

INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS MÉDICAS
“DR. SERAFÍN RUIZ DE ZÁRATE RUIZ”
SANTA CLARA, VILLA CLARA

IDENTIFICACIÓN DE INTERFERENCIAS EN LA TÉCNICA DE
DETERMINACIÓN DE Γ - GLUTAMIL TRANSFERASA SÉRICA

Por:

Lic. Leticia Cristina Béquer Mendoza¹, Candelaria Amada Ramos Collado², Olga Lidia González González³, Lutgarda Pérez de Alejo Rodríguez⁴, Tahiry Gómez Hernández⁵ y Téc. Ana Delia Alfonso Pestano⁶

1. Licenciada en Biología. Aspirante a Investigador. ISCM-VC. e-mail: leticiabm@iscm.vcl.sld.cu
2. Especialista de I Grado en Laboratorio Clínico. Hospital Universitario “Arnaldo Milián Castro”. Santa Clara, Villa Clara. Asistente. ISCM-VC.
3. Doctora en Ciencias Médicas. Profesora Titular. ISCM-VC. e-mail: olgagg@iscm.vcl.sld.cu
4. Especialista de I Grado en Laboratorio Clínico. Hospital Universitario “Arnaldo Milián Castro”. Santa Clara, Villa Clara. Asistente. ISCM-VC.
5. Máster en Química Analítica. Aspirante a Investigador. ISCM-VC.
6. Técnica de Laboratorio Clínico. ISCM-VC.

Resumen

Introducción: La gamma glutamil transferasa es una enzima hepática que aumenta su actividad ante varias enfermedades y por inducción enzimática provocada por determinados fármacos y drogas. La ingestión de alcohol produce un aumento en la actividad de esta enzima y disminuye sus valores al cabo de seis u ocho semanas luego de la ingestión. Este efecto permite que la gamma glutamil transferasa sea utilizada como un marcador biológico para el alcoholismo, y permita supervisar el tratamiento de deshabituación en pacientes alcohólicos. **Objetivo:** Determinar la existencia de interferencias en nuestro análisis relacionadas con diferentes parámetros en Química Clínica. **Métodos:** Se tomó la muestra de suero de 30 pacientes alcohólicos en tratamiento de deshabituación ingresados en el Hospital Psiquiátrico Provincial de Villa Clara y se les realizó la determinación *in vitro* de la gamma glutamil transferasa en suero por método cinético, en espectrofotómetro y en el analizador automático de química clínica (Hitachi); además, se les realizaron en dicho analizador las determinaciones de bilirrubina, colesterol, glucemia, urea, triglicéridos, entre otros, como criterio de exclusión para la investigación. Se realizó un Análisis de Regresión Lineal empleando el módulo correspondiente en el paquete estadístico STATISTICA 5.5 para determinar las interferencias. **Resultados:** Analizando los parámetros estadísticos de la ecuación obtenida, se observó que el modelo explica satisfactoriamente el 96,7% de la varianza observada en la variable dependiente. Entre las variables que forman parte de dicho modelo, se destaca la aparición de las relacionadas con los niveles séricos de fosfatasa alcalina, urea y colesterol; los productores del juego de reactivos informan que este último interfiere en la exactitud del resultado.

Descriptor DeCS:

GAMMAGLUTAMILTRANSFERASA/sangre
ALCOHOLISMO

Subject headings:

GAMMA-GLUTAMYLTRANSFERASE/sangre
ALCOHOLISM

Introducción

La gamma glutamil transferasa (GGT), también llamada gamma glutamil transpeptidasa, glutamine: D-glutamyl péptido 5-glutamyl transferasa (EC 2.3.2.2), es una glicoproteína heterodimérica unida a la membrana plasmática, que cataliza la transferencia de grupos gammaglutamil de un péptido a otro o de un péptido a un aminoácido, y desempeña una función fundamental en el metabolismo del glutatión¹⁻³.

El tejido más rico en esta enzima es el riñón (en el túbulo renal proximal), seguido del páncreas (ductos y células del acino), hígado, bazo, intestino y pulmones. Dentro de la célula, se localiza en las membranas, fundamentalmente en el retículo endoplasmático liso, en los microsomas, en la fracción soluble del citoplasma y en los conductillos biliares. La actividad de la GGT proviene principalmente del hígado, y es muy utilizada para detectar la disfunción hepática⁴.

