

DOCUMENTO

Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de la γ -glutamyltransferasa en suero sanguíneo humano

Sociedad Española de Química Clínica, Comité Científico, Comisión de Enzimas

Jorge Beleta, F. Javier Gella^a

Documento G, Fase 3, versión 1

Introducción

La γ -glutamyl transferasa (GGT, γ -glutamyl-péptido: aminoácido- γ -glutamyl transferasa, EC 2.3.2.2) es una enzima que cataliza la transferencia de grupos γ -glutamilo a diversos aceptores. La naturaleza de estos aceptores define tres tipos de reacción diferentes: la hidrólisis, o transferencia del grupo γ -glutamilo a una molécula de agua, la transpeptidación, o transferencia del mismo grupo a un aminoácido o péptido tal como el glutathion, y finalmente la autotranspeptidación, consistente en la transferencia del grupo γ -glutamilo a otra molécula del mismo sustrato para formar un γ -glutamyl- γ -glutamyl péptido⁽¹⁾.

La molécula es una glicoproteína formada por dos fragmentos de masa molecular relativa 22000 y 47000 respectivamente. El centro activo se sitúa en el fragmento menor, de carácter hidrofílico y dirigido hacia el citosol, mientras que el fragmento de mayor masa presenta una región hidrofóbica que se encuentra incluida en la membrana plasmática de las células de diversos tejidos⁽²⁾. La identificación de formas múltiples resulta problemática por el hecho de que la enzima se une con facilidad a diversos componentes séricos, fundamentalmente lipopro-

teínas, para dar complejos con propiedades fisicoquímicas diferentes. Otra fuente de variabilidad es el distinto grado de glicación que presentan las formas procedentes de diversos tejidos⁽²⁾. La enzima predomina en riñón, localizándose en la membrana de las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales y el asa de Henle. Se ha detectado también γ -glutamyltransferasa en cantidades variables en páncreas, hígado, duodeno y otros tejidos⁽³⁾.

La elevación de la concentración catalítica de γ -glutamyltransferasa en suero se debe casi exclusivamente a alteraciones de origen hepático. También pueden detectarse elevaciones de la enzima en orina de pacientes con alteraciones diversas de origen renal⁽⁴⁾.

El aumento de la concentración catalítica sérica de γ -glutamyltransferasa de origen hepático suele acompañar la mayoría de afecciones de este órgano, produciéndose las mayores elevaciones en casos de obstrucción del tracto biliar o de tumores malignos con implicación hepática⁽⁵⁾. La γ -glutamyltransferasa hepática aumenta también su concentración sérica tras la administración de diversos fármacos, debido a una inducción de la síntesis hepática de la enzima⁽⁶⁾. Esta inducción puede también producirse por efecto del etanol. Como consecuencia, las concentraciones catalíticas séricas de γ -glutamyltransferasa en casos de cirrosis alcohólica son habitualmente muy elevadas⁽⁷⁾.

La determinación de la concentración catalítica de γ -glutamyltransferasa en suero humano se realiza en la actualidad casi exclusivamente utilizando sustratos donadores sintéticos^(1,8), siendo en todos los casos la glicilglicina el aceptor de grupos glutamilo⁽⁹⁾.

^a Bioquímica Clínica. Area de R + D. Universitat Autònoma de Barcelona. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Sant Antoni M Claret 167, 08025 Barcelona.

Fundamento

El método recomendado para la determinación de γ -glutamyltransferasa en suero se basa en el propuesto por la IFCC¹⁰. El método utiliza L- γ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida como sustrato donador de grupos glutamilo. Como aceptor de dichos grupos glutamilo se emplea la glicilglicina, la cual también actúa como sustancia tamponante de pH. En presencia de estos compuestos la γ -glutamyltransferasa cataliza las siguientes reacciones:

- (I) L- γ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida + glicilglicina \rightleftharpoons 5-amino-2-nitrobenzoato + L- γ -glutamyl glicilglicina.
- (II) 2L- γ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida \rightleftharpoons L- γ -glutamyl- γ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida + 5-amino-2-nitrobenzoato

Utilizando las condiciones de medición propuestas, la reacción (II), de autotransferencia, supone menos de una fracción de 0,01 del producto formado^(1,11).

Condiciones recomendadas para la medición

Las condiciones recomendadas para la determinación en suero son las siguientes:

Temperatura	37,0°C
pH (30°C)	7,90
L- γ -Glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida	6 mmol/L
Glicilglicina	150 mmol/L
Fracción de volumen de muestra	0,091 (1:11)

Las concentraciones indicadas corresponden a la mezcla de reacción final.

Obtención, transporte y almacenamiento de la muestra

La sangre venosa debe extraerse en condiciones que supongan el mínimo de estasis posible. El suero debe obtenerse antes de transcurrir dos horas desde la venipuntura. No se aconseja la utilización de plasma ya que los anticoagulantes interfieren u originan problemas de turbidez⁽¹²⁾. La extracción de lípidos del suero reduce notablemente los valores de γ -glutamyltransferasa.

