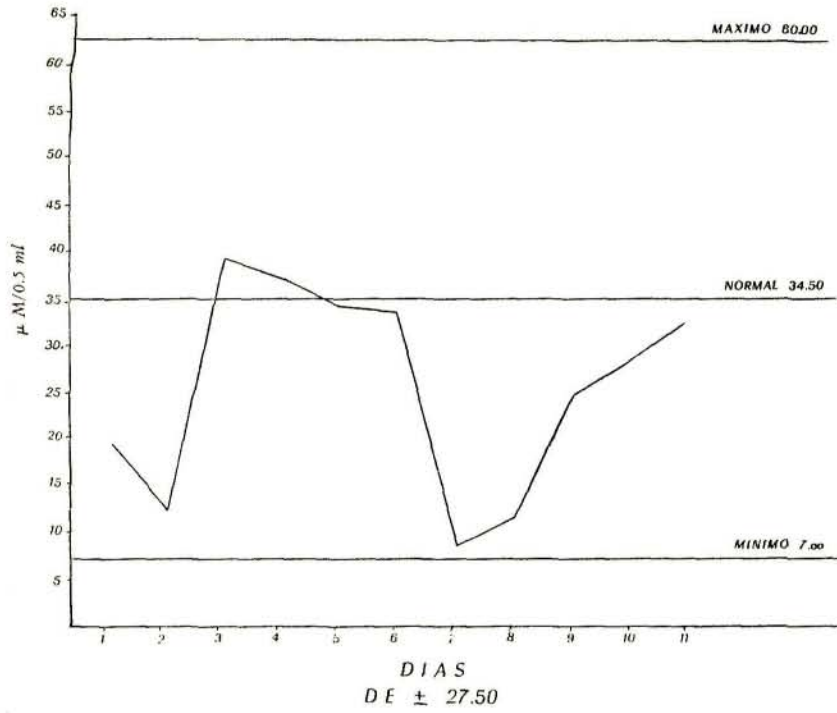
GRAFICA No. 2

ORNITIN - CARBAMIL - TRANSFERASAPULMON

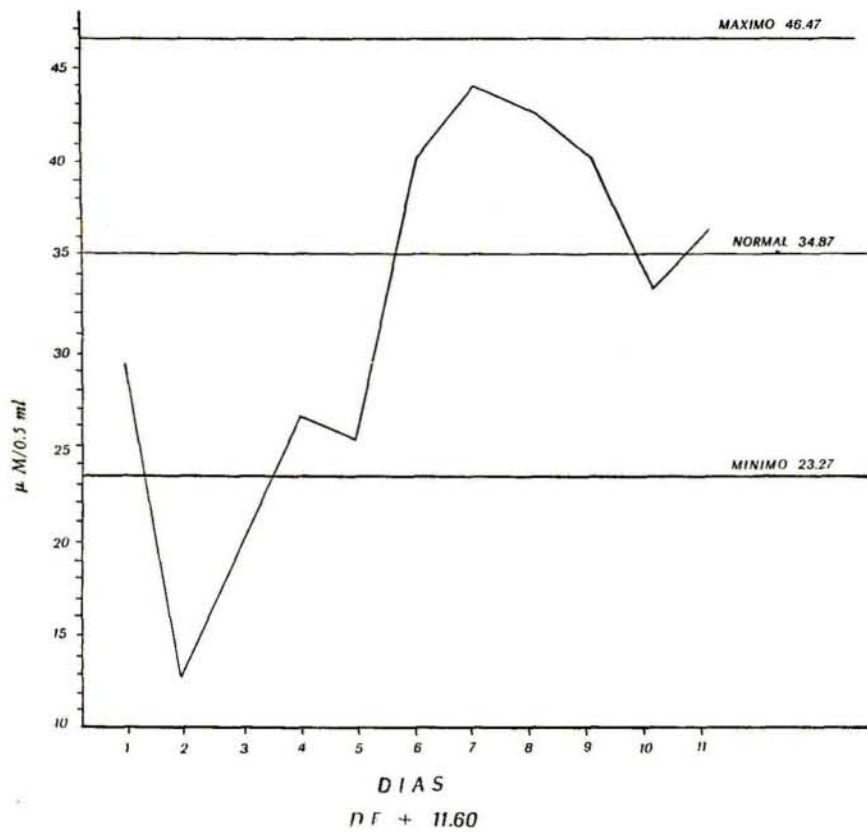
GRAFICA No. 3

ORNITIN - CARBAMIL - TRANSFERASA

