

## **INFLUENCIA DE DIVERSAS CONDICIONES ANALÍTICAS EN LA DETERMINACIÓN DE COLINESTERASA EN SANGRE ENTERA MEDIANTE EL MÉTODO DE ELLMAN**

Influence of several analytical conditions on whole blood cholinesterase activity determination by Ellman method

**F. Tecles, S. Martínez Subiela, J.J. Cerón**

ftecles@um.es

Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, 30100 Espinardo (Murcia), España

### **RESUMEN**

En este trabajo se pretende estudiar y evaluar las principales fuentes de variación que pueden provocar variabilidad en la determinación de colinesterasa en sangre entera. Para este fin se analizaron alícuotas de sangre entera de perro bajo distintas condiciones analíticas. Se observó un aumento de la actividad colinesterasa conforme se incrementó la temperatura de reacción. La mayor actividad colinesterasa se encontró en un intervalo de pH entre 8.0 y 8.5; sin embargo, una fuerte elevación de la hidrólisis no enzimática del sustrato tiene lugar cuando el pH excede de 7.5, lo que haría recomendable el empleo de pH 7.5. Aunque los valores más elevados de actividad se alcanzaron con una concentración del sustrato acetiltiocolina iodada de  $5 \times 10^{-3}$  M y de butiriltiocolina iodada de  $10 \times 10^{-3}$  M, se describió un fuerte aumento de la hidrólisis no enzimática de los sustratos a estas concentraciones, por lo que se prefirió emplear una concentración de ambos sustratos de  $1 \times 10^{-3}$  M. El cromóforo ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico, y los sustratos acetiltiocolina iodada y butiriltiocolina iodada, permanecieron estables al menos durante tres meses si eran conservados a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los datos aportados permitirán contribuir a un mejor conocimiento de las fuentes de variación que afectan a la determinación de colinesterasa en sangre entera, y a la estandarización de las condiciones analíticas utilizadas.

**Palabras clave:** colinesterasa, sangre, análisis, temperatura, pH, concentración, estabilidad

### **SUMMARY**

The main sources of variation that can produce variability on whole blood cholinesterase determinations were studied and evaluated. For this purpose, dog whole blood aliquots were analyzed under different analytical conditions. An increase on cholinesterase activity was observed as reaction temperature was raised. The highest cholinesterase activity was obtained at pH range between 8.0 and 8.5; however, non-enzymatic substrate hydrolysis

was also increased when pH exceeded 7.5, so the use of pH 7.5 would be recommended. Although acetylthiocholine iodide concentration of  $5 \times 10^{-3}$  M and butyrylthiocholine iodide concentration of  $10 \times 10^{-3}$  M yielded the highest cholinesterase activity, an increase of non-enzymatic substrate hydrolysis was also observed at these substrate concentrations, so the use of both substrates at  $1 \times 10^{-3}$  M concentration was preferred. 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid as chromophore, and acetylthiocholine iodide and butyrylthiocholine iodide as substrates, were stable for at least three months if frozen. Based on these results, this work in contributing to a better knowledge of the sources of variation affecting whole blood cholinesterase determination, and the standardization of analytical conditions.

## INTRODUCCIÓN

Los insecticidas organofosforados y carbamatos son utilizados de forma rutinaria como tratamiento contra los parásitos que afectan a la agricultura y a los animales domésticos. El principal efecto tóxico de estos compuestos consiste en la inhibición de las enzimas con actividad colinesterasa (ChE). Por este motivo, la determinación de esta actividad enzimática se emplea, tanto en la práctica clínica como en los estudios de biomonitorización ambiental, como indicador de la exposición de los ecosistemas naturales, de los animales y de los seres humanos a este tipo de insecticidas. Asimismo, también se ha demostrado que otros contaminantes, como algunos detergentes y metales, pueden disminuir la actividad de esta enzima en los organismos vivos (Guilhermino et al., 1998).

Aunque la actividad colinesterasa puede medirse en gran cantidad de tejidos animales, su determinación en la sangre es uno de los procedimientos más extendidos. La sangre posee dos enzimas con actividad colinesterasa: acetilcolinesterasa (AChE) o colinesterasa verdadera, presente en la membrana de los eritrocitos; y butirilcolinesterasa (BChE) o pseudocolinesterasa, que se encuentra en el plasma. Tradicionalmente, los eritrocitos y el plasma han sido muy utilizados para la determinación de colinesterasa. Sin

embargo, el uso de sangre entera proporciona una serie de ventajas (Tecles et al., 2000): (1) no es necesario separar eritrocitos y plasma; (2) se necesita de un volumen de muestra reducido; (3) aumenta la precisión y repetibilidad frente a la obtenida en el análisis de eritrocitos; (4) no se ve afectada por los procesos hemolíticos.

El método de Ellman (Ellman et al., 1961) es uno de los métodos más utilizados para la determinación de colinesterasa en sangre entera. Este método detecta la aparición de tiocolina tras la hidrólisis del sustrato acetiltiocolina (ATCh) por la colinesterasa. La tiocolina reacciona con el cromóforo, el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), para producir un compuesto de color amarillo, el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, que puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 412 nm. Recientemente se ha recomendado el empleo de dos sustratos, acetiltiocolina y butiriltiocolina (BTCh), para analizar una misma muestra de sangre entera, ya que permite la monitorización tanto de AChE como de BChE, y por tanto una detección más precisa de la exposición a agentes inhibidores de la colinesterasa (Tecles y Cerón, 2001).

