

## REVISION

## Ornitina carbamoiltransferasa

R. Andrés Moreno

## 1. Introducción

La ornitina carbamoiltransferasa (OCT) (Carbamoilfosfato: L-ornitina carbamoiltransferasa, EC 2.1.3.3) es un trímero, formado por subunidades idénticas, que cataliza la transferencia de un grupo carbamoilo al grupo amino de la ornitina en el ciclo de la urea de Krebs y Henseleit, siendo la segunda enzima que participa en este ciclo (1) (Figura 1). Se ha obtenido purificada del hígado bovino, del hígado de rata y del humano y sus propiedades han sido ampliamente estudiadas (2).

En mamíferos, las concentraciones más altas se encuentran en el hígado (1), hay una concentración mucho más pequeña en el intestino y en leucocitos (3) mientras que en el resto de órganos y tejidos está ausente (1,4). La enzima se encuentra localizada en la mitocondria de las células (1,2).

## 2. Variaciones preanalíticas

La determinación se hace normalmente en suero de sangre venosa. También se puede hacer en plasma de sangre a la que se ha añadido oxalato, citrato o heparina (1). La hemólisis ligera no interfiere y una gran hemólisis sólo disminuye ligeramente la actividad de la OCT (5).

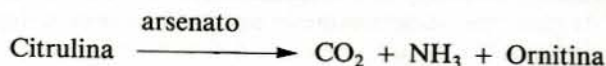
Se ha descrito que la enzima es estable en suero por lo menos una semana a 4° C y más de un año a -15° C. En cuanto a la estabilidad a temperaturas próximas a la ambiental hay ligeras discrepancias. Algunos autores (1) no observan variación en la actividad hasta después de siete días de conservación a 25° C y otros (6) encuentran que a la temperatura de 22° C la actividad disminuye aproximadamente un 25% después de guardarse cuatro días.

## 3. Métodos de determinación

Dos tipos de métodos pueden ser utilizados: los que se basan en la reacción de transformación de la citrulina en ornitina o bien los que se basan en la reacción de sentido contrario, que es la que realmente sucede en el organismo.

## 3.1. Métodos basados en la reacción citrulina y arsenato

La OCT cataliza, en presencia de arsenato, la reacción de conversión de citrulina en ornitina, dióxido de carbono y amoníaco (1,5).



Se forma un intermedio, el carbamoilsenato, que se escinde no enzimáticamente (5). El CO<sub>2</sub> desprendido se puede determinar radiométricamente, si previamente se ha marcado la citrulina con <sup>14</sup>C (1,5,7). La cantidad de CO<sub>2</sub> marcado, liberado durante la reacción enzimática es una medida de la actividad de la OCT.

También se puede medir el NH<sub>3</sub> desprendido durante la reacción. El amoníaco queda retenido en un aparato de microdifusión de Conway y se cuantifica por "nesslerización" o por reacción de Berthelot con fenolhipoclorito (1,5). Una técnica simple y rápida evita el aparato de Conway por medición del NH<sub>3</sub> espectrofotométricamente como indofenol (5).

Se han desarrollado micrométodos, en los que el NH<sub>3</sub> se determina por una reacción de Berthelot mejorada, o incluso el NH<sub>3</sub> ha sido estimado por decoloración de una tira de verde de bromocresol suspendida en el tubo de ensayo (5).