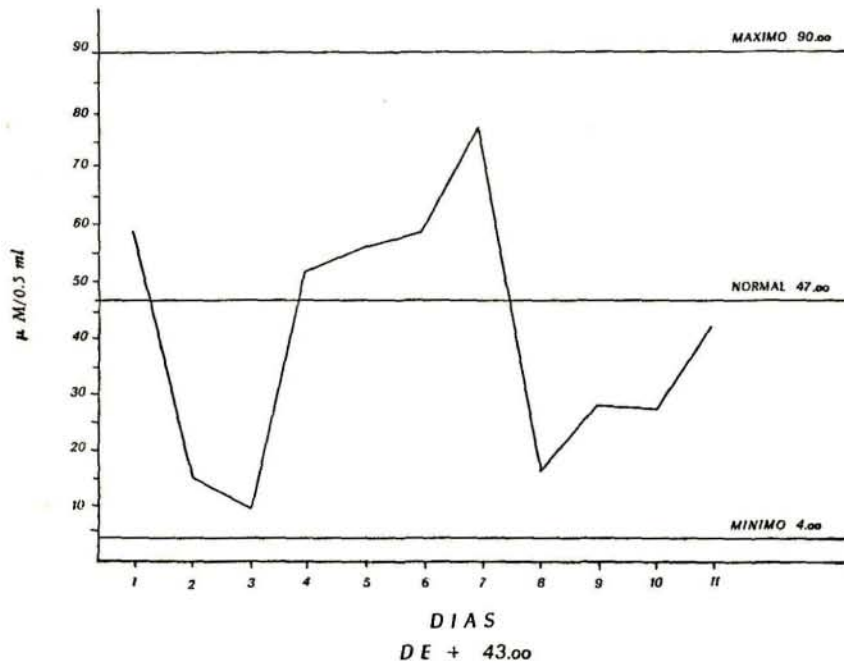
RIÑON



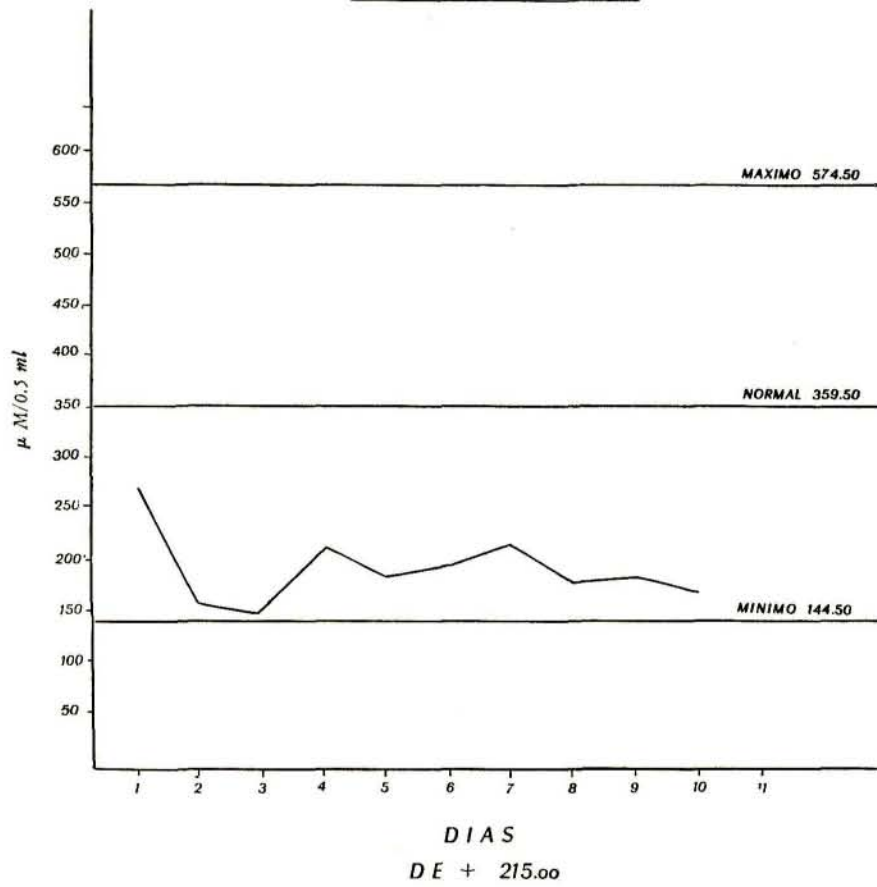
GRAFICA No. 4

ORNITIN - CARBAMIL - TRANSFERASACORAZON

GRAFICA No. 5
ORNITIN - CARBAMIL - TRANSFERASA
CEREBRO



