

Rev Biomed 2000; 11:91-98.

Validación de la determinación de colinesterasa plasmática humana a 340 nM.

Artículo Original

Manuel Jiménez-Díaz¹, Viria Martínez-Monge².

¹Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica; ²Laboratorio Clínico Hospital Calderón Guardia; Caja Costarricense de Seguro Social, San José, Costa Rica, C.A.

RESUMEN.

Introducción. Se presenta la validación de un método de monitoreo continuo para la cuantificación de colinesterasa plasmática empleando ácido 6-6'-ditiodinicotínico (DTNA) como indicador.

Materiales y métodos. Se emplearon muestras de plasma anticoagulado con EDTA. En este método la tiocolina liberada de la propioniltiocolina por la colinesterasa, reacciona con el DTNA liberando ácido tionicotínico y el aumento de absorbancia a 340 nM es proporcional a la actividad de la enzima.

Resultados. Las precisiones día a día para muestras con valores de colinesterasa bajos y altos mostraron coeficientes de variación de 4,2 y 3,5 por ciento y en un mismo día de 2,3 y 1,5 por ciento respectivamente. La bilirrubina y la

hemoglobina no presentan interferencia. El reactivo de DTNA almacenado en botella ámbar es estable por al menos 6 meses a 4-8 °C. Al comparar los resultados con métodos comerciales basados en la reacción de Ellman se obtuvo en un primer caso una ecuación de regresión lineal de $Y = 1,13(X) - 274$, con un coeficiente de correlación (r) de 0,987 y una desviación estándar sobre la línea de regresión ($S_{y/x}$) de 345 U/L. Y en un segundo caso, los resultados fueron: $Y = 1,074(X) + 240$; $r = 0,977$ y $S_{y/x} = 491$ U/L.

Discusión. El método evaluado constituye una alternativa precisa y más barata para la determinación de colinesterasa plasmática. Los datos obtenidos indican que el método es lineal y reproducible dentro del intervalo en el que se espera encontrar los valores de las muestras. El estudio comparativo con métodos comerciales

Solicitud de sobretiros: Manuel Jiménez-Díaz, PhD. Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José - Costa Rica. Tel. (506) 2075440/2074624 Fax: (506) 2075440 E-mail: mejimene@cariari.ucr.ac.cr
Recibido el 23/Agosto/1999. Aceptado para publicación el 15/Febrero/2000.

Este artículo esta disponible en <http://www.uady.mx/~biomedic/rb001122.pdf>

Vol. 11/No. 2/Abril-Junio, 2000

M Jiménez-Díaz, V Martínez-Monge.

mostró una buena correlación y posee la gran ventaja sobre los métodos con DTNB, de no sufrir interferencia por hemoglobina.

(Rev Biomed 2000; 11:91-98)

Palabras clave: Colinesterasa plasmática, métodos colorimétricos, organofosforados, carbamatos, pesticidas.

SUMMARY.

Validation of the determination of plasma cholinesterase at 340 nM.

Introduction. A kinetic method for the determination of plasma cholinesterase, which entails the use of 6,6'-dithiodinicotinic acid as a chromogen is validated.

Material and methods. In this procedure, the hydrolysis of propionylthiocholine liberates thiocholine, that reacts with 6-6'-dithiodinicotinic acid (DTNA) to yield thionicotinic acid, which has an optimal absorption wavelength at 340 nm. The increase in absorbance at 340 nm is proportional to enzyme activity.

Results. The CV of the between run precision ranged from 3,5 to 4,2 per cent. Within-run precision ranged from 1,5 to 2,3 per cent. Bilirubin and hemoglobin do not interfere. The working reagent, stored in an amber-colored bottle, is stable for at least 6 months at 4-8 °C.

Comparisons with two commercial methods based on the Ellman's reaction, gave in the first case a linear regression of $Y = 1.13 (X) - 274$, with a correlation coefficient (r) of 0.987 and a standard error ($S_{y/x}$) of 345 U/L. In the second case the results were $Y = 1.374 (X) + 240$; $r = 0.977$; $S_{y/x} = 491 \text{U/L}$.