La γ -glutamyltransferasa mantiene su actividad en suero durante al menos 5 días cuando éste se guarda a 4°C o durante al menos 9 meses cuando se almacena a -80°C⁽¹⁰⁾.

Reactivos

Los reactivos empleados deben cumplir las especificaciones establecidas por la IFCC^(13,10).

Composición del reactivo de trabajo:

L- γ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida 6,6 mmol/L,

glicilglicina 165 mmol/L, pH 7,90 a 30°C.

La adaptación del método original de la IFCC a la temperatura recomendada por la SEQC para la determinación de la concentración catalítica de las enzimas⁽¹⁴⁾ no requiere una modificación del reactivo de trabajo. La variación en el pH óptimo de la γ -glutamyltransferasa, que desciende de 7,9 a 7,6 al incrementarse de 30° a 37°C la temperatura de reacción⁽¹⁵⁾, se ve compensada por el pH del tampón glicilglicina-NaOH, que disminuye de forma similar al aumentar la temperatura⁽¹⁶⁾.

Procedimiento analítico

Condiciones operatorias

Longitud de onda: 410 (\pm 1 nm).

Paso de luz: 1,00 cm.

Volumen final de la mezcla de reacción: 2,20 mL.

Temperatura: 37,0 °C.

Esquema analítico

Preincubar a 37,0°C el reactivo de trabajo y la muestra (ésta no más de 5 minutos). Pipetear:

Reactivo de trabajo	2,00 mL
Muestra	0,20 mL

Mezclar e incubar inmediatamente a 37,0°C, registrando la variación de absorbancia durante 3 minutos.

Debido a que el producto detectado, 5-amino-2-nitrobenzoato, se determina a una longitud de onda (410 nm) lejana a su máximo de absorbancia (380 nm), resulta importante verificar la inexactitud fotométrica a 410 nm del instrumento de medida utilizado en la determinación⁽¹⁰⁾.

Cálculos

Calcular el ΔA /minuto obtenido para el intervalo de mediciones del período lineal de la reacción.

Teniendo en cuenta que el coeficiente de absorción molar del 5-amino-2-nitrobenzoato a 410 nm es de 790,8 m² mol⁻¹ (11,17) se deducen las siguientes ecuaciones:

$$\Delta A/\text{min} \times 23187 = \text{nkat/L}$$

$$\Delta A/\text{min} \times 1391 = \text{U/L}$$

Intervalo útil de mediciones

La concentración catalítica de γ -glutamyltransferasa es proporcional a la velocidad de transformación hasta 5000 nkat/L (300 U/L) utilizando la metodología recomendada. Cuando el ΔA /min sea superior a 0,215 se debe diluir la muestra con cloruro sódico 154 mol/L y repetir la determinación.

Valores usuales

Los valores usuales que se hallan en suero de personas adultas y presuntamente sanas, obtenidos utilizando el método recomendado se reflejan en la siguiente tabla⁽¹⁸⁾.

	nkat/L	U/L
Mujeres	200-800	12-48
Hombres	267-1433	16-86

Interferencias

Varios fármacos como el fenobarbital, la difenilhidantoína, barbituratos, contraceptivos orales y tolbutamida, inducen la síntesis hepática de la enzima, aumentando consecuentemente las concentraciones séricas. El etanol ejerce un efecto similar en alcohólicos. Se recomienda consultar el listado de Young et al⁽¹⁹⁾ para otros medicamentos.

