

## **COMPARACIÓN DE LA 2,2'-DITIODIPIRIDINA Y EL ÁCIDO 5,5'-DITIOBIS-2-NITROBENZOICO EN LA DETERMINACIÓN DE COLINESTERASA EN SANGRE ENTERA DE PERRO**

COMPARISON OF 2,2'-DITHIODIPYRIDINE AND 5,5'-DITHIOBIS-2-NITROBENZOIC ACID IN DOG WHOLE BLOOD CHOLINESTERASE DETERMINATIONS

**F. Tecles\*, C. Gutiérrez Panizo\*, S. Martínez Subiela\*, M. Bolio<sup>†</sup>, M<sup>a</sup>. D. Parra\*.**

\*Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria de Murcia, 30100, España

<sup>†</sup>Departamento de Medicina y Cirugía, Universidad Autónoma de Yucatán, México

E-mail: ftecles@um.es

### **RESUMEN**

Se pretende evaluar al cromóforo 2,2'-ditiopiridina (2-PDS) para la determinación de la actividad colinesterasa en sangre entera de perro, y compararlo con el empleo del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), cromóforo utilizado tradicionalmente en el método de ELLMAN. Ambos cromóforos proporcionaron buena precisión y repetibilidad a los ensayos (coeficientes de variación intra y entredeterminaciones < 8%). Sin embargo, el 2-PDS permitió detectar niveles más elevados de actividad colinesterasa. Asimismo, la utilización de una dilución más concentrada de sangre (1:20) únicamente fue posible con el empleo de 2-PDS. Los resultados obtenidos podrían explicarse por la capacidad del 2-PDS de evitar la interferencia de la hemoglobina a 340 nm de longitud de onda. Ambos cromóforos dieron lugar a la aparición de un nivel similar de actividad no enzimática.

Tras la exposición "in vivo" e "in vitro" al insecticida organofosforado coumaphos, tanto el 2-PDS como el DTNB permitieron detectar un similar grado de inhibición en la actividad colinesterasa en la dilución 1:50 de sangre entera de perro, existiendo buena correlación entre los resultados obtenidos con ambos cromóforos (coeficientes de correlación > 0.90). La dilución 1:20, analizada con 2-PDS, presentó unos resultados similares de inhibición a los obtenidos con la dilución 1:50. De este modo, los resultados obtenidos apoyan la utilización del 2-PDS como cromóforo para la determinación de la actividad colinesterasa en muestras de sangre entera de perro.

**Palabras clave:** perro, colinesterasa, cromóforo, 2-PDS

## SUMMARY

The use of 2,2'-dithiodipyridine (2-PDS) as chromophore for cholinesterase determination in dog whole blood is evaluated and compared with ELLMAN chromophore 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB). Good precision was obtained using both chromophores (within and between-run CVs < 8%). However, higher cholinesterase values were obtained when 2-PDS was used. The use of more concentrated whole blood dilution (1:20 dilution ratio) was only allowed using 2-PDS as chromophore. Ability of 2-PDS to avoid haemoglobin interference at 340 nm wavelength could explain these results. Both chromophores gave similar background ratio.

Similar inhibition was detected using both 2-PDS and DTNB in 1:50 whole blood dilution ratio after "in vivo" and "in vitro" organophosphate coumaphos exposure (correlation coefficients between chromophores > 0.90). The 1:20 whole blood dilution, assayed with 2-PDS, yielded similar inhibition results than 1:50. Therefore, these results recommend the use of 2-PDS as chromophore for cholinesterase determination in dog whole blood samples.

**Key words:** dog, cholinesterase, chromophore, 2-PDS

## INTRODUCCIÓN

Los compuestos organofosforados y carbamatos son ampliamente utilizados como insecticidas tanto en labores agrícolas para el control de plagas como para la desparasitación externa de los animales. De esta forma, los animales domésticos pueden estar expuestos con frecuencia a este tipo de sustancias, bien sea de forma accidental (por la ingestión de agua o alimentos contaminados) o por vía dérmica en tratamientos antiparasitarios, con el consiguiente riesgo de intoxicación.

Los insecticidas organofosforados y carbamatos se caracterizan por su capacidad para inhibir la enzima colinesterasa (ChE) en los tejidos animales, por lo que la determinación del nivel de actividad de esta enzima en muestras de sangre es un método muy fiable para monitorizar posibles exposiciones de los animales a estos contaminantes (DELLINGER y MOSTROM 1988). La sangre de los mamíferos contiene al menos dos tipos de colinesterasas: acetilcolinesterasa (AChE) o colinesterasa verdadera, que se encuentra ad-

herida a la membrana de los eritrocitos, y pseudocolinesterasa (PsChE) o butirilcolinesterasa, que se localiza en el plasma o suero.

