

## **DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE COLINESTERASA EN SANGRE ENTERA DE ANIMALES DOMÉSTICOS: FACTORES PRE Y ANALÍTICOS**

Spectrophotometric whole blood cholinesterase determination: preanalytical and analytical sources of variation

**F. Tecles, J.J. Cerón**

Departamento de Medicina y Cirugía Animal

Universidad de Murcia

30100 Espinardo (Murcia)

Telf: 968 36 70 82

Fax: 968 36 41 47

Correspondencia a: [ftecles@um.es](mailto:ftecles@um.es)

### **RESUMEN**

En el presente trabajo se describen aquellos factores pre y analíticos que pueden influir sobre la determinación de colinesterasa en sangre entera de animales domésticos, provocando variaciones en los resultados. La importancia que supone el conocimiento de estos factores radica en la posibilidad de controlarlos con el fin de optimizar la precisión y exactitud de los análisis.

### **ABSTRACT**

In this paper preanalytical and analytical factors that can affect whole blood cholinesterase determinations are described. Knowledge of these factors is important since their proper control allows to optimize the precision of cholinesterase assays.

**Key words:** Colinesterasa, variabilidad, sangre entera, factores preanalíticos, factores analíticos

### **INTRODUCCIÓN**

El término colinesterasa (ChE) hace referencia a una serie de enzimas que bajo óptimas

condiciones hidrolizan a los ésteres de la colina. Su principal función fisiológica tiene lugar en el tejido nervioso, donde juega un importante papel en la destrucción del neurotransmisor

Cuadro 1. Características principales de las enzimas con actividad colinesterasa

<b>Nombre común</b>	Acetilcolinesterasa Colinesterasa verdadera	Butirilcolinesterasa Pseudocolinesterasa
<b>Nombre sistemático</b>	Acetilcolina acetilhidrolasa (EC 3.1.1.7)	Acilcolina acilhidrolasa (EC 3.1.1.8)
<b>Lugar de síntesis</b>	Médula ósea	Hígado
<b>Localización</b>	Membrana de neuronas Membrana de eritrocitos	Plasma, hígado, músculo liso, intestino, páncreas, músculo cardíaco y tejido nervioso
<b>Función</b>	En tejido nervioso: eliminar exceso de acetilcolina En eritrocitos: desconocida	Desconocida
<b>Sustrato</b>	Acetilcolina, propionilcolina	Butirilcolina, propionilcolina y acetilcolina
<b>Inhibición por</b>	Alta concentración del sustrato Etilparatión Rivastigmina y fisostigmina	Tetraisopropilpirofosforamida Mevinfos Derivados fenotiazínicos

(Fuentes: Gage 1967; Wills 1972; Augustinsson *et al.* 1978; Harlin 1991; Sanz *et al.* 1991).

acetilcolina (ACh) a nivel de las sinapsis del sistema nervioso central y sistema nervioso periférico. No obstante, esta actividad enzimática también podemos encontrarla en otros muchos tejidos orgánicos, aunque su función en ellos permanece desconocida. Principalmente, existen dos enzimas con actividad colinesterasa: acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE). Esta clasificación está basada en la localización tisular de la enzima, la especificidad de sustrato, y en la susceptibilidad a inhibición por diferentes sustancias. Las características más importantes de cada una se describen en el cuadro 1.

Las enzimas con actividad colinesterasa pueden ser inhibidas por ciertos agentes químicos como los insecticidas organofosforados (OP) y carbamatos (CB), así como ciertos me-

tales pesados y detergentes (Guilhermino *et al.* 1998). Por ello, un nivel disminuido de actividad colinesterasa en tejidos de origen animal es un signo fuertemente indicativo de que se ha producido algún tipo de exposición a un agente inhibidor de esta enzima. El uso de la determinación laboratorial de colinesterasa como biomarcador está muy extendido, ya que es un método simple, rápido, barato y no invasivo, susceptible de ser automatizado en el laboratorio, y presenta como ventaja sobre la determinación directa de los contaminantes que no precisa de la utilización de sofisticados equipos. Además, los insecticidas son rápidamente degradados en el medio ambiente y metabolizados en los tejidos animales, lo que dificulta todavía más su detección directa (Hatch 1988).

La colinesterasa puede ser analizada en un gran número de tejidos orgánicos, pero su determinación en sangre entera ha demostrado presentar una serie de ventajas, como: la facilidad de obtención y manejo de las muestras, la posibilidad de analizar acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en la misma muestra sin necesidad de separar plasma y eritrocitos, la utilización de un volumen reducido de muestra, y la falta de interferencia de la hemólisis en los análisis espectrofotométricos (Tecles *et al.* 2000). Además, se evitan la baja reproducibilidad y sensibilidad que muestran las determinaciones de colinesterasa en eritrocitos (Wilson *et al.* 1996).

Los procedimientos analíticos desarrollados para la determinación de colinesterasa son muy diversos, pero los más empleados actualmente son los colorimétricos, que se basan en la detección de la tasa de desaparición del sustrato de la enzima o de aparición del producto de la reacción. La técnica espectrofotométrica más utilizada es el método de Ellman (Ellman *et al.* 1961), empleado tanto en sangre como en diversos tejidos (Fairbrother *et al.* 1989), así como en una gran cantidad de especies animales (Hill y Fleming 1982). Es además el procedimiento que más fácilmente se adapta al uso de analizadores automáticos (Humiston y Wright 1967). Se basa en la hidrólisis del sustrato acetiltiocolina (ATCh) por la enzima colinesterasa. La tiocolina liberada reacciona con un cromóforo, el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), dando lugar como producto de reacción al ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, compuesto de color amarillo cuyo máximo de absorbancia se encuentra entre 405 y 420 nm de longitud de onda, con un óptimo en 412 nm (Humiston y Wright 1967). La tasa de aparición del producto de la reacción es mayor conforme aumenta la actividad enzimática existente en la muestra. Una concentración elevada del cromóforo puede producir una inhibición de la enzima, por lo que la concentración recomendada de DTNB es de  $0,08 \times 10^{-3}$  M (Cerón *et al.* 1996; Dass *et al.* 1997).

Entre los mayores problemas que presenta la determinación de colinesterasa se encuentra la falta de unos parámetros analíticos estandarizados, pues los laboratorios de referencia suelen utilizar modificaciones del método de Ellman y preparar sus propios reactivos, mientras que otros prefieren emplear kits comerciales (Wilson *et al.* 1997), lo que da lugar a una falta de homogeneidad en los resultados. Así, en estudios desarrollados por Harlin y Ross (1990), Christenson *et al.* (1994) y Marden *et al.* (1994) se encontraron unos coeficientes de variación (CVs) superiores a un 20% cuando se compararon resultados obtenidos por distintos laboratorios que analizaron una misma serie de muestras. Por tanto, los posibles cambios y modificaciones de los parámetros de medida constituyen fuentes de variación analíticas, cuyo conocimiento y control posee gran importancia de cara a mejorar la calidad y precisión de los resultados, así como a permitir la realización de comparaciones entre laboratorios distintos.