La ornitina, formada en la reacción, ha sido medida

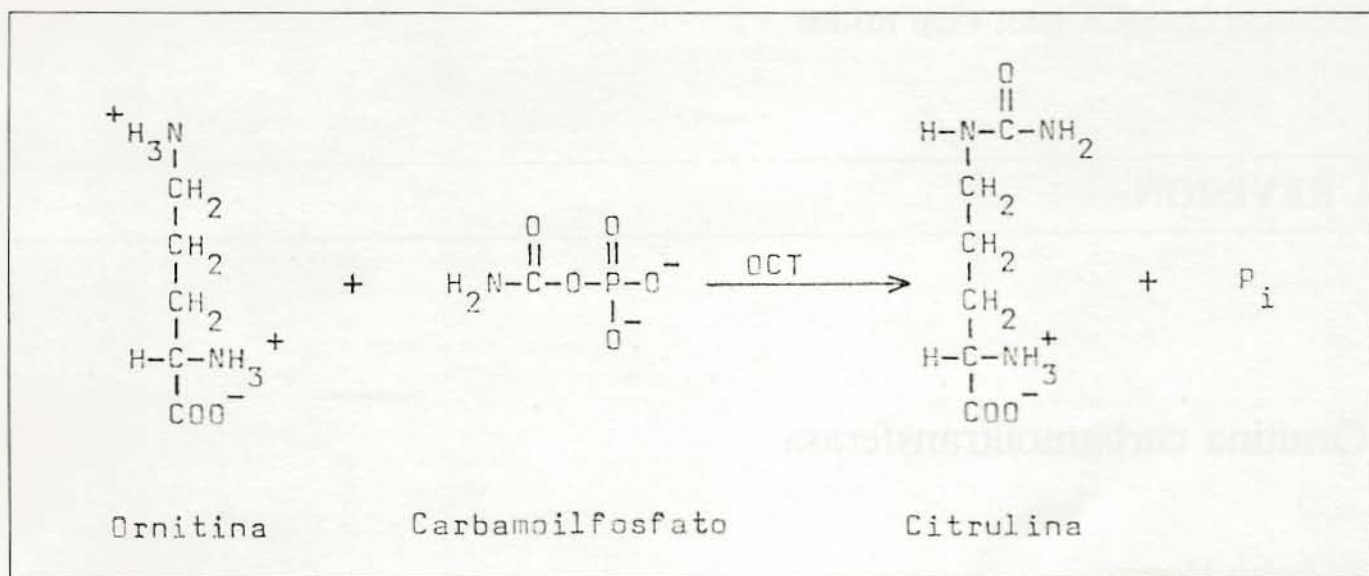
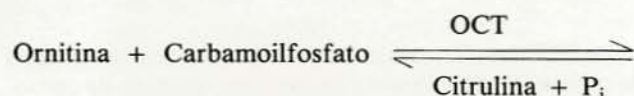


Figura 1. Transformación de Ornitina en Citrulina, catalizada por la OCT, en el ciclo de la urea de Krebs y Henseleit.

por cromatografía en papel y parece haber concordancia con la técnica de "nesslerización".

La correlación entre los métodos de medición del  $\text{NH}_3$  y  $^{14}\text{CO}_2$  es buena aunque no estequiométrica, ya que se usan distintas concentraciones de sustrato (5). Las ventajas principales del método de medición del  $\text{CO}_2$  marcado sobre el del  $\text{NH}_3$  son su mayor especificidad analítica y su mayor rapidez de determinación.

### 3.2. Métodos basados en la formación de citrulina



El equilibrio de la reacción está desplazado hacia la formación de citrulina (5). La cantidad de citrulina formada, por unidad de tiempo, es una medida de la actividad de la OCT.

La medición de la citrulina formada constituye la base para varios métodos de medición de la OCT (1,5).

#### 3.2.1. Métodos colorimétricos

Se basan en la formación de un complejo coloreado de citrulina y diacetilmonoxima en solución ácida (1,5).

Algunos autores descomponen la urea de la muestra, que interfiere en la reacción, con ureasa (5). Incubaban la OCT con carbamoilfosfato y ornitina y paran la reacción con ácido perclórico. La determinación de la citrulina, en el sobrenadante, se realiza por reacción con diacetilmonoxima. La reacción es específica para la citrulina, en ausencia de urea.

En un procedimiento similar, la reacción enzimática puede pararse con borato de fenilmercurio, posteriormente se precipita con perclórico o sulfato de bario y la citrulina se determina fotométricamente como dimetilgloxima (5).

La separación de la citrulina se puede conseguir por filtración, en vez de centrifugación, después de precipitar con ácido cítrico (5). Los iones fenazona y férrico aceleran la reacción fotométrica con diacetilmonoxima.