Los resultados de las determinaciones enzimáticas obtenidos por diferentes laboratorios pueden presentar modificaciones debido principalmente a dos tipos de fuentes de

variación (Marden et al., 1994): preanalíticas (incluyen la variabilidad debida a factores biológicos del individuo y al manejo de las muestras) y analíticas (engloban a aquellos factores relacionados con el método analítico). La influencia de algunas de estas fuentes de variación, como la concentración ideal de cromóforo (Cerón et al., 1996), efecto de los diluyentes (Cerón et al., 1999) y el empleo de diferentes sustratos (Tecles y Cerón, 2001), ha sido ya estudiada en los análisis de colinesterasa realizados en sangre entera. Sin embargo, todavía existe un desconocimiento sobre los efectos que las modificaciones en la temperatura de reacción, pH, concentración de los sustratos, o las condiciones de almacenamiento de los reactivos pueden provocar sobre este tipo de determinaciones.

La falta de estandarización en los análisis de colinesterasa en sangre entera provoca una gran variabilidad en los procedimientos analíticos empleados por diferentes laboratorios, incluso cuando el mismo método es utilizado como base. Este es uno de los problemas principales que afectan a la determinación de la actividad colinesterasa (Wilson y Henderson, 1992). El propósito de este trabajo consiste en estudiar la influencia de algunos parámetros técnicos (temperatura de reacción, estabilidad de reactivos, pH y concentración de sustratos) sobre los análisis de colinesterasa en sangre entera, y de este modo contribuir a resolver los problemas derivados de la falta de un método estándar.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Obtención de las muestras

Se procedió a la obtención de sangre entera de la especie canina, por punción de la

vena cefálica de 10 perros adultos de la raza Braco alemán. Todos los animales estaban sanos, y no habían sido expuestos a ningún insecticida organofosforado o carbamato en los últimos dos meses. Las muestras fueron heparinizadas, y con ellas se constituyó una mezcla que se utilizó para la realización de los diferentes ensayos. Posteriormente, la mezcla fue diluida al 1:50 con agua destilada, siguiendo las recomendaciones de Cerón et al. (1999), y separada en alícuotas que fueron almacenadas en congelación hasta el momento de su utilización.

### Determinación enzimática

Los análisis se realizaron mediante el método de Ellman en un espectrofotómetro automático (Coulter Profile Analyzer, Coulter Scientific, Margency, Francia). Para evaluar el efecto de la temperatura de reacción, se empleó el fotocolorímetro automático Cobas Mira Plus (ABX Diagnostics, Montpellier, Francia), debido a que el Coulter Profile Analyzer únicamente permite utilizar 30° y 37°C.

El cromóforo empleado fue el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB, Sigma Chemical Co, St Louis, USA) a una concentración final de  $0.08 \times 10^{-3}$  M. La disolución tampón-cromóforo se preparó con tampón fosfato 0.1 M y pH 7.5. Como sustratos de la enzima se utilizaron la acetiltiocolina iodada (ATCI, Sigma Chemical Co, St Louis, USA) y la butiriltiocolina iodada (BTCI, Sigma Chemical Co, St Louis, USA), a una concentración final de  $1 \times 10^{-3}$  M. Esta concentración sufrió posteriores modificaciones ( $10 \times 10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M,  $1 \times 10^{-3}$  M,  $0.5 \times 10^{-3}$  M y  $0.1 \times 10^{-3}$  M) con el fin de evaluar su efecto sobre la determinación de colinesterasa.

La actividad colinesterasa se expresó como micromoles de sustrato hidrolizado/ml/min, y fue calculada de la siguiente manera:

Actividad final = incremento de absorbancia a 405 nm de longitud de onda/min x 0.808 x dilución inicial.

0.808 es un factor de conversión igual a  $(1000/13600 \times 1) \times (275/25)$

donde: 1000 es un factor de conversión de mmol/ml a micromol/ml, 13600 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> es el coeficiente de extinción molar del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (producto de reacción entre el DTNB y los ésteres de la colina) a 405 nm de longitud de onda, 1 cm es la longitud de la cubeta de reacción, y 275/25 es la dilución en la cubeta.

Se calcularon dos patrones negativos: el primero constituido por sustrato y cromóforo, con el fin de monitorizar la hidrólisis no enzimática del sustrato, y el segundo por cromóforo y muestra, para evaluar la reacción entre el cromóforo y el glutatión (actividad no enzimática). La actividad colinesterasa corregida se obtuvo tras la sustracción de ambos patrones negativos.

### Efecto de la temperatura de reacción

Se separaron cinco alícuotas de una mezcla de sangre entera, que fueron analizadas con cuatro temperaturas de reacción diferentes: 25°, 30°, 37° y 40°C. El efecto de la temperatura en la hidrólisis no enzimática del sustrato y en la actividad no enzimática también fue monitorizada.

### Estabilidad de los reactivos

Se prepararon disoluciones de cada uno de los reactivos: DTNB, ATCI y BTCl. Pos-

teriormente, las disoluciones se separaron en alícuotas y se almacenaron a temperatura ambiente, en refrigeración y en congelación. Después de 1, 2, 7, 14, 30 y 90 días de conservación, se analizaron cinco muestras de sangre entera utilizando reactivos almacenados (DTNB almacenado con sustratos frescos, y sustratos conservados con DTNB fresco), y posteriormente reactivos frescos (preparados inmediatamente antes de la realización de los análisis). Los resultados obtenidos con los reactivos frescos y conservados fueron comparados después de cada análisis.