Se han obtenido preparaciones altamente purificadas de las GGT procedentes de hígado y riñón, tanto en ratas como en humanos, lo que ha permitido estudiar esta enzima profundamente. Es una enzima heterodimérica compuesta por dos subunidades glicosiladas. La subunidad mayor (M = 50,000-62,000) fija la molécula a la membrana a través de su porción hidrofóbica amino-terminal. La subunidad menor (M = 22,000-30,000), que posee la porción de unión al grupo γ -glutamilo, se asocia de forma no covalente a las cadenas de la subunidad mayor^{5,6}.

La determinación de esta enzima encuentra su principal aplicación en el campo de la enfermedad hepática, y forma parte de las pruebas de función de este órgano para detectar procesos malignos primarios o secundarios, y la mayoría de las enfermedades hepáticas y del tracto biliar^{7,8}, aunque la elevación en suero de la actividad de la enzima está asociada a otras enfermedades, como la diabetes, la hipertensión arterial y el síndrome metabólico⁹⁻¹¹; aumenta también en la pancreatitis y en el infarto agudo del miocardio, posiblemente por los efectos secundarios del proceso sobre el hígado^{12,13}. Existen elevaciones fisiológicas en los recién nacidos y lactantes de hasta un año de edad; asimismo, las cifras parecen aumentar en personas de más de 60 años. Estudios realizados han encontrado valores elevados en pacientes que se encuentran en tratamiento con fármacos, como los barbitúricos, antiepilépticos, esteroides, anticonceptivos orales, benzodiazepinas y los antilipídicos¹⁴.

Otra de las causas de incremento en la actividad enzimática de la GGT es el consumo de drogas, fundamentalmente la ingestión crónica de alcohol, que provoca un aumento brusco en los valores, para luego, si no hay enfermedad hepática u otra causa farmacológica, disminuir hasta las cifras normales al cabo de seis a ocho semanas¹⁵. Por esto esta enzima es utilizada como marcador biológico para el abuso de alcohol, y resulta muy útil en el seguimiento de los pacientes que están recibiendo tratamiento de deshabitación, pues los niveles vuelven a elevarse en caso de reanudarse la ingesta, lo cual es muy ventajoso en el control de la abstinencia¹⁵⁻¹⁷.

El estudio de la actividad enzimática de la GGT se realiza manualmente por el método espectrofotométrico, donde la GGT cataliza la transferencia del grupo glutamilo de la L- γ -glutamyl-3-carboxi-p-nitroanilida (GLUPA C) a la glicilglicina, con la formación del ácido 5-amino-2-nitrobenzoico. El producto formado es proporcional a la actividad de la enzima presente en la muestra. Este juego de reactivos, producido nacionalmente por los Laboratorios HELFA del Finlay, refiere como interferencias (tabla 1) valores superiores de algunos metabolitos sanguíneos, como bilirrubina, colesterol, glucosa, hemoglobina y triglicéridos.

Tabla 1 Interferencias referidas por el juego de reactivos de los laboratorios HELFA del Finlay para la determinación de la actividad enzimática de la GGT.

Parámetros bioquímicos	Concentraciones
Bilirrubina	> 5,1 mmol/L
Colesterol	> 12,92 mmol/L
Hemoglobina	> 4 g/L
Triglicéridos	> 11,4 mmol/L

Por este motivo, sería de gran interés determinar, en primer lugar, si alguno de estos indicadores está por encima de los valores obtenidos mediante la aplicación del juego de reactivos, y cuáles son los más significativos que actúan como interferencias en la determinación de la GGT en nuestro laboratorio, a un grupo de pacientes alcohólicos, específicamente por ser esta una de las enfermedades crónicas no transmisibles que mayor número de órganos afecta, y comparar nuestros resultados con los obtenidos por el Analizador automático para química clínica (Hitachi).

Métodos

Se tomaron muestras de sangre a 30 pacientes alcohólicos en tratamiento de deshabitación, ingresados en el Hospital Psiquiátrico Provincial de Villa Clara. A cada uno se le registró la edad, sexo, medicamentos que toma en el momento de la extracción y fecha de la última ingestión de alcohol.