Entre los diferentes métodos que se emplean para monitorizar la actividad colinesterasa, el de ELLMAN (ELLMAN et al. 1961) es uno de los más utilizados en la actualidad. Se trata de un método espectrofotométrico que se basa en la reacción entre un cromóforo, el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), con el grupo sulfhidrilo de la tiocolina liberado tras la hidrólisis del sustrato, acetiltiocolina (ATCI), por la acción de la colinesterasa. El resultado de esta reacción es un compuesto coloreado, el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, susceptible de ser medido espectrofotométricamente a una óptima longitud de onda de 412 nm (Figura 1).

Aunque el método de ELLMAN puede ser utilizado para la determinación de colinesterasa en plasma o eritrocitos, su utilización en muestras de sangre entera permite obtener dos grandes ventajas: (1) la sangre es

un tejido fácil de obtener y de manejar en el laboratorio, (2) no es necesario separar eritrocitos y plasma para realizar la estimación diferencial de acetil y pseudocolinesterasa (MEULING et al. 1992).

El principal problema que plantea el método de ELLMAN para su utilización rutinaria en muestras de sangre entera consiste en el similar rango óptimo de absorbancia existente entre el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, producto de reacción entre el DTNB y la tiocolina, y la hemoglobina presente en la muestra de sangre (AUGUSTINSSON et al. 1978). Con el fin de evitar este problema se pueden realizar dos modificaciones a este método: (1) utilización de diferentes cromóforos, de modo que el producto de la reacción entre dicho cromóforo y la tiocolina posea un rango óptimo de absorbancia alejado del espectro de absorbancia de la hemoglobina; (2) realizar

diluciones de la muestra de sangre entera con el fin de disminuir la concentración de hemoglobina presente en el medio (WILLIG et al. 1996).

Siguiendo estas recomendaciones, el cromóforo 2,2'-ditiodipiridina (2-PDS) ha sido validado para la determinación de colinesterasa en diluciones 1:50 y 1:20 de sangre entera (CERÓN et al. 1996). El presente artículo pretende comparar en la especie canina el cromóforo 2-PDS con el DTNB utilizado tradicionalmente por ELLMAN, evaluando la precisión obtenida con el uso de ambos cromóforos, así como su capacidad para dar lugar a la presencia de actividad no enzimática. También se determinaron los espectros de absorbancia para el 2-PDS y el DTNB con el fin de evaluar el efecto de la interferencia por hemoglobina. Finalmente, se comprobará la capacidad de los cromóforos de detectar la exposición "in vivo"

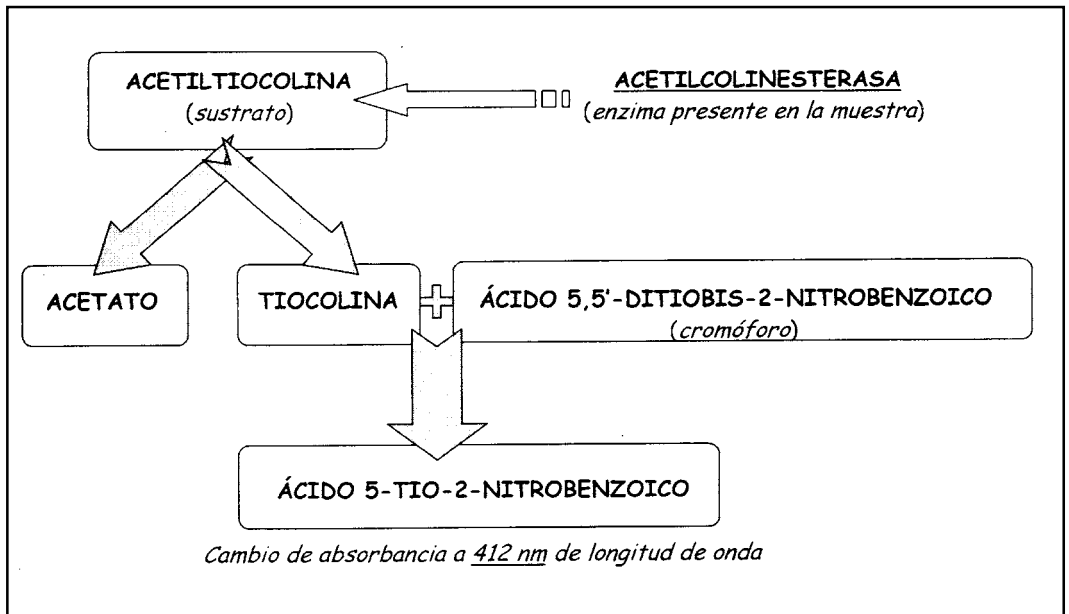


Figura 1. Fundamento de la determinación de acetilcolinesterasa por el método de ELLMAN.

e "in vitro" al coumaphos, insecticida organofosforado utilizado de forma rutinaria como antiparasitario de uso externo en perros.