### Efecto del pH.

Con el fin de evaluar la influencia del pH en la determinación de acetil y butirilcolinesterasa, cinco alícuotas de una mezcla de sangre entera de perro se analizaron con disoluciones tampón-cromóforo preparadas con tampón fosfato 0.1 M a cinco pH diferentes: 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0. Los sustratos empleados fueron ATCI y BTCl. El efecto del pH sobre la hidrólisis no enzimática de los sustratos y sobre la actividad no enzimática se determinó de igual forma como en el ensayo de la temperatura.

### Efecto de la concentración de sustratos

Se prepararon cinco disoluciones de cada uno de los sustratos, ATCI y BTCl, a las concentraciones de  $110 \times 10^{-3}$  M,  $55 \times 10^{-3}$  M,  $11 \times 10^{-3}$  M,  $5.5 \times 10^{-3}$  M y  $1.1 \times 10^{-3}$  M (las concentraciones finales fueron:  $10 \times 10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M,  $1 \times 10^{-3}$  M,  $0.5 \times 10^{-3}$  M y  $0.1 \times 10^{-3}$  M, respectivamente). Las cinco concentraciones fueron utilizadas para la monitorización de la actividad colinesterasa en cinco alícuotas de

una mezcla de sangre entera de perro. Al igual que en el caso de la temperatura y el pH, la hidrólisis no enzimática del sustrato se determinó en función de la concentración utilizada.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados se realizó con un análisis de varianza de un factor (ANOVA), utilizando un nivel de significación de 0.05. El análisis de rango múltiple se utilizó para realizar la comparación entre medias. Todos los cálculos se realizaron con el programa informático Statgraphics (Statistical Graphics Corp, Rockville, MD, USA).

## **RESULTADOS**

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

El cuadro 1 muestra los valores de actividad acetil y butirilcolinesterasa obtenidos con diferentes temperaturas de reacción. La modificación de la temperatura de reacción provocó cambios significativos ( $p < 0.001$ ) en los resultados. Los valores más elevados de actividad colinesterasa se obtuvieron a 40°C, mientras que el descenso de la temperatura provocó una disminución. La hidrólisis no enzimática de los sustratos también se vio afectada por la temperatura de forma similar. Sin embargo, la actividad no enzimática no cambió en la misma medida.

El cuadro 2 muestra los factores de conversión para diferentes temperaturas encontrados en este trabajo con sangre entera de perro, y los compara con los calculados por

otros autores para el plasma humano y plasma canino, resultando ser muy similares.

### **Estabilidad de reactivos**

Las figuras 1, 2 y 3 muestran los resultados de la determinación de la actividad colinesterasa corregida con reactivos frescos y conservados. No se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos con cromóforo fresco y conservado durante tres meses a 25°, 4° o -20°C. Los sustratos ATCI y BTCl almacenados en congelación no mostraron pérdida de estabilidad después de tres meses. A 4°C, ambos permanecieron estables durante dos semanas, observándose cambios significativos ( $p < 0.001$ ) tras ese tiempo. Hubo descenso significativo ( $p < 0.001$ ) a las 48 horas de almacenamiento de ATCI a 25°C, mientras que no se observaron hasta después de dos semanas con BTCl.

### **Efecto del pH.**

Los resultados obtenidos con la utilización de diferentes pH aparecen en el cuadro 3. La actividad acetil y butirilcolinesterasa se vio significativamente afectada por el pH, incrementándose cuando aumenta el valor de pH y disminuyendo cuando se reduce hasta pH 7.0. La hidrólisis no enzimática de los sustratos se modificó en la misma forma, aunque no hubo diferencias para el sustrato BTCl entre pH 7.0 y 7.5. La actividad no enzimática está relacionada de forma inversa con el pH. De esta manera, los resultados de actividades AChE y BChE corregidas variaron de la siguiente manera: un valor de pH entre 8.0 y 8.5 proporcionó la mayor actividad acetil y butirilcolinesterasa; sin embargo, la hidrólisis

no enzimática de los sustratos experimentó un incremento significativo ( $p < 0.001$ ) si el pH era mayor de 7.5.

### Efecto de la concentración del sustrato

La figura 4 muestra la evolución de la actividad acetil y butirilcolinesterasa corregida con el empleo de diferentes concentraciones de sustrato. La actividad

acetilcolinesterasa alcanzó su máxima actividad con una concentración de ATCI de  $5 \times 10^{-3}$  M, descendiendo al utilizar mayores concentraciones. Sin embargo, la actividad butirilcolinesterasa no decayó con una concentración de BTCI de  $10 \times 10^{-3}$  M. La hidrólisis no enzimática de ambos sustratos mostró un incremento significativo ( $p < 0.001$ ) cuando la concentración de sustrato fue mayor de  $1 \times 10^{-3}$  M.