Discussion. The evaluated method constitutes a precise and cheaper alternative for the determination of plasma cholinesterase. The data indicate that the method is linear and precise in the range of normal enzyme activity. Comparison with commercial methods gave a good correlation. The procedure has the great advantage that hemoglobin

do not interfere. *(Rev Biomed 2000; 11:91-98)*

Key words: Serum cholinesterase, organophosphates, carbamates, pesticides, colorimetric methods.

INTRODUCCIÓN.

La colinesterasa plasmática (EC 3.1.1.8) pertenece a un grupo de isoenzimas hepáticas con masa molecular de aproximadamente 300000 Da (1). A pesar de su amplia distribución en tejidos humanos y animales, su función fisiológica aún no se conoce claramente. Aunque se sugiere que juega un papel importante en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas, regulando la concentración de la colina en plasma o evitando la acumulación de butirilcolina, con sus efectos nicotínicos, durante el metabolismo de ácidos grasos y lipogénesis (2).

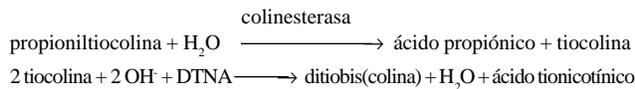
La determinación de su actividad es de importancia clínica para evaluar función hepática, detectar una exposición excesiva a los plaguicidas organofosforados y carbamatos e identificar pacientes con formas atípicas con sensibilidad aumentada hacia el anestésico succinilcolina (1,3).

En nuestro medio, la colinesterasa plasmática ha adquirido gran importancia clínica debido a la amplia aplicación de plaguicidas. Para su determinación se emplea su capacidad de hidrolisar los ésteres de colina en sus respectivos ácidos. Se han desarrollado varios métodos, entre los que se incluyen la determinación del cambio de pH que acompaña la hidrólisis de los ésteres de colina (4, 5) y aquellos basados en la detección de la liberación de tiocolina de sus ésteres empleando como indicador el reactivo de Ellman (5,5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico)), DTNB (6-8). Estos últimos tienen mayor aceptación, sin embargo, la alta actividad catalítica de la enzima en suero, aunado a la alta sensibilidad de la reacción indicadora, demandan una predilución o un volumen muy pequeño de la muestra. Ambas medidas contribuyen necesariamente a una impre-

Determinación de colinesterasa plasmática humana.

cisión inevitable y hace difícil la automatización del método (8). Además, el pico de absorción del tionitrobenzoato coincide con el pico de absorción de la hemoglobina, lo que presenta un problema al analizar muestras ricas en hemoglobina. Para evitar estos inconvenientes se ha propuesto el empleo del ácido 6-6'-ditiodinicotínico (DTNA) como sustituto del DTNB (9). En este estudio se presenta la validación del análisis de la actividad de colinesterasa plasmática humana empleando el DTNA como indicador.

Bajo las condiciones de reacción, a partir de propioniltiocolina la colinesterasa libera tiocolina, la cual reacciona inmediatamente con el DTNA formando ácido tionicotínico, que presenta un pico máximo de absorbancia a 340 nM, permitiendo así el monitoreo directo de la reacción:



MATERIALES Y MÉTODOS.

Equipo.

Para los análisis se empleó un espectrofotómetro Shimadzu Modelo UV-160, con control de temperatura. Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón.

Muestras.

Suero y plasma heparinizado o con EDTA son muestras adecuadas. No se debe emplear el fluoruro como preservante. Las células deben separarse del suero o plasma en las dos horas siguientes a su recolección.

Reactivos.

Los reactivos utilizados fueron obtenidos de la compañía Sigma, St. Louis, USA.

1. *Solución amortiguadora de fosfato*, 100 mmol/L, pH 7,6. Disolver 2,33 g de Na_2HPO_4 y 0,831 g de KH_2PO_4 en 800 mL de agua desionizada, ajustar el pH a 7,6 con NaOH 0,02M y trasvasar a un matraz volumétrico de un litro, aforar hasta la marca con agua destilada y mezclar.