Otro problema que contribuye a la falta de homogeneidad de los resultados es el manejo inadecuado de las muestras previo a su análisis, sobre todo en lo referente a las condiciones de almacenamiento (Wilson *et al.* 1997). Estos factores constituyen fuentes de variación preanalíticas, que actúan al margen de las condiciones analíticas empleadas pero que también son susceptibles de provocar cambios en los resultados, y por tanto deben ser controladas.

A continuación se describirán, de forma breve y resumida, las diversas condiciones que pueden constituir una fuente de variación, afectando a la determinación de colinesterasa mediante métodos espectrofotométricos.

### **Fuentes de variación preanalíticas**

Se producen en la fase previa a la realización del análisis de la muestra. Se incluyen variaciones debidas al paciente (variabilidad biológica) y a la obtención y manejo de la muestra.

**Cuadro 2. Causas de variabilidad biológica en la actividad colinesterasa sanguínea**

<b>Edad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AChE reducida en neonatos</li> <li>• BChE reducida en cobaya y rata jóvenes</li> <li>• BChE incrementada en ovino y caprino jóvenes</li> </ul>
<b>Sexo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BChE reducida en hembra de cobaya y vacuno</li> <li>• BChE incrementada en hembra de ratón y rata</li> <li>• BChE similar en hembra y macho de equino, porcino, caprino, canino, felino, criceto, conejo y humano</li> </ul>
<b>Estado reproductivo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BChE incrementada en: <ul style="list-style-type: none"> <li>- rata: segunda mitad de gestación</li> <li>- especie humana: menopausia</li> </ul> </li> <li>• BChE reducida en: <ul style="list-style-type: none"> <li>- especie humana: menstruación</li> <li>- rata: primera mitad de gestación, parto y lactación</li> </ul> </li> </ul>
<b>Estados patológicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AChE incrementada con altitud y reticulocitosis</li> <li>• AChE reducida en anemia, leucemia y mieloma</li> <li>• BChE incrementada en insuficiencia renal, hipertiroidismo, diabetes e hipertrigliceridemia</li> <li>• BChE reducida en insuficiencia hepática, cáncer y caquexia</li> </ul>

(Fuentes: Beveridge y Lucas 1941; Sawyer y Everett 1946; Wills 1972; Ecobichon y Coumeau 1973; Chow y Ecobichon 1975; Sidell y Kaminskis 1975; Bell y VanPetten 1976; Anderson 1983; Haas *et al.* 1983; Mount 1984; Lepage *et al.* 1985; Cove *et al.* 1986; Harlin 1991)

### *Variabilidad biológica*

La variabilidad biológica es aquella que depende de forma implícita del individuo. Puede dividirse en dos grupos: variabilidad interindividual e intraindividual. La variabilidad interindividual se da entre individuos de una misma especie, y puede llegar a suponer hasta un 30% de la actividad colinesterasa (Munro *et al.* 1991).

La variabilidad intraindividual se produce por factores relacionados con el estado fisiológico del animal, como pueden ser la edad, el sexo, el estado reproductivo y la salud del individuo. En lo referente a la edad de los animales, género y estado reproductivo, parece ser que afectan más a la actividad colinesterasa plasmática que a la eritrocitaria (Mount 1984).

Por este motivo, serían de poca importancia para los rumiantes, donde la isoenzima eritrocitaria supone el 80-90% de la actividad colinesterasa total de la sangre (Munro *et al.* 1991). El cuadro 2 recoge de forma resumida los diferentes estudios realizados sobre el efecto que determinados estados fisiológicos de los animales pueden provocar sobre la actividad colinesterasa en sangre.

### *Efecto de la hemólisis*

Cuando se utiliza sangre entera para determinar la actividad colinesterasa mediante el método de Ellman, las muestras deben ser diluidas antes de ser analizadas. El objetivo de esta dilución consiste en disminuir la concen-

tración de hemoglobina en el medio de reacción, ya que su alta concentración provoca un elevado pico de absorbancia que enmascara cualquier cambio ocurrido durante la reacción (Willig *et al.* 1996). Los diluyentes que se han empleado hasta ahora se pueden dividir en dos grupos:

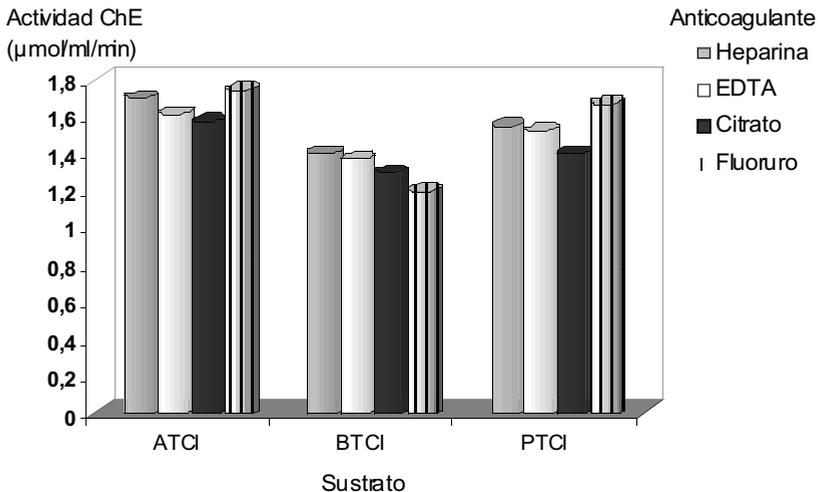
- diluyentes que provocan hemólisis de la muestra, como el agua destilada, el detergente no iónico Tritón X-100, y la saponina;
- diluyentes no hemolizantes como la solución salina isotónica, tampón fosfato 0,1 M y la albúmina sérica bovina.

Es preferible el empleo de diluyentes hemolizantes, ya que proporcionan mayor precisión a la determinación de colinesterasa en sangre y permiten detectar una actividad enzimática más elevada. Esto se debe a que con la hemólisis la enzima queda liberada de su unión a la membrana del eritrocito (Tarrab-Hazdai *et al.* 1984), por lo que se consigue una mayor solubilización y una distribución más homogé-

nea en el medio de reacción, y a que se evita la interferencia provocada por el movimiento de sedimentación de los eritrocitos (Cerón *et al.* 1999). El único inconveniente que presenta el empleo de diluyentes hemolizantes consiste en que el glutatión, que se encuentra en el interior de los eritrocitos, se libera tras la hemólisis al medio de reacción. La molécula de glutatión contiene grupos sulfhidrilo que pueden reaccionar con el cromóforo dando lugar a un falso incremento en la actividad de la enzima (Tietze 1969; Dass *et al.* 1994). No obstante, este problema puede evitarse utilizando un blanco adicional compuesto por cromóforo y muestra en ausencia del sustrato.