et al. (1999), utilizando dos diferentes grados de dilución (1:50 y 1:20).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Reactivos utilizados

- *Sustratos*. Los sustratos utilizados fueron *acetiltiocolina iodada* (ATCI, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) y *butiriltiocolina iodada* (BTICI, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA).
- *Cromóforos*. Los cromóforos utilizados fueron *2,2'-ditiopiridina* (2-PDS, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) y *ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico* (DTNB, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). Ambos cromóforos fueron diluidos en tampón fosfato pH 7.5.
- *Insecticida*. El insecticida utilizado fue el *coumaphos* (Asuntol, Bayer, 50% de pureza), utilizado de forma rutinaria como tratamiento antiparasitario externo en perros. El tampón fosfato pH 7.5 fue utilizado como diluyente del insecticida.

### Preparación de las muestras

Las muestras de sangre entera se obtuvieron por punción en la vena cefálica de perros de la raza Braco alemán, proporcionados por el Animalario de la Universidad de Murcia, utilizando heparina como anticoagulante. Todos los animales se encontraban sanos, sin antecedentes de exposición a insecticidas organofosforados o carbamatos al menos dos meses antes de las pruebas. Tras la extracción, las muestras fueron diluidas con agua destilada, siguiendo las recomendaciones de CERÓN

### Condiciones del ensayo

La determinación de la actividad colinesterasa en muestras de sangre entera se realizó utilizando una modificación del método de ELLMAN descrita por CERÓN et al. (1996), empleando un autoanalyzer multiparamétrico, el Coulter Profile Analyzer (CPA; Coulter Scientific, Margency, France).

Las actividades acetilcolinesterasa y pseudocolinesterasa fueron determinadas en cada muestra de sangre entera mediante la utilización de dos sustratos diferentes, siguiendo las recomendaciones de TECLES et al. (2000):

- *Acetiltiocolina* (ATCI), empleada como sustrato específico de la acetilcolinesterasa eritrocitaria (concentración final  $1 \times 10^{-3}$ , concentración inicial  $11 \times 10^{-3}$ ).
- *Butiriltiocolina* (BTICI), utilizada para monitorizar la actividad pseudocolinesterasa plasmática (concentración final  $1 \times 10^{-3}$ , concentración inicial  $11 \times 10^{-3}$ ).

En ambos casos, tanto DTNB como 2-PDS fueron utilizados como cromóforos.

La actividad colinesterasa fue expresada como  $\mu$ moles de sustrato hidrolizados/ml de sangre/minuto. Los cálculos se realizaron de la siguiente forma (CERÓN et al., 1996):

- Para 2-PDS. Actividad final = absorbancia/min  $\times 1.55 \times$  dilución inicial.
- Para DTNB. Actividad final = absorbancia/min  $\times 0.808 \times$  dilución inicial.

La actividad no enzimática, definida como la capacidad del cromóforo de reaccio-

nar con grupos sulfhidrido presentes de forma natural en la sangre, fue determinada mediante la sustitución del sustrato por agua destilada en el medio de reacción y sustraída del valor de actividad colinesterasa final.

### **Ensayo de precisión**

Cinco muestras de sangre entera de perro, diluidas a 1:50 y 1:20 con agua destilada, fueron analizadas seis veces en el mismo día con el fin de establecer la precisión intradeterminaciones. Para la determinación de la precisión entredeterminaciones las mismas muestras de sangre entera fueron analizadas seis veces durante dos semanas.

### **Determinación de espectros de absorbancia**

Los espectros de absorbancia de las reacciones enzimáticas se determinaron en las dos diluciones de sangre entera utilizadas (1:50 y 1:20), con cada cromóforo, antes y después de la adición del sustrato al medio de reacción. Para ello se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda-2 de luz visible y ultravioleta. La lectura se realizó a una longitud de onda entre 300 y 500 nm.

### **Ensayo de inhibición «in vitro»**

Para este estudio se utilizaron diluciones del insecticida organofosforado coumaphos a tres concentraciones diferentes. Estas diluciones fueron preparadas a partir de coumaphos comercial (Asuntol<sup>®</sup>, Bayer, 50% de pureza) utilizando tampón fosfato pH 7.5 como diluyente para evitar hemólisis de las mues-

tras de sangre durante la incubación (CERÓN et al. 1999).

A partir de una mezcla de sangre de perro se separaron cuatro alícuotas de 500 ml cada una. Tres alícuotas fueron tratadas con una dosis diferente de coumaphos (concentraciones iniciales: 5, 24 y 83  $\mu$ M). La restante alícuota fue tratada con la misma cantidad de tampón fosfato pH 7.5 para establecer un grupo control. Las cuatro alícuotas fueron incubadas durante 30 minutos a una temperatura de 37°C. Tras la incubación, las muestras de sangre de cada grupo fueron diluidas y analizadas como se describe previamente. Las concentraciones finales de coumaphos en el medio de reacción fueron 0,009, 0,0043 y 0,151  $\mu$ M.