2. *Ácido 6-6'-ditiodinicotínico (DTNA)*, 0,2 mmol/L. Colocar 61,66 mg de DTNA en un ma-

traz volumétrico de un litro, aforar hasta la marca con solución amortiguadora de fosfatos (100 mmol/L, pH 7,6) y mezclar. Almacenar en botella ámbar. Esta solución es estable por lo menos durante 6 meses en refrigeración (4-8°C).

3. *Sustrato, yoduro de propioniltiocolina*, 127 mmol/L. Disolver 385 mg de yoduro de propioniltiocolina en 10 mL de agua desionizada. Esta solución es estable por lo menos 3 meses en congelación a -20°C.

Procedimiento.

1. Colocar 2,0 mL de la solución de DTNA en un tubo de vidrio de 13 x 100 mm.

2. Agregar 5 μL de muestra (plasma o suero). Mezclar e incubar a 30°C por dos minutos.

3. Agregar 100 μL de sustrato. Mezclar, esperar 30 segundos y determinar el cambio de absorbancia por minuto a 340 nm y a 30°C, ajustando previamente el cero de absorbancia con agua destilada.

Cálculos.

Bajo las condiciones de la prueba, el coeficiente de absortividad milimolar del ácido tionicotínico a 340 nm y 30°C es 10,80 $\text{L mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

$$\text{Colinesterasa U/L} = \Delta A/\text{min} \times \frac{2,105 \text{ mL}}{0,005 \text{ mL} \times 10,80 \times 10^3 \text{ L umol}^{-1} \text{cm}^{-1}}$$

$$\text{Colinesterasa U/L} = \Delta A/\text{min} \times 39000$$

RESULTADOS.

Espectro de absorción del producto de reacción. Se realizó el espectro de absorción del producto de la reacción determinando las absorbancias en un intervalo que comprendió longitudes de onda de 300 a 700 nm, se encontró que el pico de absorbancia máxima del ácido tionicotínico se presenta a 340 nm.

Efecto de la concentración de DTNA. Se analizaron diferentes concentraciones del compuesto en el intervalo de 0,0125 a 0,40 mmol/L. En la figura 1 se muestran los resultados. Como

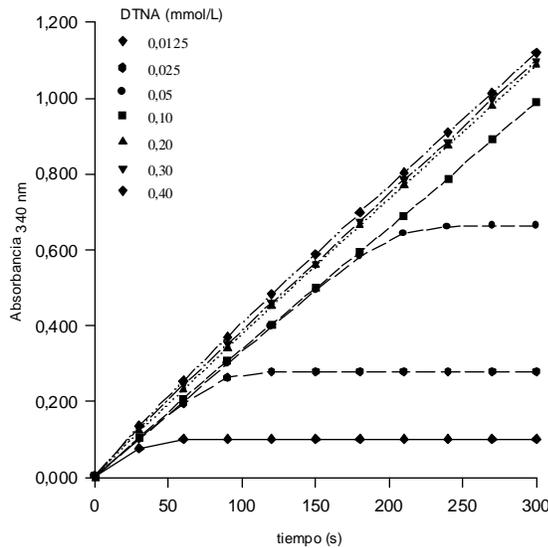


Figura 1.- Efecto de la concentración de DTNA sobre la determinación de colinesterasa plasmática a 340 nm.

puede observarse los mejores resultados se obtuvieron con concentraciones de 0,20 a 0,40 mmol/L. Se eligió la concentración de 0,20 mmol/L como adecuada.

Efecto de la concentración de sustrato. El efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la colinesterasa se muestra en la figura 2. Se analizaron diferentes concentraciones de propioniltiocolina en el intervalo de 0,6 a 15 mmol/L en la mezcla final de reacción. Se observa que con concentraciones superiores a 6,0 mmol/L se obtienen valores similares de actividad. También se observa que al aumentar la concentración de sustrato se aumenta la hidrólisis espontánea del mismo, lo que aumenta el delta absorbancia del blanco de reactivos. Por lo tanto, se decidió utilizar en la mezcla final una concentración de sustrato de 6,0 mmol/L. La evaluación se realizó utilizando una mezcla de sueros con una actividad de colinesterasa de 11800 U/L.