#### *Empleo de diferentes anticoagulantes*

Cuando se determina la actividad colinesterasa en muestras de sangre entera, es necesaria la utilización de anticoagulantes. La figura 1 muestra la actividad colinesterasa en una misma serie de muestras de sangre entera de perro ob-



**Figura 1. Efecto de diferentes anticoagulantes en la determinación de colinesterasa en sangre entera con tres sustratos.** La actividad colinesterasa se expresa como  $\mu\text{mol}$  de sustrato hidrolizados/ml de sangre/minuto. ChE (colinesterasa); ATCI (acetiltiocolina); BTCI (butiriltiocolina); PTCI (propioniltiocolina). (Fuente: Tecles *et al.* 2002).

tenidas con cuatro anticoagulantes diferentes: heparina, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), citrato sódico y fluoruro sódico (Tecles *et al.* 2002). En base a estos datos se deduce que tanto la heparina como el EDTA pueden ser utilizados para la determinación de colinesterasa en sangre entera, ya que no afectan a la actividad de la enzima. Sin embargo, se desaconseja el uso de fluoruro sódico al provocar una leve inhibición de la actividad butirilcolinesterasa. Este efecto del fluoruro sódico fue descrito en trabajos anteriores, aunque en ellos se detectó una inhibición mucho más marcada y rápida (Jones 1985; Klette *et al.* 1993)

#### *Estabilidad de la enzima en muestras almacenadas*

Normalmente se ha indicado que las muestras de sangre deben ser mantenidas en refrigeración o en hielo picado desde que son obtenidas hasta que son analizadas en el laboratorio (Witter 1963). Estudios más recientes indican que el mantenimiento a temperatura ambiente también puede ser adecuado cuando transcurre poco tiempo desde la obtención de la muestra hasta su análisis, pero no cuando se precisa de un almacenamiento prolongado (Tecles *et al.* 2002). En general, la capacidad de conservación de la colinesterasa de la sangre a largo plazo parece depender no sólo de las condiciones de almacenamiento empleadas, sino también de la especie animal. De este modo, se ha observado que si bien la conservación a  $-20^{\circ}\text{C}$  proporciona estabilidad durante más tiempo a la colinesterasa de la sangre canina y ovina, en la especie equina es preferible la refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$  (cuadro 3) (Tecles *et al.* 2002). Algo similar a lo que ocurre con la sangre equina fue descrito para la especie bovina, indicando que las variaciones de temperatura que se producen en el interior de los congeladores puede afectar a la estabilidad de la enzima (Halbrook *et al.* 1992).

Como se ha visto anteriormente, la dilución de las muestras de sangre es necesaria para la

### **Cuadro 3. Estabilidad óptima de la colinesterasa en sangre entera en diferentes especies animales**

Especie	Estabilidad óptima
Canina	Hasta 1 mes a $-20^{\circ}\text{C}$
Equina	Hasta 6 meses a $4^{\circ}\text{C}$
Bovina	Hasta 7 meses a $4^{\circ}\text{C}$
Caprina	Hasta 6 meses a $-20^{\circ}\text{C}$

(Fuentes: Halbrook *et al.* 1992; Tecles *et al.* 2002).

determinación espectrofotométrica de la colinesterasa, por lo que la estabilidad de las muestras ya diluidas también debe tenerse en cuenta. Así por ejemplo, la sangre humana diluida y congelada resulta más estable a largo plazo que la no diluida, por lo que se ha llegado a utilizar como control de actividad colinesterasa (Meuling *et al.* 1992). En la sangre de las especies canina, equina y ovina la estabilidad de la colinesterasa a  $-20^{\circ}\text{C}$  resultó similar entre las muestras diluidas y no diluidas; sin embargo, a  $25^{\circ}\text{C}$  y  $4^{\circ}\text{C}$  las muestras diluidas perdieron rápidamente su actividad colinesterasa (Tecles *et al.* 2002).

#### **Fuentes de variación analíticas**

Son las que implican al propio método analítico. Entre los factores que describiremos a continuación tenemos la temperatura y pH del medio de reacción, los reactivos empleados (cromóforos y sustratos) así como la concentración y estabilidad de los mismos, y los ciclos de lectura de absorbancia.

#### *Efecto de la temperatura de reacción*

Al igual que en otras determinaciones enzimáticas, la actividad colinesterasa es dependiente de la temperatura (figura 2), y en los mamíferos alcanza su máxima actividad entre  $37^{\circ}\text{C}$  y  $40^{\circ}\text{C}$  (Witter 1963). La mayoría de los autores recomiendan emplear una temperatura

Actividad ChE  
( $\mu\text{mol}/\text{m}/\text{min}$ )

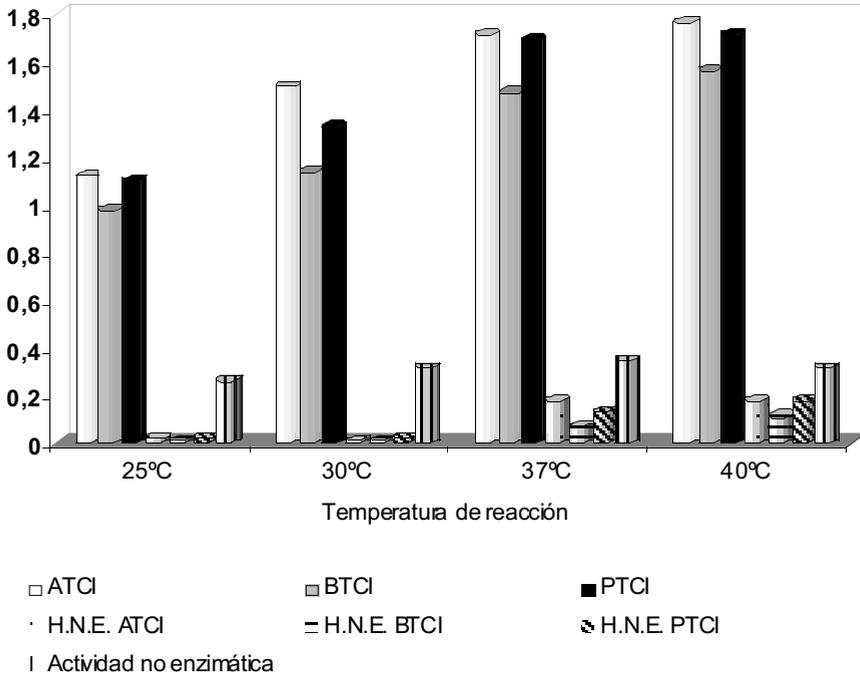


Figura 2. Efecto de diferentes temperaturas en la determinación de colinesterasa en sangre entera de perro con tres sustratos. La actividad colinesterasa se expresa como  $\mu\text{mol}$  de sustrato hidrolizados/ml de sangre/minuto. ChE (colinesterasa); ATCI (acetiltiocolina); BTCI (butiriltiocolina); PTCI (propioniltiocolina); H.N.E. ATCI (hidrólisis no enzimática de acetiltiocolina); H.N.E. BTCI (hidrólisis no enzimática de butiriltiocolina); H.N.E. PTCI (hidrólisis no enzimática de propioniltiocolina). (Fuente: Tecles *et al.* 2002).

de reacción de 37° C (Humiston y Wright 1967; Wilson *et al.* 1996; Dass *et al.* 1997; Winters *et al.* 1997; Tecles *et al.* 2002), ya que si se utilizan temperaturas más reducidas se produce un descenso en la actividad colinesterasa (Lewis *et al.* 1981), mientras que temperaturas superiores a 40° C pueden provocar la desnaturalización de la enzima (Silver 1974). Sin embargo, si la colinesterasa se encuentra inhibida por la acción de un inhibidor reversible (carbamatos), una temperatura de reacción de 37° C puede provocar la reactivación de la enzima, por lo que en estos casos sería recomendable realizar

las determinaciones a 25° C (Nostrandt *et al.* 1993; Tecles *et al.* 2001).