Al suero obtenido, se le determinó la actividad de la enzima GGT por el método cinético en espectrofotómetro, con el juego de reactivos para determinación de GGT en suero de los Laboratorios HELFA-Finlay y por el método *in vitro* para la determinación cuantitativa de la GGT en suero humano, con los analizadores automáticos de química clínica (Hitachi) de los laboratorios ROCHE. Por este último procedimiento, se analizaron, además, los siguientes parámetros: bilirrubina, fosfatasa alcalina, transaminasa glutámico-oxalacética (TGO), transaminasa glutámico-pirúvica (TGP), glucemia, urea, colesterol y triglicéridos, como criterio de exclusión para la investigación.

En la tabla 2 se refieren los intervalos de referencia de la GGT para ambos métodos de detección.

Tabla 2 Intervalos de referencia de la actividad enzimática de la GGT para ambos métodos de detección.

Método	Intervalos de referencia	
	Hombres	Mujeres
Cinético en espectrofotómetro (Laboratorios HELFA)	10 - 45 U/L	5 - 32 U/L
Analizador automático para química clínica (Laboratorios ROCHE)	8 - 61 U/L	5 - 36 U/L

Para la determinación de las interferencias, se realizó un análisis de regresión lineal, empleando el módulo correspondiente en el paquete estadístico STATISTICA 5.5. Se tomó como variable dependiente el nivel de GGT determinado por la técnica espectrofotométrica manual, y como variables independientes, los niveles de GGT determinados por el Analizador Químico Automático, así como una serie de variables tricotómicas que modelan los niveles del resto de los parámetros séricos determinados. En las mismas, se toma el valor de 0, si el parámetro a considerar es normal, 1 si está elevado y -1 si está por debajo de los niveles normales en sangre.

Resultados

Una vez aplicado el análisis de regresión lineal, se obtuvo la siguiente ecuación de regresión que consideramos como Modelo 1:

$$c(GGT)_{MANUAL} = 0,578 * c(GGT)_{HITACHI} - 512 * F.Alc - 52.5 * Urea + 35.35Col$$

$$R^2 = 0.967 \quad F(4,26) = 190.24 \quad p = 0,00001 \quad sd = 24,4$$

Al realizar un análisis de los valores fuera de rango (outliers) de estos pacientes, se observó la presencia de tres de los mismos por varios métodos de determinación. Al eliminar dichos

pacientes, el modelo tuvo una mejora significativa, y se obtuvieron los siguientes resultados, considerados como Modelo 2:

$$c(GGT)_{MANUAL} = 0,569 * c(GGT)_{HITACHI} - 495 * F.Alc - 71 * Urea$$

$$R^2 = 0,986 \quad F(3,24) = 582 \quad p = 0,00001 \quad sd = 15,5$$

Analizando los parámetros estadísticos de la ecuación del modelo 1, se aprecia que explica satisfactoriamente el 96,7 % de la varianza observada en la variable dependiente. Al analizar los valores de la prueba F para la significación del modelo, se comprueba que el mismo es altamente significativo ($p = 0,00001$); este presenta, además, un adecuado número de casos por variables ($30/4 = 7,5$) (tabla 3).

Tabla 3 Significación de las variables en el Modelo 1.

Variables	Por ciento de Varianza explicada por el Modelo	Por ciento de Varianza explicada por la última variable
GGT _{HIT} *	0,801	80,1
Fosfatasa alcalina	0,917	11,6
Urea	0,954	3,7
Colesterol	0,967	1,3

GGT_{HIT}: Obtenido en el analizador automático Hitachi.

Discusión

Al analizar las variables que forman parte del Modelo 1, se destaca la aparición de las que se relacionan con los niveles séricos de fosfatasa alcalina, urea y colesterol, y estos fueron los principales indicadores que interfieren en nuestra determinación.

En el caso del colesterol, los productores del juego de reactivos informaron que este parámetro puede interferir con la exactitud del método en concentraciones elevadas. No se encontraron referencias de interferencias relacionadas con la fosfatasa alcalina y la urea.