**Cuadro 1. Efecto de diferentes temperaturas en la determinación de colinesterasa en sangre entera.** Actividad colinesterasa, expresada en  $\mu\text{mol}$  de sustrato hidrolizado/ml/min, y desviación estándar. Los resultados obtenidos a  $37^\circ\text{C}$  fueron considerados como grupo control en el análisis estadístico. \*\*\* ( $p < 0.001$ ); AChE (acetilcolinesterasa); BChE (butirilcolinesterasa); N.E. ATCI (hidrólisis no enzimática de acetiltiocolina); N.E. BTCI (hidrólisis no enzimática de butiriltiocolina); Act. No enzimática (actividad no enzimática). Los valores corregidos se obtuvieron tras la sustracción de ambos blancos.

Actividad ChE	Temperatura			
	25°C	30°C	37°C	40°C
AChE	$1.08 \pm 0.06^{***}$	$1.55 \pm 0.02^{***}$	$1.99 \pm 0.01$	$2.23 \pm 0.01^{***}$
N.E. ATCI	$0.04 \pm 0.01^{***}$	$0.09 \pm 0.01^{***}$	$0.19 \pm 0.01$	$0.21 \pm 0.01^{***}$
BChE	$0.88 \pm 0.01^{***}$	$1.11 \pm 0.01^{***}$	$1.60 \pm 0.01$	$1.71 \pm 0.01^{***}$
N.E. BTCI	$0.02 \pm 0.01^{***}$	$0.02 \pm 0.01^{***}$	$0.08 \pm 0.01$	$0.10 \pm 0.01^{***}$
Act. no enzimática	$0.21 \pm 0.01^{***}$	$0.32 \pm 0.01$	$0.30 \pm 0.01$	$0.32 \pm 0.01$
AChE corregida	$0.83 \pm 0.06^{***}$	$1.14 \pm 0.02^{***}$	$1.50 \pm 0.01$	$1.70 \pm 0.01^{***}$
BChE corregida	$0.65 \pm 0.01^{***}$	$0.77 \pm 0.01^{***}$	$1.22 \pm 0.01$	$1.29 \pm 0.01^{***}$

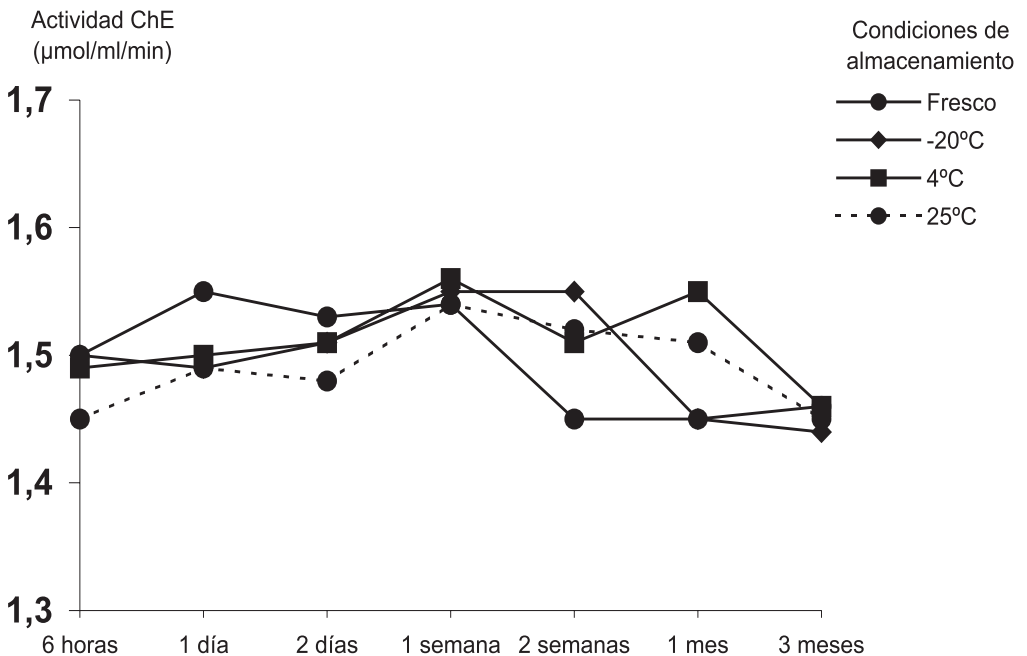
**Cuadro 2. Comparación entre diferentes factores de conversión a  $25^\circ\text{C}$  para acetil y butirilcolinesterasa.** ATCI (acetiltiocolina); BTCI (butiriltiocolina).

	Plasma humano (Kit de Boehringer Mannheim basado en Knedel y Bottger, 1967)	Plasma canino (Carakostas y Landis 1991)	Sangre entera canina (este trabajo)	
	BTCI	ATCI	ATCI	BTCI
25°C	1	1	1	1
30°C	0.78	0.85	0.72	0.84
37°C	0.60	0.7	0.55	0.53