#### Efecto del pH del medio de reacción

El pH afecta a la capacidad del centro activo de la enzima para realizar un ataque nucleofílico sobre el sustrato, y de esta forma llevar a cabo su función. Esto hace que la actividad enzimática dependa de forma directa del pH (Fairbrother *et al.* 1991). En el caso de la colinesterasa, la actividad óptima se alcanza en un intervalo de pH que oscila entre 8,0 y 8,5. No obstante, no se

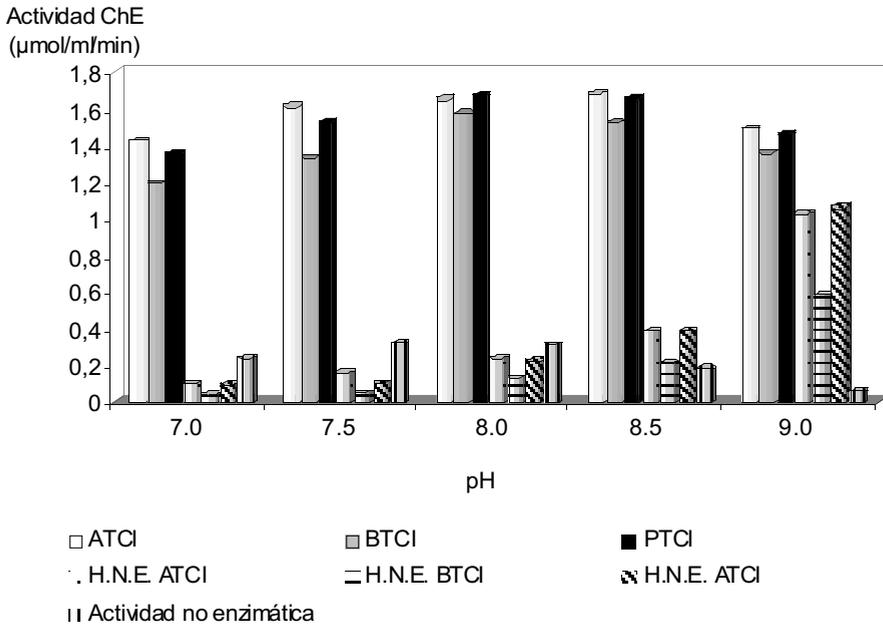


Figura 3. Efecto del pH en la determinación de colinesterasa en sangre entera de perro con tres sustratos. La actividad colinesterasa se expresa como  $\mu\text{mol}$  de sustrato hidrolizados/ml de sangre/minuto. ChE (colinesterasa); ATCI (acetiltiocolina); BTCI (butiriltiocolina); PTCI (propioniltiocolina); H.N.E. ATCI (hidrólisis no enzimática de acetiltiocolina); H.N.E. BTCI (hidrólisis no enzimática de butiriltiocolina); H.N.E. PTCI (hidrólisis no enzimática de propioniltiocolina). (Fuente: Tecles *et al.* 2002).

aconseja emplear un valor de pH tan elevado, ya que se produce una hidrólisis espontánea de los sustratos que eleva el valor del blanco y puede disminuir de forma notable la sensibilidad del análisis, sobre todo si el pH excede de 7,5 (figura 3) (Tecles *et al.* 2002). Así, la mayoría de los autores emplean un pH que oscila entre 7,0 (Ellman *et al.* 1961; Lewis *et al.* 1981; Tor *et al.* 1994) y 8,0 (Harlin 1991; Halbrook *et al.* 1992). Para la sangre canina no se describe una excesiva diferencia entre los resultados de actividad colinesterasa obtenidos a pH 7,5 y 8,0 (figura 3), por lo que se recomienda la utilización de un valor de pH de 7,5 (Tecles *et al.* 2002). Sería recomendable ampliar estos estudios para determinar el pH óptimo que se debería utilizar en función de la especie animal.

#### Empleo de diferentes cromóforos

Aunque el método de Ellman puede ser fácilmente utilizado para la determinación de colinesterasa en sangre entera, su uso está limitado por la similar longitud de onda de máxima absorbancia existente entre el producto de la reacción y la hemoglobina presente en la muestra (Augustinsson *et al.* 1978). El empleo de cromóforos diferentes al DTNB tiene como objetivo la obtención de un producto de reacción entre el cromóforo y la tiocolina que posea un máximo de absorbancia alejado del espectro de la hemoglobina, y de este modo evitar su interferencia. Tal es el caso de la 2,2'-ditiodipiridina (2-PDS), cuyo producto de reacción con la tiocolina, la 2-tiopiridona, posee su máxima

**Cuadro 4. Ventajas e inconvenientes del empleo de distintos cromóforos para la determinación de colinesterasa en sangre entera**

Cromóforo	Ventajas	Inconvenientes
<b>DTNB</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utiliza la región visible del espectro.</li> <li>• Es rápido, permitiendo detectar inhibición por inhibidores reversibles.</li> <li>• Fácilmente automatizable.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensible a la luz.</li> <li>• Interferencia con la hemoglobina a 412 nm.</li> <li>• Necesaria dilución de las muestras de sangre.</li> <li>• Reacciona con glutatión.</li> </ul>
<b>2-PDS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede utilizarse en sangre entera, permitiendo el uso de muestras más concentradas.</li> <li>• No es sensible a la luz.</li> <li>• Permite utilizar un amplio rango de pH.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacciona con glutatión.</li> <li>• Inhibe colinesterasa a alta concentración.</li> </ul>
<b>DTNA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede ser utilizado en sangre entera, permitiendo el uso de muestras más concentradas.</li> <li>• No es sensible a la luz.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacciona con glutatión.</li> <li>• Inhibición de colinesterasa a alta concentración.</li> <li>• Difícil solubilización en soluciones tamponadoras.</li> </ul>
<b>4-PDS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor sensibilidad.</li> <li>• Pueden ser utilizados sobre sangre entera, permitiendo el uso de muestras más concentradas.</li> <li>• No son sensibles a la luz.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacciona con glutatión.</li> <li>• Longitud de onda fuera del espectro visible.</li> </ul>