Efecto del volumen de muestra. Se analizó el efecto del volumen de muestra sobre la determinación, se emplearon volúmenes en el intervalo de 1,0 a 20 μ L. Se observó que con

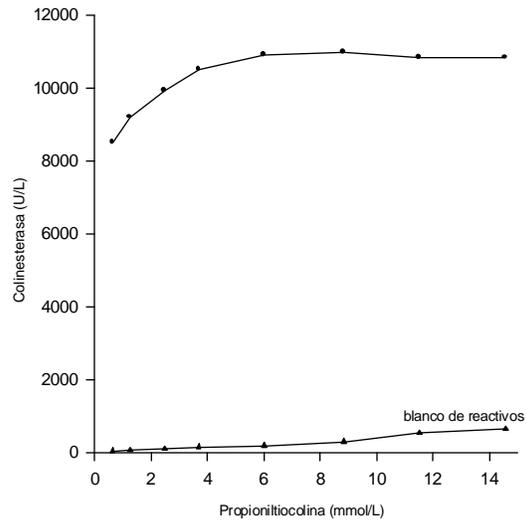


Figura 2.- Efecto de la concentración final de sustrato sobre la actividad de la colinesterasa y la hidrólisis del blanco de reactivos.

volúmenes de 1,0 a 15 μ L se obtienen resultados similares. Con volúmenes superiores los resultados tienden a disminuir. Se eligió un volumen de muestra de 5,0 μ L como adecuado para obtener un mayor intervalo de linealidad.

Efecto del pH. Se evaluó el efecto del pH sobre la actividad de la enzima. Se analizaron valores de pH en el intervalo de 7,2 a 8,2. Como se observa en la figura 3, conforme aumenta el pH aumenta levemente la actividad de la enzima, pero también aumenta la hidrólisis espontánea del sustrato. Por lo anterior se eligió un pH de 7,6 para mantener baja la hidrólisis espontánea del sustrato sin disminuir la actividad de la enzima.

Imprecisión. Se realizaron estudios de imprecisión analizando repetidamente ($n=10$) en un mismo día y en días consecutivos, mezclas de sueros con actividades de colinesterasa plasmática baja y alta. En un mismo día se obtuvieron coeficientes de variación (CV) de 1,5 y 2,3 por ciento para actividades de 10794 y 2176 U/L, respectivamente. Los CV día a día fueron de 3,5 y 4,2 por ciento para actividades de 10613 y 2207 U/L, respectivamente.

Linealidad del método. Se comprobó la

Determinación de colinesterasa plasmática humana.

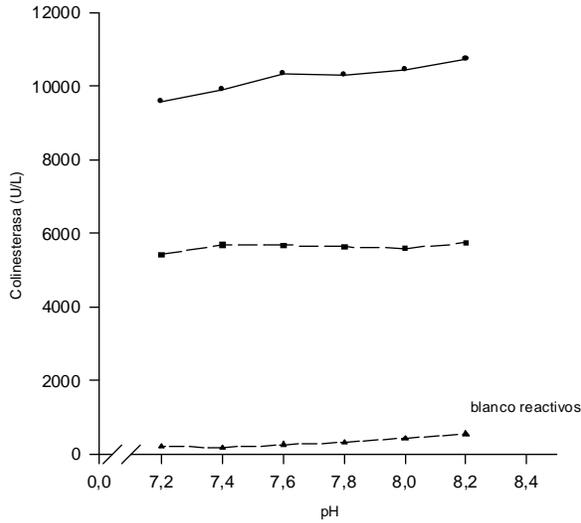


Figura 3.- Efecto del pH sobre la actividad de la colinesterasa plasmática y la hidrólisis del blanco de reactivos.