No se observó una mejoría significativa en los parámetros estadísticos del modelo por la adición de otras variables al mismo, lo que confirma la significación de dichos indicadores en la correlación realizada.

Del Modelo 2, resultado de la eliminación de tres valores fuera de rango, se aprecia, además, de la mejoría considerable de los parámetros estadísticos, la disminución en un 36,5 % del error de la determinación. Tomando estos valores, así como los de la media de las determinaciones, se observa una incertidumbre en la determinación de aproximadamente el 10 %, lo cual es bastante compatible con el tipo de determinación realizada. Resalta además en esta última ecuación, la ausencia del colesterol como parámetro influyente.

En la figura, se representan los valores observados y predichos por ambas ecuaciones, que demuestran la linealidad de las predicciones realizadas.

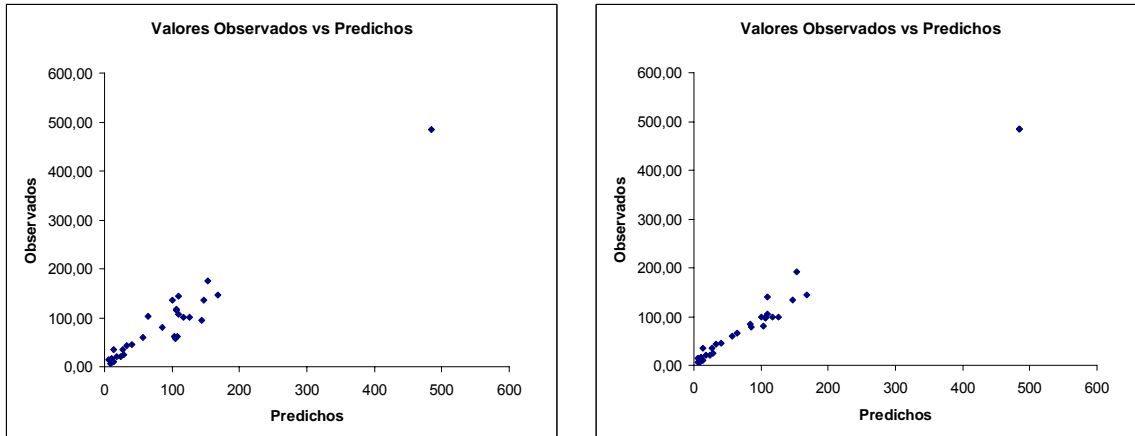


Figura Representa los valores observados contra predichos, según las ecuaciones con los valores fuera de rango (incluidos (izquierda) y al excluirlos (derecha)).

Se correlacionaron las concentraciones de GGT por las técnicas utilizadas, y se halló que existe una fuerte correlación (80 %) entre las mismas, por lo que pueden ser indistintamente utilizadas para determinar la actividad de la enzima.

Summary

Introduction: The gamma glutamyl transferase is a hepatic enzyme that increases its activity due to the presence of several illnesses and due to the enzymatic induction caused by some drugs, Alcohol ingestion produces an increase in the activity of this enzyme and reduces its value six or eight weeks after ingestion. This effect allows us to use gamma glutamyl transferase as a biological marker for alcoholism and to supervise the disaccustoming treatment in alcoholic patients. **Objective:** To determine the existence of interferences in our analysis concerning the different parameters in Clinical Chemistry. **Methods:** Samples from the serum of 30 hospitalized alcoholic patients that were receiving a disaccustoming treatment at the Provincial Psychiatric Hospital in Villa Clara were taken. These samples were submitted to an *in vitro* determination of the serum gamma glutamyl transferase using a kinetic method in a spectrophotometer and in an automatic analyzer of clinical chemistry (Hitachi). Additionally, the determinations of bilirubin, cholesterol, glycemia, urea, triglycerides, among others, were carried out in the above mentioned analyzer as an exclusion criterion for the research. A Lineal Regression Analysis using the corresponding module in the statistical package STATISTICA 5.5 was carried out with the aim of determining the interferences. **Results:** Analyzing the statistical parameters of the obtained equation, it was noticed that the model explains satisfactorily the 96,7% of the variance observed in the dependent variable. Among the variables forming part of such a model it was noticed the appearance of those related to serumal levels of alkaline phosphatase, urea and cholesterol. The manufacturers of the set of reactivities inform that cholesterol interferes with the accuracy of the result.