(Fuentes: Grasseti y Murray 1967; Humiston y Wright 1967; Brownson y Watts 1973; Augustinsson y Eriksson 1974; Dass *et al.* 1994; Willig *et al.* 1996; Dass *et al.* 1997).

absorbancia a 343 nm de longitud de onda. Cuando la hemoglobina deja de suponer un inconveniente, es posible utilizar diluciones de sangre inferiores (Tecles y Cerón 2001), lo que permite minimizar la reactivación de la colinesterasa (Wills 1972). La escasa solubilidad del 2-PDS en las soluciones tamponadoras puede salvarse realizando una dilución previa del cromóforo en un volumen reducido de metanol. La concentración ideal de este cromóforo fue determinada por Cerón *et al.* (1996) en  $0,08 \times 10^{-3}$  M, aunque estudios anteriores indicaron que una concentración superior a  $0,05 \times 10^{-3}$  M podía provocar

la inhibición de la enzima (Augustinsson y Eriksson 1974).

El ácido 6,6'-ditiudinicotínico (DTNA) fue utilizado por primera vez por Brownson y Watts (1973), y posteriormente por Dass *et al.* (1994) y Willig *et al.* (1996). El producto de reacción del DTNA con la tiocolina, el ácido 6-mercaptotínico, posee su máxima absorbancia a 340 nm de longitud de onda. La concentración óptima de este cromóforo fue determinada por Dass *et al.* (1997) entre  $0,125$  y  $0,25 \times 10^{-3}$  M, ya que concentraciones más altas provocan una inhibición de la enzima. El principal inconveniente

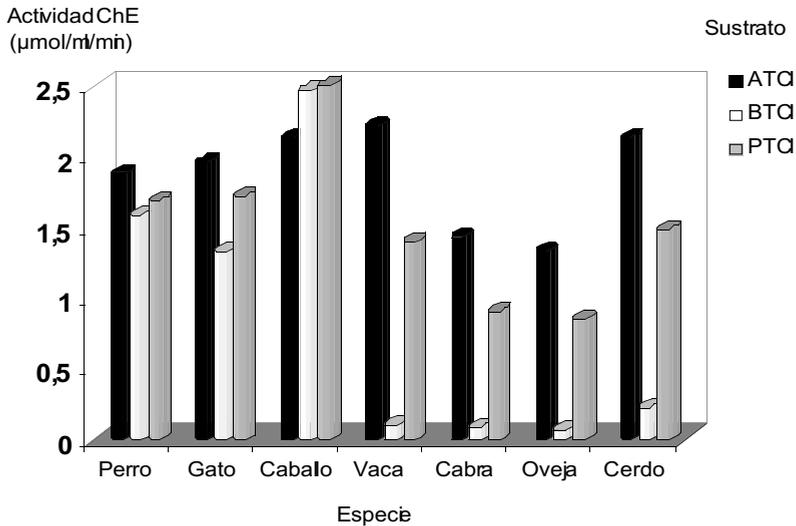


Figura 4. **Actividad colinesterasa (ChE) en sangre entera de siete especies animales con tres sustratos distintos: acetiltiocolina (ATCI), butiriltiocolina (BTCI) y propioniltiocolina (PTCI).** La actividad colinesterasa se expresa como  $\mu\text{mol}$  de sustrato hidrolizados/ml de sangre/minuto. (Fuente: Tecles y Cerón 2001).

que presenta este cromóforo es su baja solubilidad en soluciones tamponadoras y alcohólicas, por lo que la preparación del reactivo para su uso requiere de calor y agitación constante (Willig *et al.* 1996; Tecles y Cerón 2001).

El cromóforo 4,4'-ditiodipiridina (4-PDS), tras su reacción con la tiocolina, da lugar a 4-tiopiridona, cuya máxima absorbancia se encuentra a 324 nm de longitud de onda. La absorbancia de la 4-tiopiridona a 324 nm es casi tres veces mayor que la de la 2-tiopiridona a 343 nm, por lo que su uso confiere mayor sensibilidad al ensayo. La concentración de este cromóforo puede oscilar entre 0,1 y  $0,25 \times 10^{-3}$  M (Grassetti y Murray 1967). El inconveniente que presenta el empleo de este reactivo es que la longitud de onda a utilizar se encuentra fuera del espectro visible, por lo que se necesita de lámparas de cuarzo que no suelen estar presentes en los autoanalizadores bioquímicos disponibles en el mercado (Dass *et al.* 1994).

El cuadro 4 muestra las ventajas e inconvenientes del uso de estos cromóforos.

#### *Tipo de sustrato*

Existen discrepancias a la hora de recomendar la determinación de acetilcolinesterasa (AChE) o de butirilcolinesterasa (BChE) para monitorizar la exposición a agentes inhibidores. La AChE se considera más representativa de la enzima del tejido nervioso. Por otra parte, de forma general se admite que la BChE es más sensible a los OP que la AChE; aunque presenta como inconvenientes una mayor variabilidad entre individuos, que su actividad se recupera antes que la de AChE, y que puede verse inhibida en mayor grado antes de la aparición de los signos clínicos (Iyaniwura 1991; Winters *et al.* 1997).

De forma general se recomienda determinar tanto AChE como BChE en una misma muestra de sangre entera, ya que la inhibición de una u otra enzima depende en gran medida de las características químicas del compuesto inhibidor (Wills 1972). Así por ejemplo, existen insecticidas organofosforados como el coumafos que