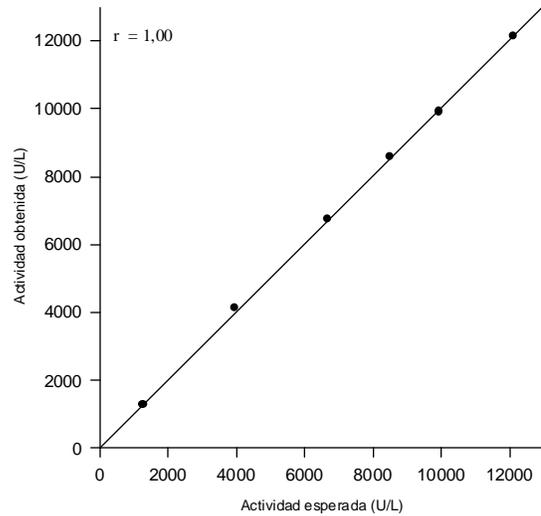


Figura 4.- Linealidad del método para colinesterasa plasmática a 340 nM.

linealidad del método analizando diluciones de un suero con actividad alta (12120 U/L), obteniéndose un coeficiente de correlación (r) de 1,00 (fig. 4).

evaluó el efecto interferente de bilirrubina (2,5 a 20 mg/dL) y hemoglobina (50 a 500 mg/dL) en la determinación. No se observó interferencia por ninguna de estas dos sustancias.

Efecto de sustancias interferentes. Se

Estudio comparativo. En la figura 5 y 6 se

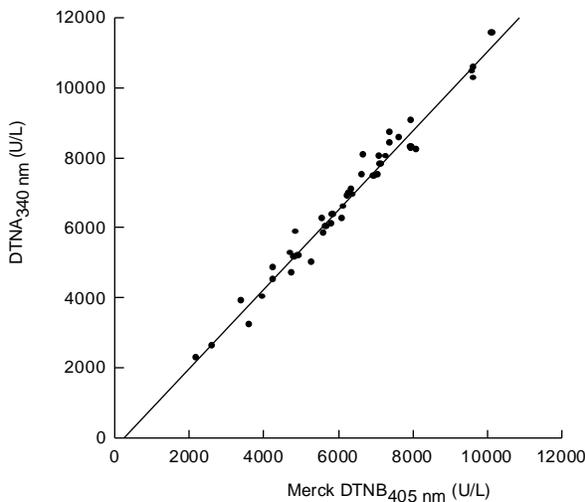


Figura 5.- Estudio comparativo del análisis de colinesterasa plasmática por el método en estudio con el análisis a 405 nM empleando DTNB.
 $Y=1,131X - 274$; $n=45$; $r=0,987$; $Sy/x=345$ U/L

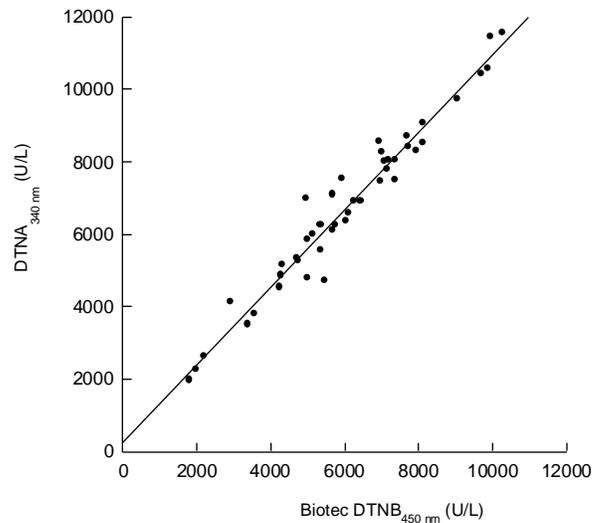


Figura 6.- Estudio comparativo del análisis de colinesterasa plasmática por el método en estudio con el análisis a 450 nM empleando DTNB.
 $Y=1,074 + 240$; $n=45$; $r=0,977$; $Sy/x=491$ U/L

presentan los resultados de estudios comparativos del método con DTNA con la determinación enzimática de colinesterasa plasmática por métodos comerciales que emplean DTNB como indicador (Merck Diagnostica y Biotec Internacional S.A.), los cuales fueron empleados como referencia. Se analizaron 45 sueros con actividades de colinesterasa entre 2200 y 11700 U/L. En el caso de la comparación con el método de Merck (fig. 5), la ecuación de regresión obtenida fue: $y = 1,13x - 274$. El coeficiente de correlación (r) fue de 0,987 y el error estándar del estimado ($S_{y/x}$) de 345 U/L. En el caso de la comparación con el método de Biotec Internacional (fig. 6), la ecuación de regresión obtenida fue: $y = 1,074x + 240$. El coeficiente de correlación (r) fue de 0,977 y el error estándar del estimado ($S_{y/x}$) de 491 U/L.