De estos métodos colorimétricos se han desarrollado varias modificaciones con el fin de conseguir un complejo coloreado más estable. En una de estas modificaciones se emplea el reactivo diacetilmonoxima/antipirina (8); esta técnica se ha usado en un micrométodo (9). Otra modificación (10) usa como reactivo diacetilmonoxima-tiosemicarbazida.

El tipo de tampón, el pH y la concentración del sustrato son las variables más importantes que deben ser estrictamente controladas (1) para el desarrollo óptimo de los métodos colorimétricos. A pH inferior a 7 la actividad de la OCT decrece rápidamente y por encima de pH 7 aumenta, pero también se incrementa la del blanco por descomposición del carbamoilfosfato. Se ha descrito que los tampones fosfato y Tris inhiben la OCT. También inhibe la enzima un exceso de ornitina y las sales de mercurio. Además, el carbamoilfosfato ha de ser controlado puesto que es bastante inestable. Incluso en estado cristalino, este compuesto debe ser guardado en una botella tapada y en frío (5). Por otra parte, se han de usar disoluciones de ureasa de baja concentración pues se ha descrito (6) que las preparaciones comerciales de ésta, a menudo, presentan actividad OCT dando un valor alto de blanco.

Entre las desventajas de estos métodos colorimétricos se consideran el que el complejo coloreado formado es sensible a la luz y el que la diacetilmonoxima reacciona con otros compuestos carbamido, como la urea y otros, que también pueden dar una reacción coloreada, no pueden ser eliminados totalmente (11).

Otra desventaja es que los métodos publicados son poco sensibles y no detectan apenas actividad en el suero o plasma de sujetos sanos.

Basándose en los métodos de determinación anteriores, se han desarrollado varios sistemas automáticos para el análisis de la OCT.

Uno de ellos se basa en el uso del reactivo coloreado diacetilmonoxima/antipirina (5). El principio de este mé-

**Tabla I: Intervalos de referencia de la OCT, según métodos diversos.**

Método	Intervalo de Referencia	Referencia Bibliográfica
Colorimétrico	0-266 nkat/1 (0-16 U/1)	( 6,16)
	0-100 nkat/1 (0- 6 U/1)	(18,16)
Radiométrico	≤ 1,4 nkat/1 ( ≤ 5 nmol/0,5 ml/2 h)	(5,16)

todo consiste en que la citrulina formada en 10 minutos se dializa en una solución de diacetilmonoxima y se determina por colorimetría con antipirina-ácido sulfúrico; la urea del suero se destruye con ureasa. Otros métodos se basan en la reacción de la citrulina y arsenato y posterior determinación del amoníaco por el método de Berthelot.

### 3.2.2. Métodos radiométricos

Se basan en marcar el carbamoilfosfato con  $^{14}\text{C}$  y aislar por cromatografía en columna el producto marcado de la reacción, la  $\text{L-}^{14}\text{C}$ -citrulina (11).

Se ha descrito que estos métodos radiométricos son más sensibles que los colorimétricos, pero tienen la desventaja de que el fosfato de carbamoilo es inestable en solución (11).

Se ha propuesto también otro método (11) en el que se marca la ornitina con  $^{14}\text{C}$ . Por cromatografía en capa fina, se separa el sustrato del producto radioactivo. Las regiones correspondientes a la ornitina y a la citrulina se cortan y se miden en un contador de centelleo líquido. La ventaja de este último es que la ornitina marcada es más estable en solución que el fosfato de carbamoilo.

## 4. Factores de variación biológica.

La concentración catalítica de la OCT, en plasma o suero de sujetos sanos, es muy baja (Tabla I).

No se ha encontrado que el intervalo de referencia difiera significativamente con la edad. Tampoco se han hallado diferencias significativas debidas al sexo, ni se han detectado variaciones diurnas (5).

Se ha descrito un aumento del nivel de la enzima tras el ejercicio, habiéndose observado un efecto máximo 7 días después del mismo (12).

Una dosis única de alcohol no altera los valores plasmáticos (5).

Durante el parto, si se usa cloroformo como anestésico, puede aumentar la actividad plasmática de la OCT (5).