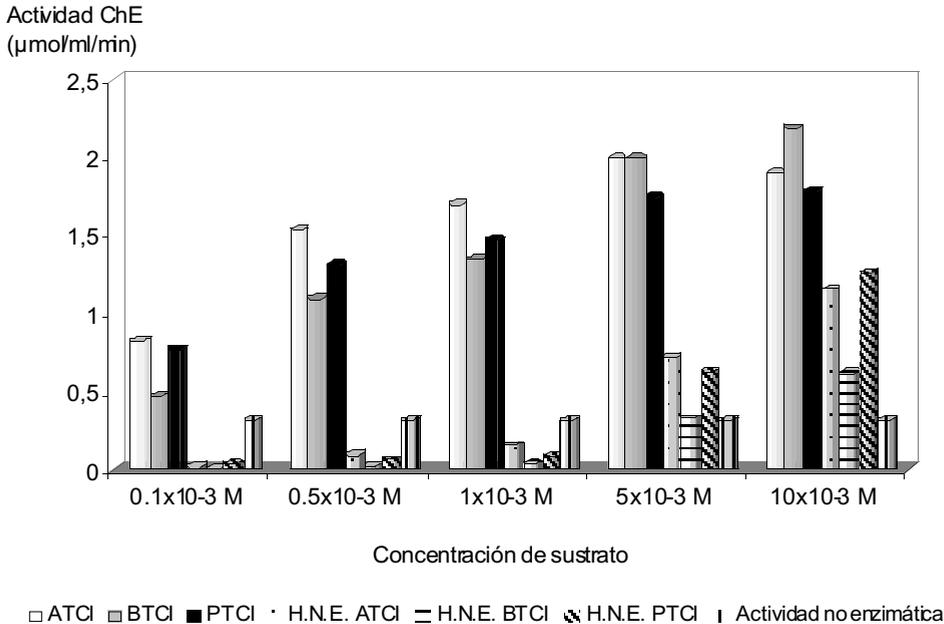


Figura 5. Efecto de la concentración de sustrato en la determinación de colinesterasa en sangre entera de perro con tres sustratos. La actividad colinesterasa se expresa como  $\mu\text{mol}$  de sustrato hidrolizados/ml de sangre/minuto. ChE (colinesterasa); ATCl (acetiltiocolina); BTCl (butiriltiocolina); PTCl (propioniltiocolina); H.N.E. ATCl (hidrólisis no enzimática de acetiltiocolina); H.N.E. BTCl (hidrólisis no enzimática de butiriltiocolina); H.N.E. PTCl (hidrólisis no enzimática de propioniltiocolina). (Fuente: Tecles *et al.* 2002).

inhiben tanto AChE como BChE (esta última con mayor intensidad), mientras que otros insecticidas como el carbamato dipropionato de imidocarb inhibe principalmente AChE (Tecles *et al.* 2000). De esta forma, en caso de exposición a un inhibidor selectivo, la determinación de una sola de estas enzimas podría enmascarar el proceso.

La determinación de AChE y BChE en una misma muestra de sangre entera puede realizarse de dos formas:

A) Utilizando inhibidores específicos para una de las enzimas, como es el caso de la iso-OMPA (tetraisopropilpirofosforamida) o los derivados fenotiazínicos como inhibidores selectivos de BChE (Augustinsson *et al.* 1978). La muestra se analiza para obtener la actividad ChE

total, y posteriormente se incubaba con el inhibidor y se analiza de nuevo, determinando así la enzima no inhibida. De la diferencia de ambas se consigue la actividad de la enzima inhibida.

B) Mediante el empleo de sustratos específicos para cada una de las enzimas (Khan *et al.* 1988).

Este último se apoya en la existencia de diferencias en cuanto a la especificidad de sustrato, y ha sido recomendado por la British Association of Clinical Biochemistry (1980) y por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (1987). Así, la acetilcolinesterasa hidroliza principalmente acetilcolina (ACh) en mayor o similar grado que propionilcolina (PCh), mientras que la butirilcolina (BCh) no es hidrolizada. La butirilcolinesterasa hidroliza BCh en mayor gra-

do que PCh, mientras que la ACh es hidrolizada muy lentamente (Dass *et al.* 1994). Aunque este método no sea del todo exacto, ya que la butirilcolinesterasa también es capaz de hidrolizar ACh en menor grado, es preferible al uso de inhibidores específicos por la importancia que supone la utilización de un sustrato óptimo o adecuado para cada enzima (Wilson *et al.* 1997). Además, su simplicidad permite una fácil automatización y aplicación rutinaria en el laboratorio.

No obstante, una correcta utilización de este método implica necesariamente la realización de estudios de caracterización de la actividad ChE en sangre entera de las diferentes especies animales. Los estudios de caracterización realizados en la especie humana recomiendan la determinación de AChE y BChE en una misma muestra de sangre entera utilizando los sustratos acetiltiocolina (ATCh) y butiriltiocolina (BTCh), respectivamente (Meuling *et al.* 1992). Sin embargo, las conclusiones obtenidas en este trabajo no se pueden aplicar a Veterinaria, ya que la capacidad de hidrólisis de estos sustratos por las diferentes enzimas de la sangre varía en función de la especie animal (Dass *et al.* 1994). La figura 4 muestra la actividad colinesterasa de la sangre de varias especies animales, que se clasifican en tres grupos atendiendo a su afinidad por los diferentes sustratos (Tecles y Cerón 2001):

- el primer grupo incluye a las especies canina y felina, que poseen elevada afinidad por el sustrato ATCh, y en menor grado por BTCh y PTCh.
- el segundo grupo comprende a la especie equina, que hidroliza los sustratos PTCh y BTCh, y en menor grado de ATCh.
- el tercer grupo incluye a las especies bovina, ovina, caprina y porcina, que se caracterizan por una elevada afinidad por ATCh, siendo muy escasa o nula para BTCh.

Parece ser que la causa de esta distribución es la presencia de actividad butirilcolinesterasa

en el plasma. Así, las especies canina, felina y equina presentan una elevada actividad butirilcolinesterasa en el plasma, mientras que en los rumiantes y en el cerdo la actividad ChE del plasma es casi inexistente.

#### *Concentración de sustrato*

El comportamiento de la colinesterasa de la sangre puede sufrir variaciones en función de la concentración del sustrato (figura 5). En la especie humana, la máxima actividad se obtiene con una concentración de ATCh de  $1 \times 10^{-3}$  M (Wilson *et al.* 1997). Sin embargo, en la especie canina esta concentración se ha estimado en  $5 \times 10^{-3}$  M, y una concentración más elevada ( $10 \times 10^{-3}$  M) produce una inhibición de la enzima (Tecles *et al.* 2002). Por el contrario, no se describe inhibición de la colinesterasa sanguínea humana (Wilson *et al.* 1997) o canina (Tecles *et al.* 2002) cuando se emplean concentraciones de BTCh de hasta  $10 \times 10^{-3}$  M, por lo que podrían utilizarse concentraciones incluso mayores. En el caso del sustrato propioniltiocolina (PTCh) la máxima actividad en la sangre canina se obtiene a  $5 \times 10^{-3}$  M, sin describirse inhibición al emplear concentraciones superiores (Tecles *et al.* 2002).

La hidrólisis espontánea del sustrato se incrementa de forma considerable cuando su concentración en el medio de reacción supera  $1 \times 10^{-3}$  M (Tecles *et al.* 2002). Si este aumento es lo suficientemente elevado, puede enmascarar cambios de poca magnitud en la absorbancia, lo que restaría sensibilidad al análisis. Por tanto, se ha recomendado utilizar una concentración de  $1 \times 10^{-3}$  M con los sustratos ATCh, BTCh y PTCh, ya que proporciona elevada actividad y escasa hidrólisis espontánea (Tecles *et al.* 2002). No obstante, las concentraciones recomendadas y empleadas por los diferentes autores son muy diversas: para la ATCh  $0,49 \times 10^{-3}$  M (Ellman *et al.* 1961; Harlin y Ross 1990; Halbrook *et al.* 1992), y entre  $4,5$  y  $5 \times 10^{-3}$  M (Knedel y Bottger 1967; Meuling *et al.* 1992; Marden *et al.* 1994);

para la BTCh entre  $1 \times 10^{-3}$  M (Singh 1985) y  $7 \times 10^{-3}$  M (Meuling *et al.* 1992).