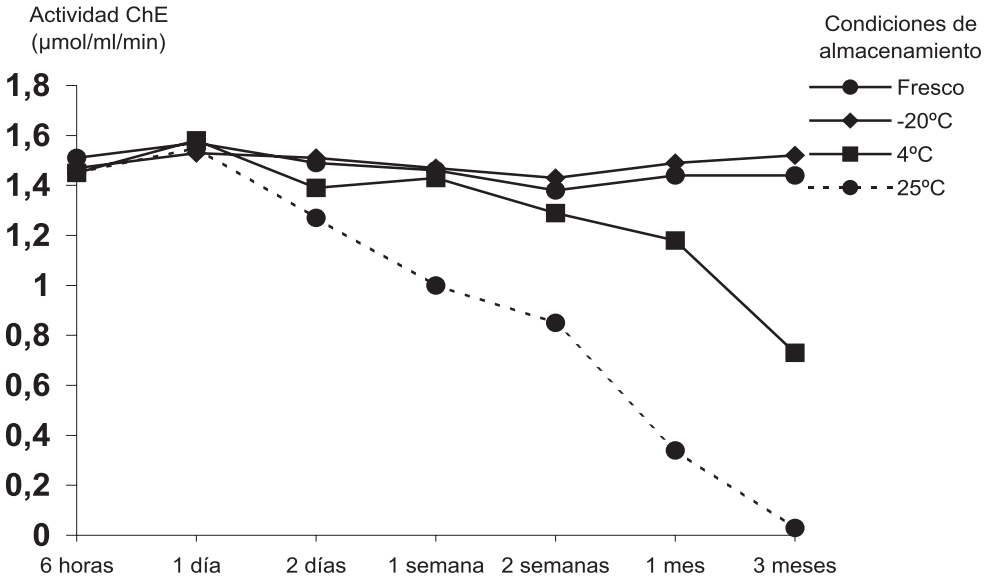
**Cuadro 3. Efecto de diferentes pHs en la determinación de colinesterasa en sangre entera.** Actividad colinesterasa, expresada en  $\mu\text{mol}$  de sustrato hidrolizado/ml/min, y desviación estándar. Los resultados obtenidos a pH 7.5 fueron considerados como grupo control en el análisis estadístico. \*\*\* ( $p < 0.001$ ); AChE (acetilcolinesterasa); BChE (butirilcolinesterasa); N.E. ATCI (hidrólisis no enzimática de acetiltiocolina); N.E. BTCI (hidrólisis no enzimática de butiriltiocolina); Act. No enzimática (actividad no enzimática). Los valores corregidos se obtuvieron tras la sustracción de ambos blancos.

Actividad ChE	PH				
	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
AChE	$1.67 \pm 0.01^{***}$	$1.87 \pm 0.01$	$2.00 \pm 0.02^{***}$	$2.14 \pm 0.02^{***}$	$2.69 \pm 0.02^{***}$
N.E. ATCI	$0.08 \pm 0.01^{***}$	$0.14 \pm 0.01$	$0.22 \pm 0.01^{***}$	$0.38 \pm 0.02^{***}$	$1.09 \pm 0.02^{***}$
BChE	$1.43 \pm 0.01^{***}$	$1.53 \pm 0.01$	$1.63 \pm 0.01^{***}$	$1.85 \pm 0.02^{***}$	$2.08 \pm 0.02^{***}$
N.E. BTCI	$0.04 \pm 0.01$	$0.04 \pm 0.01$	$0.12 \pm 0.01^{***}$	$0.21 \pm 0.01^{***}$	$0.63 \pm 0.01^{***}$
Act. No enzimática	$0.31 \pm 0.01^{***}$	$0.26 \pm 0.01$	$0.23 \pm 0.01^{***}$	$0.18 \pm 0.01^{***}$	$0.13 \pm 0.01^{***}$
AChE corregida	$1.28 \pm 0.01^{***}$	$1.47 \pm 0.01$	$1.55 \pm 0.02^{***}$	$1.58 \pm 0.02^{***}$	$1.47 \pm 0.02$
BChE corregida	$1.08 \pm 0.01^{***}$	$1.23 \pm 0.01$	$1.38 \pm 0.01^{***}$	$1.46 \pm 0.02^{***}$	$1.32 \pm 0.02^{***}$

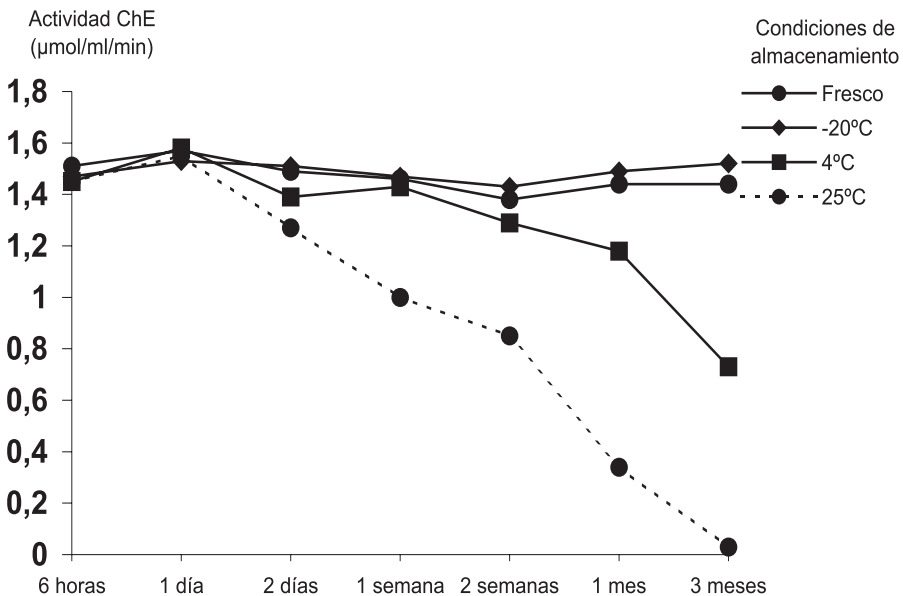
**Figura 1. Actividad colinesterasa con DTNB fresco y conservado.** La actividad se expresa como  $\mu\text{mol}$  de sustrato hidrolizado/ml/min, y corresponde a los valores corregidos tras la sustracción de la actividad no enzimática y la hidrólisis no enzimática de los sustratos.