Cuando se ingiere una dieta con un alto contenido proteico, siguiendo a una dieta normal, aumenta el nivel plasmático de la enzima posiblemente como resultado de la inducción de las enzimas del ciclo de la urea (5).

En sangre del cordón umbilical se ha observado una actividad OCT igual al nivel encontrado en sangre de adultos (13).

## 5. Valor semiológico

La actividad sérica de la OCT es muy baja y debido a su presencia casi exclusivamente en el hígado, un gran incremento de esta enzima en el suero indica alteraciones mitocondriales ocurridas en las células hepáticas. Estas alteraciones pueden ser debidas a infección, toxicidad o necrosis celular (1). La determinación de la actividad catalítica de la OCT puede ser útil como diagnóstico y pronóstico de varias enfermedades hepáticas. Se ha observado que su actividad sérica se eleva cuando hay evidencia de estasis biliar o daño hepático (14).

Se ha descrito un incremento sérico de la OCT por las siguientes causas (14,15,16):

- Hepatitis vírica
- Necrosis hepática tóxica
- Enfermedad neoplásica primaria y secundaria
- Alcoholismo
- Cirrosis hepática
- Cirrosis alcohólica
- Esquistosomiasis
- Absceso hepático (piogénico)
- Enfermedad gastrointestinal con implicación hepática (ej. enteritis)
- Obstrucción biliar extrahepática
- Insuficiencia cardíaca congestiva
- Colecistitis aguda
- Condiciones inmunológicas tales como enfermedad vascular del colágeno
- Efectos de la irradiación por rayos X.

La deficiencia congénita de OCT en el hígado es una de las alteraciones más comunes del ciclo de la urea. Se conoce como hiperamonemia congénita de tipo II y fue descrita por primera vez en 1962 por Russell y colaboradores (3).

La deficiencia de OCT es transmitida genéticamente como un carácter dominante ligado al cromosoma X. En los varones afectados, la enfermedad se manifiesta de forma severa muriendo habitualmente durante la primera semana de vida, mientras que en las mujeres, la enfermedad no es letal en el período postnatal y las manifestaciones clínicas varían mucho según el grado de intolerancia a las proteínas.

El hallazgo bioquímico predominante es el aumento del ión amonio en sangre, que se correlaciona directamente con el grado de déficit de la actividad enzimática. Durante las crisis de estos pacientes, por aumento del amonio, se incrementa también la concentración sanguínea de glutamina, alanina y a veces, lisina (3,17), debido quizás a una síntesis aumentada secundaria al acúmulo de amoníaco. La concentración plasmática de citrulina tiende a estar dentro del intervalo de referencia, o ligeramente por debajo y la de ornitina y urea se encuentran también dentro de los límites. Hay un acúmulo de pirimidinas en sangre, principalmente ácido orótico, uracilo y uridina y un aumento en la excreción de éstas en cantidad directamente proporcional a la ingesta de proteínas y al aumento del ión amonio en sangre. Las actividades séricas de aspartatoaminotransferasa y alanina aminotransferasa se encuentran a menudo incrementadas cuando el ión amonio está muy aumentado en sangre.

El diagnóstico definitivo de deficiencia de OCT se puede hacer por estudio de la actividad de esta enzima en el hígado, mucosa yeyunal o leucocitos. La medición de la OCT en suero no es útil para establecer este diagnóstico, debido a que presenta una concentración catalítica muy

baja.

Aparte de la reducción cuantitativa de la actividad enzimática, se han descrito anomalías dependientes del pH, de los valores de la Km y de otras características enzimáticas en pacientes con deficiencia de actividad OCT.

También se han demostrado deficiencias transitorias de actividad OCT hepática en pacientes con síndrome de Reye (3).

La OCT está presente en células del líquido amniótico y por tanto podría ser posible el diagnóstico prenatal de deficiencia congénita de OCT.