DISCUSIÓN.

En Latinoamérica es común el empleo de plaguicidas organofosforados y carbamatos, que inhiben las colinesterasas (10). La intoxicación por plaguicidas organofosforados puede causar enfermedad severa incluyendo la muerte y daño cerebral permanente en los sobrevivientes (11). Como una medida preventiva, los trabajadores en contacto con tales compuestos deben ser controlados continuamente, para identificar a las personas sobreexpuestas. Esto se realiza mediante la determinación de la actividad de las colinesterasas, ya que la actividad enzimática disminuye antes de que se presenten manifestaciones clínicas (11, 12).

Dentro del grupo de las colinesterasas se incluyen la acetilcolinesterasa (E.C.3.1.1.7) o colinesterasa eritrocítica y la acilcolina acilhidrolasa (E.C.3.1.1.8) o colinesterasa plasmática. La enzima plasmática es de importancia clínica para detectar pacientes con intoxicación por plaguicidas, formas atípicas de la misma o disfunción hepática (1,3). En contacto con plaguicidas la actividad de la enzima

plasmática disminuye más rápidamente que la actividad de la enzima eritrocítica, por lo que se considera un índice muy sensible para prevenir intoxicación. La determinación de la actividad de la colinesterasa eritrocitaria es de importancia en los sistemas de vigilancia para intoxicaciones crónicas, por permanecer deprimida mayor tiempo y es considerada como un mejor índice de exposición (1, 3, 13).

Generalmente los métodos empleados para el análisis de las colinesterasas se basan en la reacción de Ellman, que emplea la reducción del DTNB por la tiocolina liberada del éster de colina como reacción indicadora. En este estudio se realizó la validación del análisis de colinesterasa plasmática empleando el DTNA en lugar del DTNB. En este método, la tiocolina reduce al DTNA liberando ácido nicotínico, permitiendo la determinación mediante el monitoreo continuo del aumento de absorbancia a 340 nm.

Se realizaron estudios para determinar las condiciones óptimas. En el caso del DTNA, una concentración de 0,20 mmol/L se considera adecuada. Una concentración inicial del sustrato (propioniltiocolina) de 127 mmol/L se encontró suficiente para el análisis de actividades elevadas de la enzima.

Se observó que al aumentar el pH aumenta ligeramente la actividad de la enzima, pero al mismo tiempo aumenta la hidrólisis del sustrato. Se consideró adecuado un pH de 7,6 en el cual la hidrólisis espontánea del sustrato es baja.

Empleando 5 μ L de muestra, el método presenta una buena linealidad en el intervalo dentro del cual se esperan los valores de las muestras. Sin embargo, si se requiere cambiar el volumen de muestra, éste puede variarse entre 1 y 15 μ L, con el correspondiente cambio en el factor, sin afectar los resultados.

Se llevaron a cabo estudios de imprecisión en un mismo día y día a día, utilizando mezclas de sueros con diferentes actividades de colinesterasa. En un mismo día se obtuvieron coeficientes de variación (CV) de 1,5 y 2,3 por

Determinación de colinesterasa plasmática humana.

ciento para actividades de 10794 y 2176 U/L, respectivamente. Los CV día a día fueron de 3,5 y 4,2 por ciento para actividades de 10613 y 2207 U/L, respectivamente. La imprecisión obtenida con este método es similar a la informada para otros sistemas basados en la reacción de Ellman (6, 8, 14, 15).

En cuanto al análisis de posibles interferentes, se encontró que la hemoglobina y la bilirrubina no producen interferencia en este sistema: lo cual es una gran ventaja sobre los métodos que emplean DTNB.

Los reactivos empleados son bastante estables. El DTNA en buffer de fosfatos y en botella ámbar, es estable al menos por 6 meses en refrigeración (4 a 8°C). El sustrato es estable en congelación (-20°C) por lo menos 4 meses.

