

Rev Biomed 2000; 11:161-168.

Validación de la determinación de acetilcolinesterasa eritrocítica humana a 340 nm.

Artículo Original

Manuel Jiménez-Díaz¹, Viria Martínez-Monge².

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

RESUMEN.

Introducción. Se presenta la validación de un método de monitoreo continuo para la cuantificación de acetilcolinesterasa eritrocítica humana (EC. 3.1.1.7) empleando ácido 6-6'-ditiodinicotínico (DTNA) como indicador.

Materiales y métodos. Se emplearon muestras de sangre total recogida con EDTA como anticoagulante. En este método la tiocolina liberada de la acetiltiocolina 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. La interferencia debida a colinesterasa plasmática se elimina mediante el empleo de quinidina.

Resultados. Las precisiones día a día para muestras con valores de colinesterasa bajos y altos mostraron coeficientes de variación de 3,2 y 5,7 por ciento y en un mismo día de 2,9 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 una ecuación de regresión lineal de $Y = 0,987(X) + 222$, con un coeficiente de correlación (r) de 0,958 y una desviación estándar sobre la línea de regresión ($S_{y/x}$) de 359 U/L.

Discusión. El método evaluado constituye una alternativa precisa, sensible y conveniente para la determinación de acetilcolinesterasa humana. Además posee la gran ventaja sobre los métodos con DTNB, de no sufrir interferencia por hemoglobina. 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.

(Rev Biomed 2000; 11:161-168)

Palabras clave: acetilcolinesterasa, organofosforados, carbamatos, pesticidas.

Solicitud de sobretiros: Dr. Manuel Jiménez-Díaz, 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 está disponible en <http://www.uady.mx/~biomedic/rb001132.pdf>

Vol. 11/No. 3/Julio-Septiembre, 2000

SUMMARY.**Validation of the method for the determination of human erythrocyte acetylcholinesterase at 340 nM.**

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

Material and methods. In this procedure, the hydrolysis of acetylthiocholine liberates thiocholine, which 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. The interference from plasma cholinesterase was eliminated by the inclusion of quinidine.

Results. Variation Coefficient of the between run precision ranged from 3,2 to 5,7 per cent. Within-run precision ranged from 1,5 to 2,9 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 a commercial method based on the Ellman's reaction, gave a linear regression of $Y = 0.987 (X) + 222$, with a correlation coefficient (r) of 0.987 and a standard error ($S_{y/x}$) of 345 U/L.

Discussion. The evaluated method constitutes a sensitive, precise, and convenient procedure for determining human acetylcholinesterase activity, with the great advantage that hemoglobin does not interfere. The data indicates that the method is linear and precise in the range of normal enzyme activity. Comparison with commercial methods gave a good correlation.

(Rev Biomed 2000; 11:161-168)

Key words: erythrocyte acetylcholinesterase, organophosphates, carbamates, pesticides.

INTRODUCCIÓN.

La acetilcolinesterasa (ACoIE, EC 3.1.1.7)

Revista Biomédica

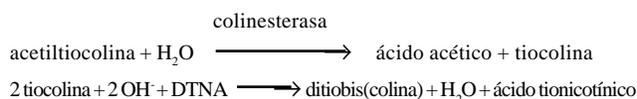
o colinesterasa eritrocítica es una glicoproteína extracelular con un peso molecular de aproximadamente 80,000 Da, aunque las estimaciones varían según las fuentes y el método (1, 2). Esta enzima es importante en la transmisión colinérgica, hidrolizando rápidamente al neurotransmisor acetilcolina, lo que permite un control preciso del tiempo que dura la activación sináptica. Después de que la de ACoIE hidroliza la acetilcolina, termina la transmisión química sináptica (1). La determinación de ACoIE se ha empleado principalmente para la detección de la sobreexposición a organofosforados y carbamatos (2-4).

En nuestro medio, la ACoIE ha adquirido gran importancia clínica debido a la amplia aplicación de plaguicidas. Para su determinación se emplea su capacidad de hidrolizar la acetiltiocolina en ácido acético y tiocolina. 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 (5, 6) 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 (4, 7, 8). Estos últimos tienen mayor aceptación, sin embargo, tienen varios inconvenientes. Primero, la absorbancia máxima del producto de la reacción indicadora, el tionitrobenzoato, coincide con el pico de absorbancia máxima de la hemoglobina de los eritrocitos a 410 nM. Segundo, los métodos generalmente se realizan con eritrocitos lavados y es necesario hacer una dilución de los mismos, lo que contribuye a la imprecisión y hace difícil la automatización. Tercero, el DTNB es tan sensible a la luz que la luz del día puede aumentar el color si se emplea una incubación de varios minutos o si los tubos de las muestras no se mantienen en la oscuridad mientras se espera para realizar la determinación de la absorbancia (9). Una solución es sacrificar sensibilidad y determinar la absorción a otra longitud de onda, por ejemplo 470 nM ó 480 nM, aunque la sensibilidad de la prueba se disminuye marcadamente bajo estas condiciones (10).