### **Ensayo de inhibición «in vivo»**

Quince perros de la raza Braco alemán fueron fumigados con una disolución de coumaphos a una concentración de 0,5 mg/ml. Los perros se encontraban alojados en el Animalario de la Universidad de Murcia, y todos ellos estaban sanos y sin antecedentes de exposición a compuestos organofosforados o carbamatos durante los últimos dos meses. Tanto la concentración de coumaphos utilizada como el procedimiento de fumigación se realizaron como el tratamiento antiparasitario externo que de forma rutinaria se lleva a cabo en el Animalario de la Universidad de Murcia.

La extracción de las muestras de sangre se realizó previamente (muestra control) y después de 2, 6 y 24 horas de la fumigación.

**Estudio estadístico**

Los coeficientes de variación (CVs) intra entredeterminaciones, el estudio estadístico y el estudio de correlación entre ambas diluciones de sangre y cromóforos, se calcularon utilizando un test ANOVA de un factor y un análisis de regresión simple, mediante el empleo del paquete estadístico Statgraphics (Statistical Graphics Corp., MD, USA).

**RESULTADOS**

**Precisión del método**

Los resultados de precisión aparecen en los Cuadros 1 y 2. En general, la sangre entera proporcionó buena precisión tanto intradeterminaciones (CVs<5%) como entredeterminaciones (CVs<8%). Por otro

**Cuadro 1. PRECISIÓN INTRADETERMINACIONES.** Actividad colinesterasa (µmol/ml/min), desviación estándar y coeficiente de variación (entre paréntesis). Abreviaturas: 2-PDS (2,2'-ditiopiridina), DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico), ATCI (acetiltiocolina iodada), BTCI (butiriltiocolina iodada), CV (coeficiente de variación).

MÉTODO		Sangre entera 1:50	Sangre entera 1:20
<b>2-PDS</b>			
ATCI	AChE	1.66 ± 0.05	1.69 ± 0.06
	CV%	(3.01)	(3.55)
BTCI	PsChE	1.46 ± 0.05	1.50 ± 0.04
	CV%	(3.43)	(2.67)
<b>DTNB</b>			
ATCI	AChE	1.30 ± 0.04	Excd. <sup>A</sup>
	CV%	(3.08)	
BTCI	PsChE	1.26 ± 0.06	Excd.
	CV%	(4.76)	

<sup>A</sup> La lectura de absorbancia excede el límite máximo (2.3 unidades de absorbancia).

**Cuadro 2. PRECISIÓN ENTREDETERMINACIONES.** Actividad colinesterasa (µmol/ml/min), desviación estándar y coeficiente de variación (entre paréntesis). Abreviaturas: ver Cuadro 1.

MÉTODO		Sangre entera 1 :50	Sangre entera 1 :20
<b>2-PDS</b>			
ATCI	AChE	1.65 ± 0.09	1.64 ± 0.07
	CV%	(5.46)	(4.27)
BTCI	PsChE	1.51 ± 0.07	1.50 ± 0.04
	CV%	(4.64)	(2.67)
<b>DTNB</b>			
ATCI	AChE	1.47 ± 0.08	Excd. <sup>A</sup>
	CV%	(5.44)	
BTCI	PsChE	1.33 ± 0.10	Excd.
	CV%	(7.52)	

<sup>A</sup> La lectura de absorbancia excede el límite máximo (2.3 unidades de absorbancia).

lado, el 2-PDS permitió detectar un nivel superior de actividad acetil y pseudocolinesterasa que el DTNB. Además, únicamente mediante el empleo de 2-PDS como cromóforo se consiguieron resultados de actividad colinesterasa con la dilución 1:20 de sangre entera, ya que con DTNB se excedió el límite máximo de absorbancia (2.3 unidades de absorbancia).

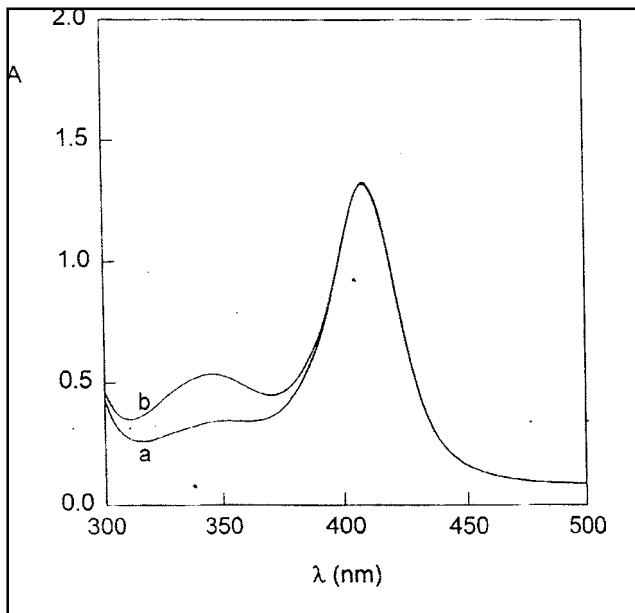
La actividad no enzimática calculada para ambos cromóforos se encuentra reflejada en