**Figura 2. Actividad colinesterasa con ATCI fresco y conservado.** La actividad se expresa como  $\mu\text{mol}$  de sustrato hidrolizado/ $\text{ml}/\text{min}$ , y corresponde a los valores corregidos tras la sustratación de la actividad no enzimática y la hidrólisis no enzimática de los sustratos.

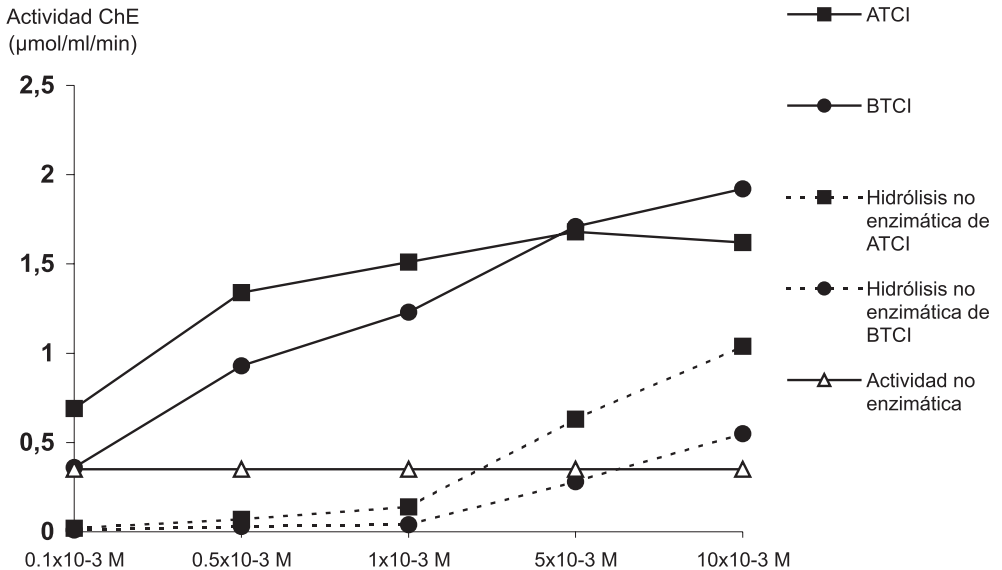


**Figura 3. Actividad colinesterasa con BTCI fresco y conservado.** La actividad se expresa como  $\mu\text{mol}$  de sustrato hidrolizado/ $\text{ml}/\text{min}$ , y corresponde a los valores corregidos tras la sustratación de la actividad no enzimática y la hidrólisis no enzimática de los sustratos.





**Figura 4. Actividad AChE y BChE obtenida con diferentes concentraciones de sustrato.** La actividad se expresa como  $\mu\text{mol}$  de sustrato hidrolizado/ $\text{ml}/\text{min}$ , y corresponde a los valores corregidos tras la sustratación de la actividad no enzimática y la hidrólisis no enzimática de los sustratos.



## DISCUSIÓN

Todos los análisis desarrollados durante este trabajo utilizaron los sustratos ATCI y BTCl ya que, al contrario que con otros animales como rumiantes o cerdo que sólo necesitan ATCI, ambos sustratos son necesarios para una caracterización completa de la colinesterasa de la sangre (Tecles y Cerón, 2001).

La actividad de la enzima colinesterasa es, al igual que muchas otras enzimas, dependiente de la temperatura (Fairbrother et al., 1991). De este modo, se observó un aumento de la actividad colinesterasa conforme se incrementó la temperatura de reacción. La hidrólisis no enzimática del sustrato también resultó más elevada con la temperatura, por lo que debió ser sustraída del resultado final. Estos resultados indican que las modificacio-

nes en la temperatura de reacción provocan la aparición de diferencias significativas en la actividad colinesterasa. En nuestro trabajo recomendamos la realización de los análisis a  $37^{\circ}\text{C}$ , temperatura que ha sido utilizada por numerosos autores (Humiston y Wright, 1967; Wilson et al., 1996; Dass et al., 1997; Winters et al., 1997), y a la que la colinesterasa de numerosos mamíferos alcanza su actividad óptima. Sin embargo, muchos kits comerciales realizan sus determinaciones a temperatura ambiente, ya que evita la necesidad de disponer de sistemas de control de temperatura. Por otra parte, Nostrandt et al. (1993) recomendaron que los análisis deberían ser realizados a  $25^{\circ}\text{C}$  en caso de sospecha de exposición a carbamatos, ya que la colinesterasa inhibida por este tipo de compuestos puede ser reactivada si es sometida a temperaturas elevadas.

Los factores de conversión para diferentes temperaturas, que han sido anteriormente calculados para el plasma humano (kit de Boehringer Mannheim basado en Knedel y Bottger, 1967) y plasma canino (Carakostas y Landis, 1991), son muy similares a los encontrados en este trabajo con sangre entera de perro. Sin embargo, en términos generales, los factores de conversión siempre deben ser utilizados para una misma enzima, condiciones de preparación de las muestras y método analítico, con el fin de evitar errores (Hill y Fleming, 1982). De este modo, los factores de conversión calculados para plasma no son aplicables a la sangre entera.