Determinación de acetilcolinesterasa eritrocítica humana.

Para evitar estos inconvenientes se ha propuesto el empleo del ácido 6-6'-ditiodinicotínico (DTNA) como sustituto del DTNB (11). En este estudio se presenta la validación del análisis de la actividad de ACoLE humana empleando el DTNA como indicador.

Bajo las condiciones de reacción, a partir de acetiltiocolina la ACoLE 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:

La muestra adecuada es sangre total recogida con heparina o EDTA.

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 destilada, 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. Solución de trabajo. En un matraz volumétrico de un litro colocar: 61,66 mg de ácido 6,6'-ditiodinicotínico (DTNA), 25,8 mg de hidrocloreuro de quinidina y 1 mL de Tritón X-100. 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 acetiltiocolina, 10,5 mmol/L. Disolver 30,40 mg de yoduro de acetiltiocolina en 10 mL de agua destilada. Esta solución es estable por lo menos 3 meses en congelación a -20°C.

Procedimiento:

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

2. Agregar 5 μL de muestra (sangre total). 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 L mmol⁻¹ cm⁻¹.

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

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

RESULTADOS.

Espectro de absorción del producto de reacción. Se realizó el espectro de absorción del producto de la reacción determinando las absorbancias en el intervalo 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 0,30 mmol/L. En la figura 1 se muestran los resultados. Como puede observarse los mejores resultados se obtuvieron con concentraciones de 0,20 a 0,30 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 ACoLE se muestra en la figura 2. Se

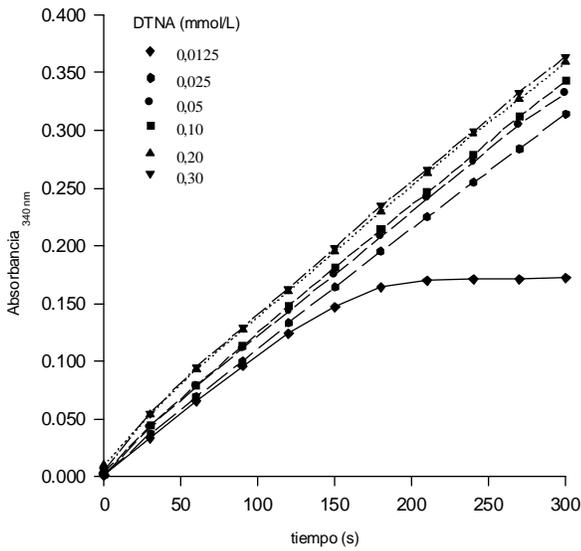


Figura 1.- Efecto de la concentración de DTNA sobre la determinación de colinesterasa eritrocítica a 340 nm.

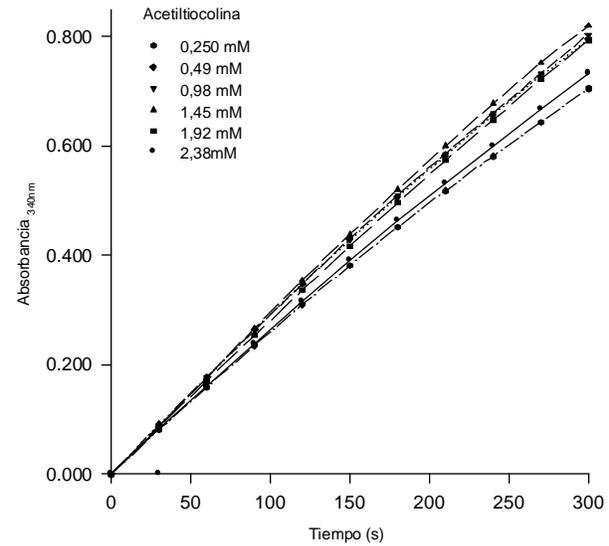


Figura 2.- Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de colinesterasa eritrocítica.