el Cuadro 3. Se pudo comprobar que la tasa de dicha actividad no enzimática resultó ser similar para los dos cromóforos utilizados en el ensayo, 2-PDS y DTNB, siendo de  $0.33 \pm 0.03$  y  $0.35 \pm 0.04$   $\mu\text{mol/ml/min}$  respectivamente en la dilución de sangre 1:50. La actividad no enzimática calculada para la dilución de sangre 1:20, utilizando 2-PDS como cromóforo, fue de  $0.25 \pm 0.03$   $\mu\text{mol/ml/min}$ .

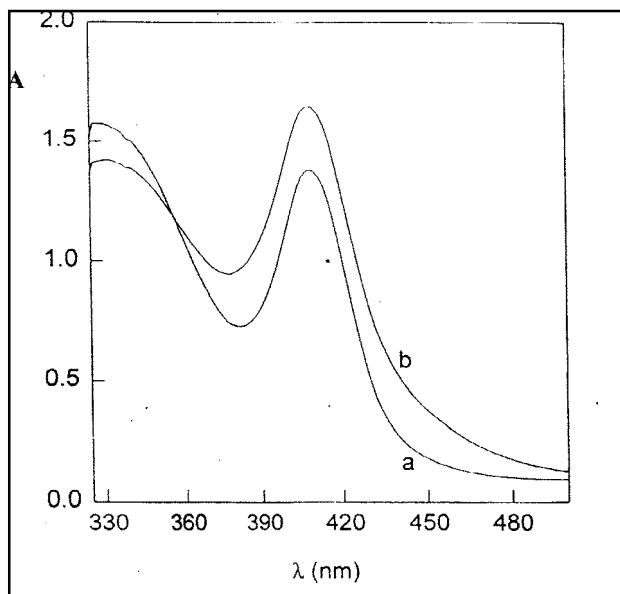
**Cuadro 3. Actividad no enzimática.** Abreviaturas: 2-PDS (2,2'-ditiodipiridina), DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico).

MÉTODO	DILUCIÓN DE SANGRE	
	1:50	1:20
2-PDS	$0.33 \pm 0.03$	$0.25 \pm 0.03$
DTNB	$0.35 \pm 0.04$	Excd. <sup>A</sup>

<sup>A</sup> La lectura de absorbancia excede el límite máximo (2.3 unidades de absorbancia).



**Figura 2.** Espectro de absorción de la determinación de colinesterasa en sangre entera (1:50) con 2-PDS: a) muestra + cromóforo; b) reacción final: muestra + cromóforo + sustrato.



**Figura 3.** Espectro de absorción de la determinación de colinesterasa en sangre entera (1:50) con DTNB: a) muestra + cromóforo; b) reacción final: muestra + cromóforo + sustrato.

### Espectros de absorción

Las representaciones gráficas de los espectros de absorción de la reacción con los dos cromóforos para la dilución de sangre 1:50 aparecen en las Figuras 2 y 3. Utilizando 2-PDS el mayor incremento de absorción quedó registrado sobre todo a 343 nm de longitud de onda. Sin embargo, a 412 nm no aparece ninguna variación tras la adición del sustrato, correspondiendo el pico de absorción detectado a esta longitud de onda a hemoglobina. Con el cromóforo DTNB aparecieron variaciones en la absorción a 343 y a 412 nm de longitud de onda, registrándose el mayor incremento de absorción a 412 nm, por lo que coincide con el rango de máxima absorción de la hemoglobina.

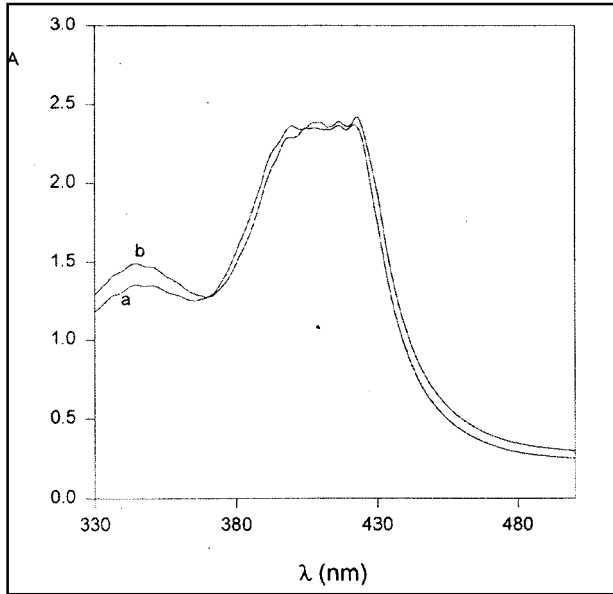
Las Figuras 4 y 5 muestran los espectros de absorción determinados para cada cromóforo en la dilución de sangre 1:20. Uti-