Bibliografía

- Shaw LM, London JW, Fetterolf D, Garfinkel D. γ -glutamyltransferase: kinetic properties and assay conditions when gamma-glutamyl-4-nitroanilide and its 3-carboxy derivative are used as donor substrates. *Clin Chem* 1977; 23: 79-85.
- Nemesanzsky E, Lott JA. Gamma-glutamyltransferase and its isoenzymes: Progress and problems. *Clin Chem* 1985; 31: 797-803.
- Shaw LM, Patersen-Archer L, London JW, Marsh E. Electrophoretic, kinetic, and immunoinhibition properties of gamma-glutamyl transpeptidase from various tissues compared. *Clin Chem* 1980; 26: 1523-1527.
- Salgó L, Szabó A. Gamma-glutamyl transpeptidase activity in human urine. *Clin Chim Acta* 1982; 126: 9-16.
- Boone DJ, Routh JI, Schrantz R. Gamma-glutamyl transpeptidase and 5'-nucleotidase. Comparison as diagnostics for hepatic disease. *Amer J Clin Pathol* 1974; 61: 321-325.
- Bartels H, Hauck W, Vogel I. Aminopyrine, an effective modifier of liver and serum gamma-glutamyl transpeptidase. *J Pediatrics* 1975; 86: 298-305.
- Shaw LM, Marsh E. The effect of one evening social drinking on serum gamma-glutamyltransferase activity. *Clin Chem* 1981; 27: 1036-1039.
- Persijn JP, der Slik W3. A new method for the determination of gamma-glutamyltransferase in serum. *J Clin Chem Clin Biochem* 1976; 14: 421-427.
- Szasz G. A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyltranspeptidase. *Clin Chem* 1969; 15: 124-136.
- Shaw LM, Strömme JH, London JL, Theodorsen L. Provisional recommendations of IFCC Methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 4. IFCC method for gamma-glutamyltransferase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 633-646.
- Solberg HE, Theodorsen L, Strömme JH. Gamma-glutamyl transferase in human serum: ana analysis of kinetic models. *Clin Chem* 1981; 27: 303-307.
- Strömme JH, Theodorsen L. Heparin interference in the measurement of gamma-glutamyltransferase activity with the Scandinavian and the IFCC recommended method. *Scand J Clin Lab Invest* 1985; 45: 437-442.
- Bower Jr GN, Bergmayer HU, Horder M Moss DW. Approved recommendations of IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 1. General considerations concerning the determination of the catalytic concentration of an enzyme in the blood serum or plasma of man. *J Clin Chem Clin Biochem* 1980; 18: 89-95.
- Gella FJ, Carreras J, Chabás J, et al. Consideraciones generales sobre la determinación de la concentración catalítica de una enzima en suero o plasma sanguíneo humano. *Quim Clin* 1983; 2: 107-110.
- Theodorsen L, Strömme JH. Gamma-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide: the substrate of choice or routine determinations of gamma-glutamyltransferase activity in serum? *Clin Chim Acta* 1976; 72: 205-210.
- European Committee for Clinical Laboratory Standards. Standards for enzyme determinations. ECCLS Document, 1988.
- Yamadate S, Sekiguchi M, Kawano K. 5-amino-2-nitrobenzoic acid as a reference material for the determination of gamma-GT activity. *Clin Chim Acta* 1986; 160: 63-67.
- Shaw LA, Strömme JH. Gamma-glutamyltransferase. IFCC method (provisional). En Bergmayer HU ed. *Methods of Enzymatic Analysis, Vol III*. Weinheim/Deerfield Beach, Florida/Basel: Verlag Chemie, 1983: 357-364.
- Young DS, Pestaner LC, Gibberman V. Effects of drugs on clinical laboratory tests. *Clin Chem* 1975; 21: 1D-432D.

Anexo I. Método de referencia de la Federación Internacional de Química Clínica para la determinación de γ glutamiltransferasa en suero humano

El método que se describe a continuación es un resumen del borrador preparado por la Comisión de Expertos en Enzimas (EPE) de la Federación en 1983⁽¹⁰⁾, basado en los mismos principios enunciados en la descripción del método de rutina recomendado por la Sociedad Española de Química Clínica en este documento.

Reactivos

Los reactivos utilizados deben cumplir las condiciones de pureza y calidad establecidas⁽¹⁰⁾.

Solución I: L-gamma-glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida 6,6 mmol/L, glicilglicina 165 mmol/L, pH 7,90 (30°C).
Solución II: Cloruro sódico 154 mmol/L.

Procedimiento analítico

Condiciones operatorias

Longitud de onda: 410 (\pm 1 nm).
Paso de luz: 1,00 cm.
Volumen final de la mezcla de reacción: 2,20 mL.
Temperatura: 30,0°C.

Cada medida es el resultado de la determinación de dos velocidades de transformación: la de reacción total (A) y la del blanco de reactivos (B).

Tipo de determinación	Muestra	Reactivo
Reacción total (A)	Suero	Solución I
Blanco de reactivos (B)	Solución II	Solución I

En cada caso las soluciones empleadas deben ser previamente atemperadas a 30°C.

Esquema analítico

Pipetear en la cubeta:

Solución I	2,00 mL
Muestra (suero o solución II)	0,200 mL

Mezclar e incubar a 30,0 °C. Registrar la variación de absorbancia durante un periodo de 5 minutos.

Cálculos

El valor promedio del incremento de absorbancia con respecto al tiempo ($\Delta A/t$) para la reacción total, debe ser

corregido por el valor de la velocidad de transformación en la mezcla de reacción utilizada como blanco.

$$(\Delta A/\text{min}) \text{ corregido} = (\Delta A/\text{min})A - (\Delta A/\text{min})B$$

A y B indican los tipos de determinación referidos anteriormente.

En los cálculos debe utilizarse el valor corregido de $\Delta A/\text{min}$. Si el $\Delta A/\text{min}$ es superior a 0,215 debe diluirse la muestra de 5 a 10 veces con solución II y repetirse la determinación.

La concentración catalítica se determina utilizando los factores siguientes:

$$\begin{aligned}\Delta A/\text{min} \times 23187 &= \text{nkatal/L} \\ \Delta A/\text{min} \times 1391 &= \text{U/L}\end{aligned}$$