analizaron diferentes concentraciones de acetilcolina en el intervalo de 0,25 a 2,5 mmol/L en la mezcla final de reacción. Se observa que con concentraciones entre de 0,5 y 2,0 mmol/L se obtienen valores similares de actividad. Un valor superior a 2,0 mmol/L causa inhibición de la enzima. Por lo tanto, se decidió utilizar en la mezcla final una concentración de sustrato de 0,5 mmol/L. La

evaluación se realizó utilizando una muestra con actividad de ACoIE de 8200 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 0,5 a 5,0 μ L. Se observó que con volúmenes dentro de este intervalo se obtienen resultados

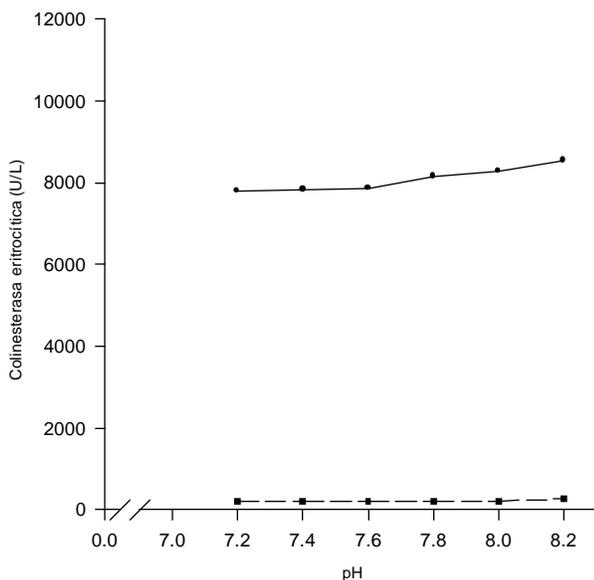


Figura 3.- Efecto del PH sobre la actividad de colinesterasa eritrocítica y la hidrólisis espontánea del blanco de reactivos.
Revista Biomédica

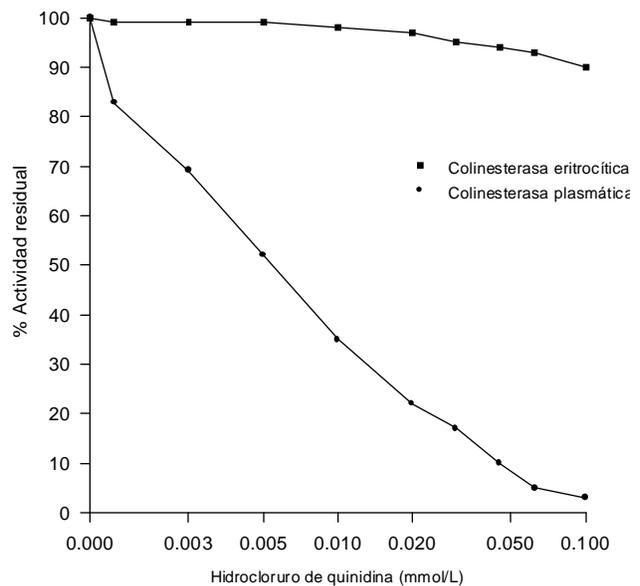


Figura 4.- Efecto de la concentración de hidrocarburo de quinina sobre la actividad de las colinesterasas.

Determinación de acetilcolinesterasa eritrocítica humana.

similares. Se eligió un volumen de muestra de 5,0 μL como adecuado por comodidad en la medición.

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 y en menor medida la hidrólisis espontánea del sustrato. Se eligió un pH de 7,6 como adecuado por ser empleado en otros procedimientos y para mantener baja la hidrólisis espontánea del sustrato.

Efecto de la concentración de Tritón X-100. Se evaluó el efecto del detergente no iónico Tritón X-100, en el intervalo de concentraciones de 0,05 - 2,0 %, sobre la actividad de la enzima. Las concentraciones evaluadas fueron adecuadas para llevar a cabo la lisis de los eritrocitos sin afectar la actividad de la enzima. Se eligió una concentración de 1,0 % como adecuada.

Efecto de la concentración del inhibidor. Se evaluó el efecto de la concentración del hidrocloreuro de quinidina sobre la actividad de las colinesterasas. En la figura 4 se muestran los resultados. Como puede observarse la quinidina es un inhibidor bastante selectivo de la colinesterasa plasmática, afectando mínimamente la actividad de la acetilcolinesterasa eritrocítica. Se eligió una

concentración de 0,068 mmol/L del inhibidor como adecuada.