Ambos sustratos, acetil y butiriltiocolina, resultaron estables al menos durante tres meses en congelación, tiempo superior al descrito por Tor et al. (1994) para la acetiltiocolina. El DTNB permaneció estable al menos tres meses en cualquiera de las temperaturas utilizadas. Estos resultados permitirían un uso más simple y económico de los reactivos.

La capacidad del sitio activo de la colinesterasa para llevar a cabo el ataque nucleofílico sobre el sustrato está influenciada directamente por el pH existente en el medio de reacción. De este modo, la actividad colinesterasa es dependiente del pH (Fairbrother et al., 1991). En nuestro estudio, las actividades acetil y butirilcolinesterasa corregidas alcanzaron su valor máximo en un intervalo de pH entre 8.0 y 8.5. El valor de la hidrólisis no enzimática de los sustratos también se vio incrementado a partir de la utilización de pH 8.0, lo que reduce la sensibilidad de los ensayos y obliga a su cálculo y sustracción como ya sugirieron Matthed y Chapin (1990). Los diferentes autores no se ponen de acuerdo a la hora de realizar sus análisis y han empleado una gran variedad de pHs: pH 8.0 (Harlin y Ross, 1990; Halbrook et al., 1992),

pH 7.6 (Schmidt et al., 1992), pH 7.5 (Cerón et al., 1996), pH 7.4 (Ward y Hess, 1971), pH 7.2 (kits de Boehringer Mannheim y Sigma) o pH 7.0 (Lewis et al., 1981; Tor et al., 1994). Incluso Ellman et al. (1961) utilizó pH 8.0 para la dilución de las muestras, y pH 7.0 para el tampón-cromóforo al encontrar mayor estabilidad del DTNB a este pH. Según los resultados obtenidos, la elección de un pH ideal no resulta fácil. En nuestro laboratorio optamos por utilizar pH 7.5, que se encuentra dentro de los valores de referencia para la especie canina (7.37-7.51) (Russell et al., 1996), y en el que la hidrólisis no enzimática de los sustratos es reducida, por lo que se evitan incrementos no reales de actividad.

La mayor actividad colinesterasa se obtuvo cuando la concentración de los sustratos ATCI y BTCI fue de  $5 \times 10^{-3}$  M y  $10 \times 10^{-3}$  M, respectivamente. Una concentración de ATCI de  $10 \times 10^{-3}$  M provocó la inhibición de la acetilcolinesterasa; pero este efecto no se observó en la butirilcolinesterasa, cuya actividad continuó incrementándose con una concentración de BTCI de  $10 \times 10^{-3}$  M. Este diferente comportamiento de la AChE y BChE con exceso de sustrato ha sido también observado en otros tipos de muestras: la AChE en eritrocitos puede ser inhibida por elevadas concentraciones de ATCI, mientras que las altas concentraciones de BTCI no inhiben a la BChE en plasma. Por otro lado, los reducidos niveles de actividad ChE obtenidos a bajas concentraciones de sustrato (entre 0.1 y  $0.5 \times 10^{-3}$  M) pueden ser debidos a que estas concentraciones no fueron suficientes para alcanzar una cinética de orden cero (Tor et al., 1994; Cerón et al., 1996). Este comportamiento de la AChE y BChE caninas es similar al que se ha observado en sangre entera de la especie humana (Wilson et al., 1996). Con respecto a la hidrólisis no enzimática de los

sustratos se vio significativamente incrementada cuando la concentración excedió de  $1 \times 10^{-3}$  M. sobre la base de estos resultados, en nuestro trabajo preferimos la utilización de una concentración, tanto de ATCI como de BTCI, de  $1 \times 10^{-3}$  M para la determinación de acetil y butirilcolinesterasa en sangre entera. De este modo, obtenemos una mayor actividad que con bajas concentraciones ( $0.1$  y  $0.5 \times 10^{-3}$  M), y una menor hidrólisis no enzimática de los sustratos que con elevadas concentraciones ( $5$  y  $10 \times 10^{-3}$  M).

Muchos kits comerciales recomiendan el empleo de una concentración de sustrato de  $5 \times 10^{-3}$  M o mayor, y en un estudio entre laboratorios el 77% de los participantes utilizaron ATCI a una concentración mayor de  $4.68 \times 10^{-3}$  M (Marden et al., 1994). En caso de utilizar estas concentraciones en muestras de la especie canina, sería necesario la determinación de la hidrólisis no enzimática de los sustratos y la corrección de la actividad colinesterasa, con el fin de prevenir incrementos no reales de esta enzima. Se ha demostrado que la falta de esta corrección provoca una sobreestimación de la actividad ChE en muestras de sangre entera inhibidas por organofosforados (Wilson et al., 1996).