#### *Efecto de variaciones en el número y duración de los ciclos de lectura*

El número de lecturas de absorbancia realizadas durante la reacción (ciclos) y intervalo de tiempo existente entre lecturas influyen en el resultado final. Así, para analizar la actividad colinesterasa en sangre canina debe emplearse un mínimo de 4 ciclos de lectura, ya que con 3 ciclos se produce un descenso de actividad. De la misma forma, si la duración entre ciclos es de 15 segundos se observa un descenso de actividad, por lo que se debe emplear un tiempo no inferior a 30 segundos, pudiendo ser de incluso 60 o 90 segundos (Tecles 1998). La precisión del ensayo no se modifica al utilizar ciclos de mayor o de menor duración.

#### *Estabilidad de los reactivos*

Los sustratos ATCh, BTCh y PTCh permanecen estables durante un periodo de tiempo de tres meses cuando se conservan a  $-20^{\circ}$  C (Lewis *et al.* 1981; Tecles *et al.* 2002). A  $4^{\circ}$  C pueden almacenarse durante un máximo de 2 semanas sin que se altere su capacidad para la determinación de colinesterasa. En cuanto a los cromóforos 2-PDS y DTNB resultan estables al menos durante 3 meses en congelación, refrigeración e incluso a temperatura ambiente (Tecles *et al.* 2002). Esto va a incrementar la sencillez y el rendimiento económico de la preparación, por parte del laboratorio, de sus propios reactivos.

### CONCLUSIÓN

Existe un alto número de factores pre y analíticos con capacidad de influir en la determinación colorimétrica de colinesterasa en sangre entera. Además, el efecto de algunos de ellos sobre los resultados pueden variar en función de la especie animal analizada. Por tanto, se hace

necesario un conocimiento exhaustivo de estos factores con el fin de poder controlar su influencia y optimizar tanto la precisión como la exactitud de los análisis.

### REFERENCIAS

- Anderson P. 1983. Studies on the toxicity of certain organophosphorus pesticides in ruminants with special reference to differences in their mode of action. Tesis doctoral. Universidad de Londres, Reino Unido.
- Augustinsson K.B., Eriksson H. 1974. The effect of two disulphides on cholinesterase activity in the spectrophotometric assay. *Biochem. J.* 139: 123-127.
- Augustinsson K.B., Eriksson H., Fajersson Y. 1978. A new approach to determining cholinesterase activities in samples of whole blood. *Clin. Chim. Acta* 89: 239-252.
- Bell J.V.; Van Petten G.R. 1976. Characterization of maternal and fetal ovine plasma cholinesterase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 35: 147-155.
- Beveridge J.M.R.; Lucas C. C. 1941. A note on serum cholinesterase variability in male and female rats. *Science* 93: 256-357.
- British Association of Clinical Biochemistry. 1980. Proposed methods for determination of some enzymes in blood serum. *News Sheet Assoc. Clin. Biochem.* 202: 31s.
- Brownson C., Watts D.C. 1973. The modification of cholinesterase activity by 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) included in the coupled spectrophotometric assay. *Biochem. J.* 131: 369-374.
- Cerón J.J., Fernández M.J., Bernal L., Gutiérrez C. 1996. Automathed spectrophotometric method using 2,2'-Dithiodipyridine acid for determination of ChE in whole blood. *J. AOAC Int.* 79: 757-763.
- Cerón J.J., Tecles F., Espín J.C. 1999. Comparison of different diluents and chromophores for spectrophotometric

- determination of livestock blood cholinesterase activity. *Res. Vet. Sci.* 67: 261-266.
- Chow A. Y. K.; Ecobichon D. J. 1975. Perinatal development of avian plasma, hepatic and renal esterases. *Biol. Neonate* 25: 23-30.
- Christenson W.R., Van Goethem D.L., Schroeder R.S., Wahle B.S., Dass P.D., Sangha G.K., Thyssen J.H. 1994. Interlaboratory cholinesterase determinations and the effect on the results of statistical evaluation of cholinesterase inhibition. *Toxicol. Letters* 71: 139-150.
- Cove M.J.; Lowe J.A.; Maddy K.T. 1986. Biological monitoring of agricultural workers exposed to pesticides. Cholinesterase activity determinations. *J. Occup. Med.* 28: 619-627.
- Dass P., Mejia M., Landas M., Jones R., Stuart B., Thyssen J. 1994. Cholinesterase: Review of methods. *Clin. Chem.* 34: 135-157.
- Dass P.D., Offutt D.M., Mejia M.B., Van Goethem D., Christenson W.R., Landes M.M., Stuart B.P., Sangha G.K., Thyssen J.H. 1997. Comparative kinetic analysis of cholinesterase methods in rat and human erythrocytes and plasma. *Vet. Hum. Toxicol.* 39: 11-17.
- Ecobichon D.J.; Coumeau A.M. 1973. Pseudocholinesterases of mammalian plasma: physicochemical properties and organophosphate inhibition in eleven species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 24: 92-100.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.
- Fairbrother A., Bennett R.S., Bennett J.K. 1989. Sequential sampling of plasma cholinesterase in mallards (*Anas platyrhynchos*) as an indicator of exposure to cholinesterase inhibitors. *Environ. Toxicol. Chem.* 8: 117-122.
- Fairbrother A., Marden B.T., Bennett J.K., Hooper M.J. 1991. Methods used in determination of cholinesterase activity. En: *Cholinesterase-inhibiting Insecticides. Their impact on Wild Life and the Environment*, pp. 35-71. Eds. Mineau P. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 348.
- Gage J.C. 1967. The significance of blood cholinesterase activity measurements. *Residue Review* 18: 159-173.
- Grassetti D.R., Murray J.F. 1967. Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiopyridine. *Arch. Biochem. Biophys.* 119: 41-49.
- Guilhermino L., Barros P., Silva M.C., Soares A.M.V.M. 1998. Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers* 3: 157-163.
- Haas P.J.; Buck W.B.; Hixon J.E.; Shanks R.D.; Wagner W.C.; Weston P.G.; Whitmore H.L. 1983. Effect of chlorpyrifos on Holstein steers and testosterone-treated Holstein bulls. *Am. J. Vet. Res.* 44: 879-881.
- Halbrook R.S., Shugart L.R., Watson A.P., Munro N.C., Linnabary R.D. 1992. Characterizing biological variability in livestock blood cholinesterase activity for biomonitoring organophosphate nerve agent exposure. *J. Vet. Med. Assoc.* 202: 714-725.
- Harlin K.S., Ross P.F. 1990. Enzymatic-Spectrophotometric method for determination of cholinesterase activity in whole blood: collaborative study. *J. AOAC* 73: 616-619.
- Harlin K.S. 1991. Cholinesterase activity in the retina with applications for use in postmortem diagnosis of organophosphorus insecticide poisoning in animals. Tesis doctoral. Universidad de Illinois, Urbana, Illinois, USA.
- Hatch R.C. 1988. Toxicología veterinaria. En: *Farmacología y terapéutica veterinaria*, pp. 283-448. Eds. Booth N.H., McDonald L.E.