Imprecisión. Se realizaron estudios de imprecisión analizando repetidamente ($n = 10$) en un mismo día y en días consecutivos, mezclas de eritrocitos con actividades de AColE baja y alta. En un mismo día se obtuvieron coeficientes de variación (CV) de 1,5 y 2,9 por ciento para actividades de 6567 y 2076 U/L, respectivamente. Los CV día a día fueron de 3,2 y 5,7 por ciento para actividades de 6225 y 2227 U/L, respectivamente.

Linealidad del método. Se comprobó la linealidad del método analizando diluciones de una muestra con actividad alta (8254 U/L), obteniéndose un coeficiente de correlación (r) de 1,00 (fig. 5).

Efecto de sustancias interferentes. Se 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.

Estudio comparativo. En la figura 6 se presentan los resultados del estudio comparativo del método en estudio (DTNA) con la

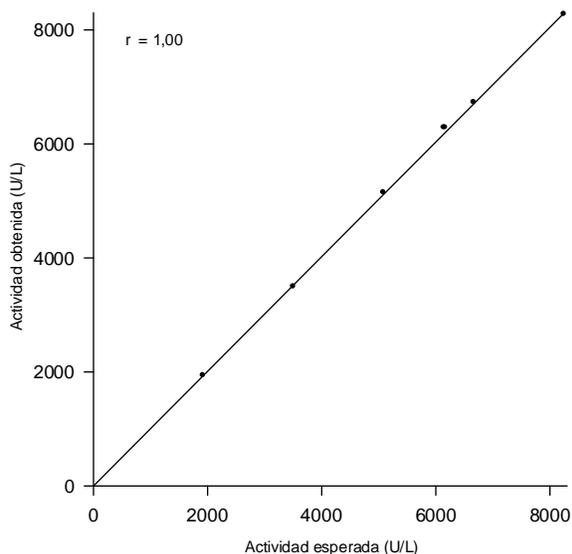


Figura 5.- Linealidad del método para colinesterasa eritrocítica a 340 nM.

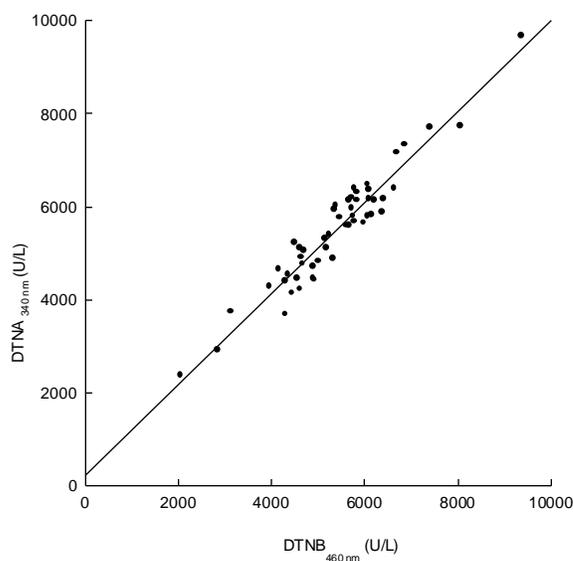


Figura 6.- Estudio comparativo del análisis de colinesterasa eritrocítica por el método en estudio con el análisis a 460 nM empleando DTNB.

$Y = 0,987x + 222$; $n = 52$; $r = 0,958$; $Sy/x = 359$ U/L.

M Jiménez-Díaz, V Martínez-Monge.

determinación de ACoIE por un método comercial que emplea DTNB como indicador (Biotec Internacional S.A., San José, Costa Rica), empleado como referencia. Se analizaron 52 muestras con actividades de ACoIE entre 2060 y 9700 U/L. La ecuación de regresión obtenida fue: $y = 0,987x + 222$. El coeficiente de correlación (r) fue de 0,958 y el error estándar del estimado ($S_{y/x}$) de 359 U/L.

DISCUSIÓN.

En Latinoamérica es común el empleo de plaguicidas organofosforados y carbamatos, que inhiben las colinesterasas (12). La intoxicación por plaguicidas organofosforados puede causar enfermedad severa incluyendo la muerte y daño cerebral permanente en los sobrevivientes (12, 13). 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 (12-14).

Dentro del grupo de las colinesterasas se incluyen la ACoIE 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 (2, 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. Sin embargo, la actividad de esta enzima se disminuye también en casos de enfermedad hepática, anemia, drogas (notablemente estrógenos) y en casos de variantes genéticas (2, 3). La ACoIE es más específica en este sentido y a la fecha, no se han reportado variantes genéticas que disminuyan su actividad, por tal motivo se considera de gran

importancia en los sistemas de vigilancia para intoxicaciones crónicas, por permanecer deprimida mayor tiempo y se considera un mejor índice de exposición (2, 3, 14).