lizando 2-PDS se obtuvo un patrón de absorción similar al de la dilución 1:50. Con el empleo de DTNB únicamente se detectó un pico de hemoglobina a 412 nm, no registrándose variaciones de absorción tras la adición del sustrato.

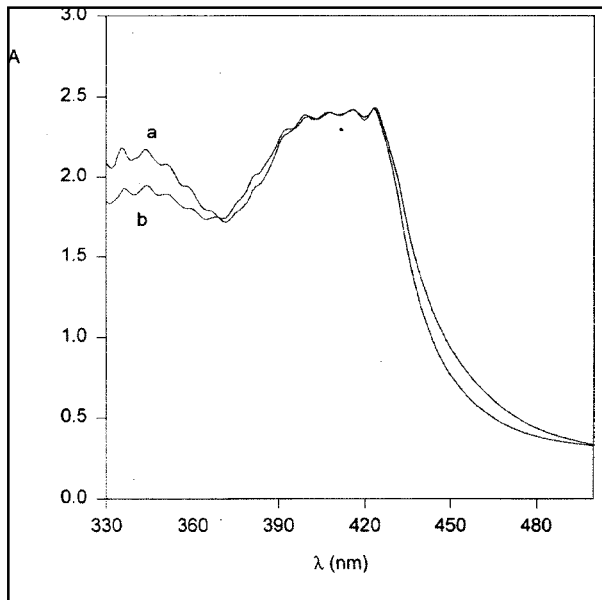
### Ensayo de inhibición "in vitro"

Los resultados obtenidos tras la realización del ensayo de inhibición realizado "in vitro" aparecen en el Cuadro 4. Tras la exposición al compuesto organofosforado coumaphos se pudo comprobar la aparición de una inhibición en la actividad acetil y pseudocolinesterasa, siendo mayor en esta última. El grado de inhibición detectado en cada caso fue similar independientemente del cromóforo o grado de dilución utilizado en el ensayo.





**Figura 4.** Espectro de absorbancia de la determinación de colinesterasa en sangre entera (1:20) con 2-PDS: a) muestra + cromóforo; b) reacción final: muestra + cromóforo + sustrato.



**Figura 5.** Espectro de absorbancia de la determinación de colinesterasa en sangre entera (1:20) con DTNB: a) muestra + cromóforo; b) reacción final: muestra + cromóforo + sustrato.

**Cuadro 4. Incubación “in vitro” con coumaphos.** Actividad colinesterasa ( $\mu\text{mol/ml/min}$ ), desviación estándar y porcentaje de actividad inicial (entre paréntesis). Abreviaturas: AChE (acetilcolinesterasa), PsChE (pseudocolinesterasa), DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico), 2-PDS (2,2'-ditiopiridina). La existencia de diferencias significativas con respecto al grupo control se muestran con \*.

CONCENTRACIÓN DE COUMAPHOS							
Enzima	Método	Dilución	Control	14 $\mu\text{M}$	65 $\mu\text{M}$	230 $\mu\text{M}$	
	DTNB	1:50	1.64 $\pm$ 0.13	1.30 $\pm$ 0.05 (79.3) ***	1.10 $\pm$ 0.06 (67.1) ***	0.93 $\pm$ 0.02 (58.8) ***	
AChE	2-PDS	1:50	2.14 $\pm$ 0.01	1.76 $\pm$ 0.04 (82.2) ***	1.44 $\pm$ 0.01 (67.3) ***	1.29 $\pm$ 0.01 (59.8) ***	
		1:20	1.98 $\pm$ 0.01	1.78 $\pm$ 0.05 (89.9) ***	1.38 $\pm$ 0.09 (69.7) ***	1.30 $\pm$ 0.04 (65.7) ***	
	DTNB	1:50	1.32 $\pm$ 0.04	0.63 $\pm$ 0.05 (47.7) ***	0.19 $\pm$ 0.07 (14.4) ***	0.03 $\pm$ 0.02 (3.0) ***	
PsChE	2-PDS	1:50	1.63 $\pm$ 0.04	0.76 $\pm$ 0.06 (46.6) ***	0.23 $\pm$ 0.01 (14.1) ***	0.04 $\pm$ 0.04 (2.5) ***	
		1:20	1.56 $\pm$ 0.01	0.93 $\pm$ 0.08 (59.6) ***	0.29 $\pm$ 0.05 (18.6) ***	0.13 $\pm$ 0.05 (8.3) ***	

Nivel de significancia: \*\*\*  $p < 0.001$

**Cuadro 5. Exposición “in vivo” a coumaphos.** Actividad colinesterasa ( $\mu\text{mol/ml/min}$ ), desviación estándar y porcentaje de actividad inicial (entre paréntesis). Abreviaturas: ver Cuadro 4. La existencia de diferencias significativas con respecto al grupo control se muestran con \*.