Al realizar estudios comparativos con sistemas comerciales que emplean DTNB como indicador (Merck Diagnostica y Biotec Internacional S.A.), se obtuvo muy buena correlación. En el caso de la comparación con el método de Merck, que emplea butiriltocolina como sustrato, la ecuación de regresión obtenida fue: $y = 1,13x - 274$. El coeficiente de correlación (r) fue de 0,987 y el error estándar del estimado ($S_{y/x}$) de 345 U/L. En el caso de la comparación con el método de Biotec Internacional, que emplea propioniltocolina como sustrato, la ecuación de regresión obtenida fue: $y = 1,074x + 240$. El coeficiente de correlación (r) fue de 0,977 y el error estándar del estimado ($S_{y/x}$) de 491 U/L.

En resumen, el método evaluado constituye una alternativa precisa y más barata para la determinación de colinesterasa plasmática. Los datos obtenidos indican que el método es lineal y reproducible dentro del intervalo en el que se espera encontrar los valores de las muestras. El estudio comparativo con métodos comerciales mostró una buena correlación. Y posee la gran ventaja sobre los métodos con DTNB, de no sufrir interferencia por hemoglobina.

REFERENCIAS.

- 1- McQueen MJ. Clinical and analytical considerations in the utilization of cholinesterase measurements. *Clin Chim Acta* 1995; 237: 91-105.
- 2- Kutty DM. Review: Biological functions of cholinesterase. *Clin Biochem* 1980; 13:239-43.
- 3- Trundle D, Macial G. Detection of cholinesterase inhibition. The significance of cholinesterase measurements. *Ann Clin Lab Sci* 1988; 18:345-52.
- 4- Michel HO. An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. *J Lab Clin Med* 1949; 34:1564-8.
- 5- Ellin RI, Vicario P. A pH method for measuring blood cholinesterase. *Arch Environ Health* 1975; 30: 263-5.
- 6- Dietz A, Rubinstein H, Lubrano T. Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocholine-dithiobis (nitrobenzoic acid) procedure. En *Selected Methods of Clinical Chemistry*. Vol. 8. Washington DC: American Association of Clinical Chemistry; 1977. p. 41-6.
- 7- Magnotti RA, Eberly JP, Quarm DEA, McConnell RS. Measurement of acetylcholinesterase in erythrocytes in the field. *Clin Chem* 1987; 33:1731-5.
- 8- Schmidt E. Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie. Working Group of enzymes: Proposal of standard methods for the determination of enzyme catalytic concentrations in serum and plasma at 37 °C. II. Cholinesterase. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30:163-70.
- 9- Loof I. Experience with the Ellman method: Proposal for a modification and an alternative method (PAP). En: Wilson BW, Jaeger B, Baetcke K, ed. *Proc. U.S. EPA Workshop on cholinesterase methodologies*. Arlington, VA. December 1991. Washington DC: Office of Pesticide Program, US EPA; 1992. p. 119-42.
- 10- García-González JE. Causas del mal uso de los plaguicidas. *Tecnología en Marcha* 1996; 12: 25-37.
- 11- Henao S, Corey G. Plaguicidas inhibidores de las colinesterasas. Metepec, Mexico: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, ECO/OPS/OMS; 1991.
- 12- McConnell R, Cedillo L, Keifer M, Palomo MR. Monitoring organophosphate insecticide-exposed workers for cholinesterase depression. *J Occup Med*

M Jiménez-Díaz, V Martínez-Monge.

1992; 2:34-7.

13- Coye MJ, Lowe JA, Maddy KT. Biological monitoring of agricultural workers exposed to pesticides: I. Cholinesterase activity determinations. *J Occup Med* 1986; 28: 619-27.

14- Sigma Diagnostics. Cholinesterase (PTC). Quantitative, kinetics determination of cholinesterase activity in serum, plasma or whole blood at 405 nm. St. Louis, USA.

15- Biotec Internacional S.A. Colinesterasa sérica. Método colorimétrico cinético. San José, Costa Rica.