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, sin embargo estos métodos presentan varios inconvenientes, especialmente al analizar muestras ricas en hemoglobina. En este estudio se realizó la validación del análisis de ACoIE empleando el DTNA en lugar del DTNB. En este método, la tiocolina reduce al DTNA liberando ácido tionicotínico, 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 final del sustrato (acetiltiocolina) de 0,5 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 y en menor medida la hidrólisis espontánea del sustrato. Se eligió un pH de 7,6 como adecuado ya que se ha empleado en otros procedimientos y se mantiene baja la hidrólisis espontánea del sustrato.

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, este puede variarse entre 1 y 5 μ L, con el correspondiente cambio en el factor, sin afectar los resultados.

Para eliminar la interferencia producida por la colinesterasa plasmática al utilizar sangre total se incluye en el reactivo de trabajo un inhibidor de la misma. Se pudo comprobar que la quinidina es un inhibidor bastante selectivo para la enzima plasmática, afectando mínimamente la actividad de la ACoIE, lo cual también ha sido aprovechado en otros procedimientos para analizar

Determinación de acetilcolinesterasa eritrocítica humana.

acetilcolinesterasa (4, 7, 8).

Se llevaron a cabo estudios de imprecisión en un mismo día y día a día, utilizando mezclas de eritrocitos con diferentes actividades de colinesterasa. En un mismo día se obtuvieron CV de 1,5 y 2,9 por ciento para actividades de 6567 y 2076 U/L, respectivamente. Los CV día a día fueron de 3,2 y 5,7 por ciento para actividades de 6225 y 2227 U/L, respectivamente. La imprecisión obtenida con este método es similar a la informada para otros sistemas basados en la reacción de Ellman (4, 7, 8, 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 (Biotec Internacional S.A. San José, Costa Rica), se obtuvo muy buena correlación. La ecuación de regresión obtenida fue: $y = 0,987x + 222$. El coeficiente de correlación (r) fue de 0,958 y el error estándar del estimado ($S_{y/x}$) de 359 U/L.

En resumen, el método evaluado constituye una alternativa precisa y con menos interferentes para la determinación de acetilcolinesterasa. 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- Prall, YG, Gambhir KK, Ampy FR. Acetylcholinesterase: an enzymatic marker of human red blood cell aging. *Life Sciences* 1998; 63:177-84.
- 2- McQueen MJ. Clinical and analytical considerations in the utilization of cholinesterase measurements. *Clin Chim Acta* 1995; 237: 91-105.
- 3- Trundle D, Macial G. Detection of cholinesterase inhibition. The significance of cholinesterase measurements. *Ann Clin Lab Sci* 1988; 18:345-52.
- 4- Lewis PJ, Lowing RK, Gompertz D. Automated discrete kinetic method for erythrocyte acetylcholinesterase and plasma cholinesterase. *Clin Chem* 1981; 27: 926-9.
- 5- Michel HO. An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. *J Lab Clin Med* 1949; 34:1564-8.
- 6- Pickering RG, Martin JG. Modifications of Michel pH method for the estimation of plasma, erythrocyte and brain cholinesterase activities of various species of laboratory animals. *Arch Toxicol* 1970; 26: 179-95.
- 7- Magnotti RA, Eberly JP, Quarm DEA, McConnell RS. Measurement of acetylcholinesterase in erythrocytes in the field. *Clin Chem* 1987; 33: 1731-5.
- 8- George PM, Abernethy MH. Improved Ellman procedure for erythrocyte cholinesterase. *Clin Chem* 1983; 29: 365-8.
- 9- Walmsley TA, Abernethy MH, Fitzgerald HP. The effect of daylight on the reaction of thiols with Ellman's DTNB reagent [5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)]. *Clin Chem* 1987; 33: 1928-9.
- 10- Wilson BW, Henderson JD. Blood esterase determinations as markers of exposure. *Rev Environ Contam Toxicol* 1992; 128: 55-69.
- 11- 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.
- 12- Henao S, Corey G. Plaguicidas inhibidores de las colinesterasas. Metepec, Mexico: Centro Panamericano de

M Jiménez-Díaz, V Martínez-Monge.

Ecología Humana y Salud, ECO/OPS/OMS; 1991.

13- McConnell R, Cedillo L, Keifer M, Palomo MR. Monitoring organophosphate insecticide-exposed workers for cholinesterase depression. J Occup Med 1992; 2: 34-7.

14- 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.

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