Referencias bibliográficas

1. Jyh-Chang J, Yue L, Joyce-Brady M. The importance of gamma-glutamyl transferase in lung glutathione homeostasis and antioxidant defense. *Bio Factors*. 2003;17:161-73.
2. Martínez M, Andrés D, Zubillaga M, Hager A, De Poli T, Boccio J. Conceptos actuales del metabolismo del glutatión. Utilización de isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta Bioquím Clin Latinoam*. 2006 Ene;40:60-74.
3. Zhang H, Forman HJ, Choi J. Gamma-glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis. *Methods Enzymol*. 2005;401:468-83.
4. Mayatepek E, Okun J, Meissner T, Assmann B, Hammond J, Zschocke J, et al. Synthesis and metabolism of leukotrienes in gamma-glutamyl transpeptidase deficiency. *J Lipid Res*. 2004;45:900-4.
5. Okada T, Suzuki HI, Wada K, Kumagai H, Keiichi F. Crystal structures of γ -glutamyl transpeptidase from *Escherichia coli*, a key enzyme in glutathione metabolism, and its reaction intermediate. *PNAS*. 2006;103(17):6471-6.
6. Keillor JW, Castonguay R, Lherbet C. Gamma glutamyl transpeptidase substrate specificity and catalytic mechanism. *Methods Enzymol*. 2005;401:449-69.
7. Ghany M, Hoofnagle LH. Estudio del paciente con enfermedad hepática. En: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser S, Longo DL, Jameson JL. *Harrison Principios de medicina Interna vol.2*. 16^{ta} ed. Madrid: McGraw-Hill; 2006. p. 1992-7.
8. Pratt DS, Kaplan MM. Estudio de la función hepática. En: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser S, Longo DL, Jameson JL. *Harrison Principios de medicina Interna vol.2*. 16^{ta} ed. Madrid: McGraw-Hill; 2006. p. 1998-2001.
9. Onat A, Hergenç G, Karabulut A, Türkmen S, Doğan Y, Uyare H, et al. Serum gamma glutamyl transferase as a marker of metabolic syndrome and coronary disease likelihood in nondiabetic middle-aged and elderly adults. *Preventive Medicine*. 2006 Aug;43(2):136-9.
10. Botton J, Heude B, Andre P, Bresson JL, Ducimetiere P, Charles MA. The FLVS Study Group. Relationship between gamma-glutamyl transferase and fat mass. *Diabetes Metab*. 2007 Nov; 33(5):354-9.
11. Lee H, Jacobs R, Gross D, Steffes M, Kiefe C, Roseman J, et al. Gamma glutamyl transferase is a predictor of incident diabetes and hypertension: the coronary artery risk development in young adults (CARDIA) study. *Clin Chem*. 2003;49:1358-66.
12. American Heart Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; © 2008. [updated 2005 Sept 28; cited 4 Feb 2006]. MediLexicon International Ltd; [about 3 screens]. Available from: <http://www.medicalnewstoday.com/articles/31213.php>
13. Whitfield JB. Serum-Glutamyl transferase and Risk of Disease. *Clinical Chem*. 2007;53:1-2.
14. Dufour Robert D. Guías del laboratorio clínico para screening, diagnóstico y monitoreo de la lesión hepática. *Acta Bioquím Clin Latinoam*. 2005 Jun;39:354-76.
15. Giannini EG, Testa R, Savarino V. Alteración de las enzimas hepáticas: Guía para médicos clínicos. *Canadian Med Ass J*. 2005 Feb;172(3):367-79.
16. Hietala J, Koivisto H, Anttila P, Niemela O. Comparison of combined marker GGT-CTD and the conventional laboratory markers of alcohol abuse in heavy drinkers, moderate drinkers and abstainers. *Alcohol Alcohol*. 2006 Sept;41(5):528-33.
17. Taracha E, Habrat B, Chrapusta SJ, Lehner M, Wislowska A, Woronowicz BT, et al. Combining markers of nephrotoxicity for improved monitoring and detection of chronic alcohol abuse. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(12):1446-52.