A pesar de la especificidad hepática de la OCT, su determinación para el diagnóstico de hepatopatías, no se ha difundido aunque hace algún tiempo se le dio una gran importancia en la literatura. Esto se puede atribuir a la escasa practicabilidad de los métodos analíticos de determinación desarrollados y a la baja sensibilidad de los mismos, ya que en general apenas detectan actividad en el suero o plasma de sujetos sanos. La información que proporciona la OCT, en las enfermedades hepáticas se puede obtener por otras enzimas hepáticas de más fácil determinación (ej. la glutamato deshidrogenasa).

En todo caso, no debe olvidarse la determinación de esta enzima para el diagnóstico de la hiperamoniemia congénita de tipo II.

**Agradecimientos:** Agradezco al Dr. Javier Fuentes Arderiu la ayuda prestada en el desarrollo del presente trabajo.

1. **Cerioti G.** Ornithine carbamoyltransferase. En: Bergmeyer HU, ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press, 1974: 691-698.
2. **Mori M, Uchiyama Ch, Miura S, Tatibana M, Nagayama E.** Ornithine carbamoyltransferase deficiency: coexistence of active and inactive forms of enzyme. *Clin Chim Acta* 1980; 104: 291-299.

3. **Shih VE.** Ornithine carbamoyl transferase deficiency. En: Stanbury J, Wyngaarden J8, Fredrickson DS, eds. *The metabolic basis of inherited disease*. New York: Mc Graw-Hill, 1978; 368-371.
4. **Reichard H.** Ornithine carbamoyltransferase activity in human tissue homogenates. *J Lab Clin Med* 1960; 56:218-221.
5. **Demetriou JA, Drewes PA, Gin JB.** Ornithine carbamoyltransferase. En: Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW, eds. *Clinical Chemistry, principles and technics*. Hagerstow, Md: Harper and Row, 1974; 868-872.
6. **Bagrel A, Museur G, Siest G.** Colorimetric measurement of ornithine carbamoyltransferase activity in plasma, and results for a supposedly healthy population. *Clin Chem* 1975; 21:1716-1720.
7. **Reichard H, Reichard P.** Determination of ornithine carbamoyltransferase in serum. *J Lab Clin Med* 1958; 52:709-17.
8. **Cerioti G, Gazzaniga A.** Assensitive method for serum ornithine carbamoyltransferase determination. *Clin Chim Acta* 1966; 14: 57-62.
9. **Cerioti G.** Optimal conditions for ornithine carbamoyltransferase determination. A simple micromethod without deproteinization. *Clin Chim Acta* 1973; 47:97-105.
10. **Ohshita M, Takeda H, Kamiyama Y, Ozawa K, Honjo I.** A direct method for the estimation of ornithine carbamoyltransferase activity in serum. *Clin Chim Acta* 1976; 67:145-152.
11. **McLaren J, G.Ng W.** Assay of ornithine carbamoyltransferase activity in human liver using carbon-labeled ornithine and thin-layer chromatography. *Clin Chim Acta* 1977; 81:193-201.
12. **Friedman RB, Anderson RE, Entine SM, Hirschberg SB.** Effects of diseases on clinical laboratory tests. *Clin Chem* 1980; 26:186D.
13. **Diem K, Letner C, eds.** *Documenta Geigy. Tablas científicas*. Barcelona: Ciba-Geigy, 1975; 604.
14. **Reichard H.** Serum ornithine carbamoyltransferase activity in man. A highly specific test of liver and biliary tract involvement. Observation on 695 patients. *Acta Med Scand* 1962; 172:723-738.
15. **Wallach J, ed.** *Interpretation of diagnostic test. A handbook synopsis of laboratory medicine*. Boston: Little, Brown, 1983; 62-63.
16. **Tietz NW, ed.** *Clinical guide to laboratory tests*. Philadelphia: WB Saunders, 1983; 364-365.
17. **Van der Heiden C, Desplanque J, Bakker HD.** A simple approach to predict residual liver ornithine carbamoyltransferase (OCT) activity from serum enzyme ratios. *Clin Chim Acta* 1978; 84:259-263.
18. **Clayson KJ, Fine JS, Strandjord PE.** A more sensitive automated method for determination of ornithine carbamoyltransferase activity in human serum. *Clin Chem* 1975; 21:754-757.