TIEMPO DE INCUBACIÓN								
Enzima	Método	Dilución	0 horas	2 horas	6 horas	24 horas		
AChE	DTNB	1:50	1.30 $\pm$ 0.10	1.31 $\pm$ 0.12 (100.8)	1.30 $\pm$ 0.18 (100.0)	1.00 $\pm$ 0.24 (76.9) *		
		2-PDS	1:50	1.66 $\pm$ 0.11	1.52 $\pm$ 0.25 (91.6)	1.40 $\pm$ 0.18 (84.3)	1.08 $\pm$ 0.28 (65.1) **	
			1:20	1.69 $\pm$ 0.13	1.59 $\pm$ 0.19 (94.1)	1.49 $\pm$ 0.15 (88.2)	1.02 $\pm$ 0.26 (60.4) ***	
PsChE	DTNB	1:50	1.26 $\pm$ 0.16	1.32 $\pm$ 0.24 (104.8)	0.89 $\pm$ 0.24 (70.6) ***	0.21 $\pm$ 0.07 (16.7) ***		
		2-PDS	1:50	1.46 $\pm$ 0.20	1.38 $\pm$ 0.24 (94.5)	0.88 $\pm$ 0.26 (60.3) ***	0.09 $\pm$ 0.07 (6.2) ***	
			1:20	1.50 $\pm$ 0.15	1.32 $\pm$ 0.20 (88.0)	0.85 $\pm$ 0.27 (56.7) ***	0.11 $\pm$ 0.05 (7.3) ***	

Nivel de significancia: \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$

### Ensayo de inhibición “in vivo”

El ensayo de inhibición realizado “in vivo” se muestra en el Cuadro 5. Los efectos inhibidores del insecticida aparecieron en el grupo de las seis horas postexposición en la actividad pseudocolinesterasa, mientras que la acetilcolinesterasa sólo mostró inhibición en

el grupo de las 24 horas. Al igual que ocurría en el ensayo de inhibición “in vitro”, los resultados fueron similares con ambas diluciones y cromóforos utilizados.

## Estudio de correlación

El estudio de correlación realizado entre los valores de actividad enzimática demostró la existencia de una alta correlación entre los resultados obtenidos con ambas diluciones de sangre (coeficiente de correlación superior a 0.96) y entre los diferentes cromóforos (coeficiente de correlación superior a 0.90). Sin embargo, la correlación obtenida entre los valores de actividad no enzimática fue menor, mostrando unos coeficientes de 0.71 entre ambos cromóforos y de 0.52 entre las dos diluciones de sangre entera analizadas con el mismo cromóforo (2-PDS).

## DISCUSIÓN

### *1. Precisión, actividad no enzimática y espectros de absorbancia*

El DTNB, tras su reacción con la tiocolina, da lugar al ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, cuyo rango óptimo de absorbancia se encuentra a 412 nm de longitud de onda. El 2-PDS da como producto de reacción a la 2-tiopiridona, cuya máxima absorbancia se encuentra a 343 nm (GRASSETTI y MURRAY 1967). La hemoglobina presenta su pico de máxima absorbancia a 412 nm, por lo que el empleo de 2-PDS evita su interferencia y permite la utilización de muestras concentradas de sangre (dilución 1:20), mientras que el DTNB sólo puede utilizarse con diluciones más altas (1:50) donde el pico de hemoglobina a 412 nm se encuentra reducido (CERÓN et al., 1996).

Los valores de actividad colinesterasa basal obtenidos fueron ligeramente más altos con 2-PDS que con el empleo del DTNB. Este

hecho podría explicarse por la capacidad del 2-PDS de evitar el efecto de la hemoglobina y poder detectar con mayor precisión cambios significativos en la absorbancia (DONOVAN y ZINKL 1994). Los coeficientes de variación intra y entredeterminaciones obtenidos en este estudio fueron inferiores al 8% con ambos cromóforos, lo cual indica buena precisión y repetibilidad (CERÓN et al. 1996), apoyando el uso de este método para la determinación de actividad colinesterasa en muestras de sangre entera.