Por todo lo anteriormente expuesto, concluimos que las condiciones consideradas como idóneas para la determinación de la actividad colinesterasa en sangre entera son: temperatura de reacción  $37^{\circ}\text{C}$ , pH 7.5, y concentración de sustrato  $1 \times 10^{-3}$  M. Además, tanto el cromóforo DTNB como los sustratos ATCI y BTCI pueden ser almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  por un tiempo mínimo de tres meses sin perder su capacidad para el análisis. Los resultados y conclusiones obtenidas en este trabajo contribuirán a un mejor entendimiento de los factores que pueden influir en la determinación de colinesterasa, y al estableci-

miento de unas condiciones ideales de análisis que pueden optimizar el método y reducir la variabilidad existente entre laboratorios diferentes. El conocimiento y control de estas fuentes de variación mejorará la sensibilidad del ensayo, lo que puede ser especialmente útil para detectar la exposición subclínica a organofosforados y carbamatos, ya que el descenso de actividad es menor en estos casos (Wilson et al., 1997). Debido a que este trabajo se ha desarrollado en la especie canina, sería recomendable realizar estudios similares en otras especies domésticas, aves y peces.

## REFERENCIA

- CARAKOSTAS M.C., LANDIS M.A. 1991. Modification of an automated method for determining plasma and erythrocytes cholinesterase activity in laboratory animals. *Veterinary and Human Toxicology* 33: 450-456.
- CERÓN J.J., FERNÁNDEZ M.J., BERNAL L., GUTIÉRREZ C. 1996. Automated spectrophotometric method using 2,2'-dithiodipyridine acid for determination of cholinesterase in whole blood. *Journal of 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: 261-266.
- DASS P.D., OFFUTT D.M., MEJIA M.R., VANGOETHEM D., CHRISTENSON W.R., LANDES M.M., STUART B.P., SANGHA G.H., THYSSEN J.H. 1997. Comparative kinetic analysis of cholinesterase methods in rat and human

- erythrocytes and plasma. *Veterinary and Human Toxicology* 39: 11-17.
- ELLMAN G.L., COURTNEY K.D., ANDRES V., FEATHERSTONE R.M. 1961. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 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 Wildlife and the Environment*. Mineau P. Ed. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Holanda, 35-72.
- GUILHERMINO L., BARROS P., SILVA M.C., SOARES A. 1998. Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned?. *Biomarkers* 3: 157-163.
- 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. *Journal of the Veterinary Medical Association* 202: 714-725.
- HARLIN K.S., ROSS P.F. 1990. Enzymatic-spectrophotometric method for determination of cholinesterase activity in whole blood: collaborative study. *Journal of Association Official of Analytical Chemistry* 73: 616-619.
- HILL E.F., FLEMING W.J. 1982. Anticholinesterase poisoning of birds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1: 27-38.
- HUMISTON C.G., WRIGHT G.J. 1967. An automated method for the determination of cholinesterase activity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 10: 467-480.
- KNEDEL M., BOTTGER R. 1967. A kinetic method for determination of the activity of pseudocholinesterase (acylcholine acyl-hydrolase 3.1.1.8.). *Klin Wochenschr* 45: 325-327.
- LEWIS P.J., LOWING R.K., GOMPERTZ D. 1981. Automated discrete kinetic method for erythrocyte acetylcholinesterase and plasma cholinesterase. *Clinical Chemistry* 27: 926-929.
- MARDEN B.T., FAIRBROTHER A., BENNETT J.K. 1994. Interlaboratory comparison of cholinesterase assay measurements. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13: 1761-1768.
- MATTHEW C.B., CHAPIN C.L. 1990. Spectrophotometric determinations of circulating cholinesterases in rats. *Aviation, Space and Environmental Medicine*: 374-378.
- NOSTRANDT A.C., DUNCAN J.A., PADILLA S. 1993. A modified spectrophotometric method appropriate for measuring cholinesterase activity in tissue from carbaryl-treated animals. *Environmental and Applied Toxicology* 21: 196-203.
- RUSSELL K.E., HANSEN B.D., STEVENS J.B. 1996. Strong ion difference approach to acid-base imbalances with clinical applications to dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 26: 1185-1201.
- SCHMIDT E., GERHARDT W., HENKEL E., KLAUKE R., LIESE W., LORENTZ K., SONNTAG O., STEIN W., WEIDERMANN G. 1992. Proposal of

- standard methods for the determination of enzyme catalytic concentrations in serum and plasma at 37°C. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 30: 163-170.
- TECLES F., MARTÍNEZ SUBIELA S., BERNAL L.J., CERÓN J.J. 2000. Use of whole blood for spectrophotometric determination of cholinesterase activity in dogs. *The Veterinary Journal* 160: 242-249.
- TECLES F., CERÓN J.J. 2001. Determination of whole blood cholinesterase on different animal species using specific substrates. *Research in Veterinary Science* (accepted in press).
- TOR E.R., HOLSTEGE D.M., GALEY F.C. 1994. Determination of cholinesterase activity in brain and blood samples using a plate reader. *Journal of Association Official of Analytical Chemistry International* 77: 1308-1313.
- WARD F.P., HESS T.L. 1971. Automated cholinesterase measurements: canine erythrocytes and plasma. *American Journal of Veterinary Research* 32: 499-503.
- WILSON B.W., HENDERSON J.D. 1992. Blood esterase determinations as markers of exposure. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 128: 55-69.
- WILSON B.W., 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. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 48: 187-195.
- WILSON B.W., SANBORN J.R., O'MALLEY M.A., HENDERSON J.D., BILLITTI J.R. 1997. Monitoring the pesticide-exposed worker. *Occupational Medicine* 12: 347-363.
- WINTERS D.R., HARPER B.G., RESNICK I.G. 1997. Automatic procedure for estimation of blood cholinesterase activities in rabbits. *Laboratory Animal Science* 47: 407-410.