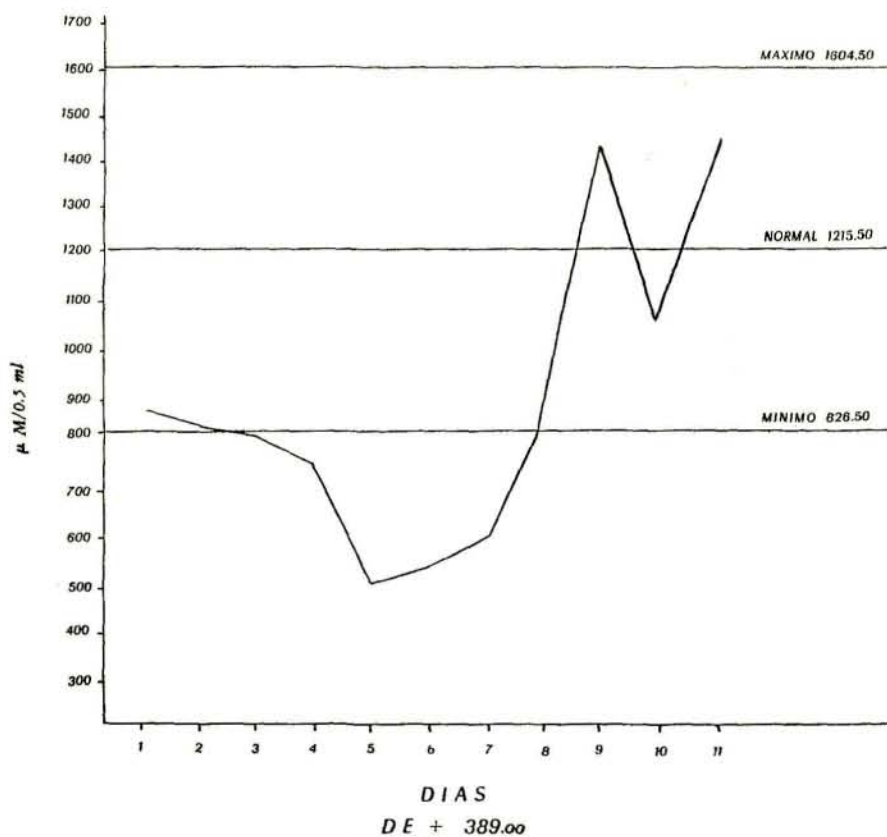
GRAFICA No 6

ORNITIN - CARBAMIL - TRANSFERASAINTESTINO DELGADO

GRAFICA No 7

ORNITIN - CARBAMIL - TRANSFERASA

HIGADO



GRAFICA No. 8

ORNITIN - CARBAMIL - TRANSFERASASUERO SANGUINEO