- Vol. 2. Acribia. Zaragoza. Iowa State University, Ames, Iowa. USA. 528 pp.
- Hill E.F., Fleming W.J. 1982. Anticholinesterase poisoning of birds. *Environ. Toxicol. Chem.* 1: 27-38.
- Humiston C.G., Wright G.J. 1967. An automated method for the determination of cholinesterase activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 10: 467-480.
- Iyaniwura T.T. 1991. Relative inhibition of rat plasma and erythrocyte cholinesterases by pesticide combinations. *Vet. Hum. Toxicol.* 33: 166-168.
- Jones D.G. 1985. Stability and storage characteristics of enzymes in cattle blood. *Res. Vet. Sci.* 38: 301-306.
- Khan A.A., Coppock R.W., Schuler M.M., Lillie L.E. 1988. In vitro and in vivo effects of dichlorvos on blood cholinesterase activities of cattle. *Am. J. Vet. Res.* 49: 1184-1187.
- Klette K.L., Levine B., Dreka C., Smith M.C., Goldberger B.A. 1993. Cholinesterase activity in postmortem blood as a screening test for organophosphate/chemical weapon exposure. *J. Forensic Sci.* 38: 950-955.
- Knedel M., Bottger R. 1967. A kinetic method for determination of the activity of pseudocholinesterase (acylcholine acylhydrolase 3.1.1.8.). *Klin. Wochenschr* 45: 325-327.
- Lepage L.; Schiele F.; Gueguen R.; Siest G. 1985. Total cholinesterase in plasma: biological variations and reference limits. *Clin. Chem.* 31: 546-550.
- Lewis P.J., Lowing R.K., Gompertz D. 1981. Automated discrete kinetic method for erythrocyte acetylcholinesterase and plasma cholinesterase. *Clin. Chem.* 27: 926-929.
- Marden B.T., Fairbrother A., Bennett J.K. 1994. Interlaboratory comparison of cholinesterase assay measurements. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1761-1768.
- Meuling W.J.A., Jongen M.J.M., Van Hemmen J.J. 1992. An automated method for the determination of acetyl and pseudo cholinesterase in hemolized whole blood. *Am. J. Ind. Med.* 22: 231-241.
- Mount M.E. 1984. Resúmenes 27 Congreso Anual American Association for Veterinary Laboratory Diagnosticians, pp 383-402.
- Munro N.B., Shugart L.R., Watson A.P., Halbrook R.S. 1991. Cholinesterase activity in domestic animals as a potential biomonitoring for nerve agent and other organophosphate exposure. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199: 103-115.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1987. Methodological principles for selected analytes: enzymes. National Committee for Clinical Laboratory Standards document C5-P2 7: 229-241.
- Nostrandt A.C., Duncan J.A., Padilla S. 1993. A modified spectrophotometric method appropriate for measuring cholinesterase activity in tissue from carbaryl-treated animals. *Environ. Appl. Toxicol.* 21: 196-203.
- Sanz P.; Rodríguez-Vicente M.C.; Díaz D.; Repetto J.; Repetto M. 1991. Red blood cell and total blood acetylcholinesterase and plasma pseudocholinesterase in humans: observed variances. *Clin. Toxicol.* 29: 81-90.
- Sawyer C.H.; Everett J.W. 1946. Effects of various hormonal conditions in the intact rat on the synthesis of serum cholinesterases. *Endocrinology* 39: 307-322.
- Sidell F.R.; Kaminskis A. 1975. Temporal intrapersonal physiological variability of cholinesterase activity in human plasma and erythrocytes. *Clin. Chem.* 21: 1961-1963.
- Silver A. 1974. The biology of cholinesterases. En: *Frontiers of Biology*, Vol. 36, pp. 1-596. Eds. Neuberger A., Tatum E.L. American Elsevier Publishing CO. Inc. New York. USA.
- Singh A.K. 1985. Kinetic analysis of inhibition of brain and red blood cell acetylcholinesterase and plasma cholinesterase by acephate or methamidophos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 81: 302-309.

- Tarrab-Hazdai R., Levi-Schaffer F., Gonzales G., Arnon R. 1984. Acetylcholinesterase os Schistosoma mansoni: Molecular forms of the solubilized enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 790: 61-69.
- Tecles F. 1998. Efectos de diferentes diluyentes y cromóforos en la determinación de colinesterasa en sangre de rumiantes. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.
- Tecles F., Martínez Subiela S., Bernal L.J., Cerón J.J. 2000. Use of whole blood for spectrophotometric determination of cholinesterase activity in dogs. *Vet. J.* 160: 242-249.
- Tecles F., Cerón J.J. 2001. Determination of whole blood cholinesterase in different animal species using specific substrates. *Res. Vet. Sci.* 70: 233-238.
- Tecles F., Martínez Subiela S., Cerón J.J. 2001. Optimal conditions to avoid carbamylated cholinesterase reactivation on a spectrophotometric whole blood assay. *Resúmenes I Congreso Biomarkers of Environmental Contamination, Pova de Varzim, Portugal*, pp. 199.
- Tecles F., Gutiérrez Panizo C., Martínez Subiela S., Cerón J.J. 2002. Effects of different variables on whole blood cholinesterase analysis in dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14:132-139.
- Tietze F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal. Biochem.* 27: 502-522.
- Tor E.R., Holstege D.M., Galey F.C. 1994. Determination of Cholinesterase Activity in Brain and Blood Samples Using a Plate Reader. *J. AOAC Int.* 77: 1308-1313.
- Willig S., Hunter D.L., Dass P.D., Padilla S. 1996. Validation of the use of 6,6'-Dithiodinicotinic acid as a chromogen in the ELLMAN method for cholinesterase determinations. *Vet. Hum. Toxicol.* 38: 249-253.
- Wills J.H. 1972. The measurement and significance of changes in the cholinesterase activities on erythrocytes and plasma in man and animals. *CRC Critical Rev. Toxicol.* March: 153-201.
- Wilson B., Padilla S., Henderson J.D., Brimijoin S., Dass P.D., Elliot G., Jaeger B., Lanz D., Pearson R., Spies R. 1996. Factors in standardizing automated cholinesterase assays. *J. Toxicol. Environ. Health* 48: 187-195.
- Wilson B.W., Sanborn J.R., O'Malley M.A., Henderson J.P., Billitti J.R. 1997. Monitoring the pesticide-exposed worker. *Occup. Med.* 12: 347-363.
- Winters D.R., Harper B.G., Resnick I.G. 1997. Automated Procedure for Estimation of Blood Cholinesterase Activities in Rabbits. *Lab. Anim. Sci.* 47: 407-410.
- Witter R.F. 1963. Measurement of blood cholinesterase. *Arch. Environ. Health* 6: 537-563.