Tanto el 2-PDS como el DTNB poseen la capacidad de reaccionar con los grupos sulfhidrilo pertenecientes al glutatión, presente en el interior de los eritrocitos y liberado tras la hemólisis de los mismos, por lo que ambos dieron lugar a la aparición de actividad no enzimática (TIETZE 1969; DASS et al. 1993). Esta tasa de actividad no enzimática fue similar para ambos cromóforos ( $0.33 \pm 0.03$  y  $0.35 \pm 0.04$   $\mu\text{mol/ml/min}$  para 2-PDS y DTNB, respectivamente), y supone aproximadamente un 20% del valor de actividad enzimática determinado en animales libres de exposición a agentes anticolinesterásicos. Esta cifra es ligeramente inferior a la estimada por DASS et al. (1993) para sangre entera de perro (30%), pero es lo suficientemente alta como para provocar una sobreestimación de la actividad tanto acetil como pseudocolinesterasa en caso de encontrarse inhibidas. Por tanto, es recomendable su determinación y sustracción del valor de actividad colinesterasa final.

### **2. Estudio de inhibición**

Las dos diluciones de sangre entera analizadas en el presente trabajo (1:20 y 1:50) mostraron un similar grado de inhibición, tanto de acetil como de pseudocolinesterasa, resultan-

do en una buena correlación entre ambas. De este modo, la utilización de muestras de sangre entera diluida al 1:20 permite la detección de alteraciones en la actividad colinesterasa debidas a exposición a insecticidas organofosforados con total fiabilidad, aunque requiere el uso de cromóforos capaces de evitar el efecto de la presencia de la hemoglobina, como el 2-PDS.

Por otro lado, el empleo de 2-PDS mostró unos resultados de inhibición similares a los obtenidos con DTNB en la dilución 1:50, existiendo por tanto una buena correlación entre ambos cromóforos. Este hecho, junto a la capacidad de analizar muestras más concentradas de sangre, contribuye a recomendar el 2-PDS como cromóforo para la determinación espectrofotométrica de colinesterasa en sangre entera.

En conclusión, la utilización de 2-PDS aporta principalmente dos ventajas sobre el uso del DTNB en la determinación de la actividad colinesterasa en sangre entera: (1) mayor sensibilidad del 2-PDS para detectar cambios en la absorbancia, lo que permite detectar mayor nivel de actividad enzimática; (2) capacidad de utilizar muestras de sangre más concentradas, evitando que una dilución excesiva provoque reactivación de la colinesterasa inhibida (FAIRBROTHER et al. 1991). Estas ventajas hacen que en la especie canina se pueda utilizar 2-PDS como cromóforo de forma alternativa al DTNB para la determinación espectrofotométrica de la actividad acetil y pseudocolinesterasa en muestras de sangre entera.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dña. Carmen Lagares, Directora del Animalario de la Universidad de

Murcia, por su asistencia técnica sin la que no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

## REFERENCIAS

- AUGUSTINSSON K.B., ERIKSSON H., FAIJERSSON Y. 1978. A new approach to determining cholinesterase activities in samples of whole blood. *Clinica Chimica Acta* 89: 239-252.
- CERÓN J.J., FERNANDEZ M.J., BERNAL L., GUTIERREZ, C. 1996. Automated spectrophotometric method using 2,2'-Dithiodipyridine acid for determination of cholinesterase in whole blood. *Journal of the Association Official of Analytical Chemistry International* 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. *Research in Veterinary Science* 67(3): 261-266.
- DASS P.D., VANGOETHEM D.L., STUART B.P., SCHROEDER R.S., PADILLA S.S. 1993. Comparisons of methods of cholinesterase in human and rat; effect of glutathione. *The Toxicologist* 13: 148.
- DELLINGER J., MOSTROM M. 1988. Effects of topical fenthion on blood cholinesterase and vagal tone in dogs. *Veterinary and Human Toxicology* 30(3): 229-234.
- DONOVAN D.A., ZINKL J.G. 1994. Modifications of a cholinesterase method for determination of erythrocyte cholinesterase activity in wild mammals. *J. Wildl. Dis.* 30: 234-240.
- ELLMAN G.L., COURTNEY K.D., ANDRES V., FEATHERSTONE R.M.

1961. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharm.* 7: 88-95.
- 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.
- GRASSETTI D.R., MURRAY J.F. (1967). Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine. *Arch. Biochem. Biophys.* 119: 41-49.
- 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. *American Journal of Industrial Medicine* 22: 231-241.
- TECLES F., MARTÍNEZ SUBIELA S., BERNAL L.J., CERÓN J.J. 2000. Use of whole blood as a sample for spectrophotometric determination of cholinesterase activity in dogs. *The Veterinary Journal*. Aceptado en prensa.
- TIETZE F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal. Biochem.* 27: 502-522.
- 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. *Veterinary and Human Toxicology* 38: 249-253.
- WINTERS D.R., HARPER B.G., RESNICK I.G. 1997. Automated procedure for estimation of blood cholinesterase activities in rabbits. *Laboratory Animal Science* 47: 407-410.