

Uso de la actividad colinesterasa para el diagnóstico de intoxicaciones por insecticidas organofosforados y carbamatos

Use of cholinesterase activity in the diagnosis of acute intoxications by organophosphorus and carbamate insecticides

Juan Pérez M,¹ M.Sc, Martha Olivera A,¹ Ph.D, María Ruiz O,¹ MV, David Villar A,¹ Ph.D, Carlos Giraldo E,^{1*} M.Sc.

¹Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo Vericel. Medellín, Colombia.

*Correspondencia: cargiraldo@gmail.com

Recibido: Octubre de 2010; Aceptado: Diciembre de 2011.

RESUMEN

Objetivo. La medición de la actividad colinesterasa (ChE) es una prueba rápida y económica que se emplea en el diagnóstico de intoxicaciones por insecticidas organofosforados y carbamatos. Como la interpretación por el laboratorio requiere valores de referencia para cada especie, en este estudio se establecieron las actividades de ChE normales en sangre, cerebro y retina de varias especies de animales domésticos mediante el método de Ellman. **Materiales y métodos.** Se obtuvieron encéfalos y globos oculares en el matadero central de Medellín, mientras que las muestras de sangre procedieron de animales remitidos al laboratorio de diagnóstico clínico de la Universidad de Antioquia. **Resultados.** Las medias (\pm D.E.) de actividad ChE sanguínea, expresada en μ moles de acetiltiocolina iodada hidrolizada/min/mL, fueron de 2.4 ± 0.2 , 1.5 ± 0.3 , 1.9 ± 0.3 y 2.5 ± 0.2 para caninos, felinos, equinos y bovinos, respectivamente. En el encéfalo, la actividad ChE (μ mol/min/g peso fresco), fue de 4.0 ± 0.4 , 5.4 ± 0.3 y 4.9 ± 0.3 , en bovinos, porcinos y caninos, respectivamente. La retina bovina mostró una actividad de 21.7 ± 2.45 μ mol/min/g. **Conclusiones.** Los valores obtenidos coinciden ampliamente con los reportados por laboratorios certificados por la Asociación Americana de Laboratorios de Diagnóstico Veterinarios (AAVLD), corroborando la buena reproducibilidad de la técnica y validando su uso como apoyo al diagnóstico de intoxicaciones por insecticidas inhibidores de la colinesterasa.

Palabras clave: Animales domésticos, colinesterasa, encéfalo, sangre, retina (*Fuentes: CAB, DeCS*).

ABSTRACT

Objective. The measurement of cholinesterase activity (ChE) is a rapid and inexpensive test used in the diagnosis of intoxications by organophosphorus and carbamate insecticides. As the interpretation by laboratories entails reference values for each species, the present study was aimed to establish normal ChE activities in blood, brain and retina of several species of domestic animals by the use of the Ellman method. **Materials and methods.** Brains and eyeballs were obtained from Medellín's central slaughterhouse, while blood samples came from animals referred to the clinical diagnostic laboratory from the University of Antioquia. **Results.** The mean (\pm SD) of blood ChE activity, expressed as μ moles of iodide hydrolyzed acetylthiocholine/min/mL, were 2.4 ± 0.2 , 1.5 ± 0.3 , 1.9 ± 0.3 and 2.5 ± 0.2 for canines, felines, equines and bovines, respectively. In

the brain, ChE activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ wet weight) was 4.0 ± 0.4 , 5.4 ± 0.3 and 4.9 ± 0.3 , in bovines, porcine, and canines, respectively. The bovine retina showed an activity of 21.7 ± 2.45 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$. **Conclusions.** The values obtained coincide with those reported by laboratories accredited by the American Association of Veterinary Diagnostic Laboratories (AAVLD), confirming its ease to reproduce the technique and validating its use to support the diagnosis of intoxications by cholinesterase inhibitors..

Key words: Blood, brain, cholinesterase, domestic animals, retina (*Sources: CAB, DeCS*).

INTRODUCCIÓN

En la práctica veterinaria, la medición de la actividad colinesterasa (ChE) es una prueba rápida y económica que se emplea en el diagnóstico presuntivo de intoxicaciones por insecticidas organofosforados (OF) y carbamatos. Ambos grupos de insecticidas no solo son los de uso más corriente en el medio agrícola, sino que además se comercializan como rodenticidas y tienen aplicación terapéutica como endectocidas. Por ello, las posibles fuentes de exposición en animales pueden ser muy variadas dependiendo del entorno en que viva el animal. Por lo general, la confirmación de que un animal presenta una intoxicación aguda por un insecticida OF/carbamato debería ir acompañada de: a) una historia y presentación clínica compatible con la esperada por exposición a compuestos inhibidores de la ChE, b) medición de una actividad ChE deprimida y que en última instancia es responsable del cuadro clínico, y por último c) la detección química del insecticida a concentraciones que confirmen una exposición tóxica. Si se tiene evidencia clara de que ha existido exposición al insecticida, entonces no suele ser necesario demostrar su presencia en tejidos o ingesta para confirmar el diagnóstico (1).

La selección de la muestra biológica indicada para el análisis de la ChE depende principalmente de que el animal esté vivo o muerto. Para casos post-mortem, la muestra adecuada es el encéfalo por cuanto la toxicidad de estos insecticidas viene dada por el grado de inhibición de la ChE en sinapsis del sistema nervioso central y periférico. Lo normal en intoxicaciones letales por inhibidores de la ChE es que la actividad ChE cerebral se encuentre severamente suprimida (2). No obstante, el encéfalo no siempre resulta una muestra de uso e interpretación fácil ya que, por una parte, es de difícil extracción, y por otro lado, existe muy poca homogeneidad en la actividad ChE entre distintas áreas del mismo encéfalo (3). Alternativamente, y como complemento, también se ha usado la retina, por ser básicamente un tipo de tejido nervioso complejo con aproximadamente cuatro a cinco veces mayor actividad ChE que la encefálica, y que en caso de intoxicaciones letales presenta

un descenso de la actividad ChE de forma paralela a como lo hace el cerebro (4, 5).

En animales vivos, la muestra ideal para confirmar una sospecha de exposición o intoxicación es sangre total no coagulada y remitida en tubos con EDTA sódico o heparina. Cuando se producen exposiciones agudas, la actividad ChE sanguínea suele deprimirse más rápidamente y en mayor grado que la encefálica (6). Sin embargo, y a diferencia de la actividad cerebral, para poder interpretar correctamente la actividad en sangre, es importante conocer que el animal no haya sido recientemente tratado con endectocidas inhibidores de la actividad ChE, debido a que la simple aplicación terapéutica puede llegar a causar una inhibición de hasta un 80% de la actividad ChE sanguínea normal sin que el animal presente alguna sintomatología (6).

En el laboratorio, la interpretación de los resultados de actividad ChE se realiza comparándola con valores de referencia normales para cada una de las especies. Como es corriente que existan variaciones entre los valores normales obtenidos por cada laboratorio, se recomienda que cada centro de diagnóstico genere sus propios valores de referencia. Por tanto, el principal objetivo de este estudio fue sugerir valores de ChE normales, en algunas especies domésticas del entorno de Medellín, para posteriormente, elaborar estándares de referencia internos que sirvan para el diagnóstico de exposiciones e intoxicaciones por insecticidas OF y carbamatos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio. Descriptivo, de corte transversal.

Aval comité de ética. Este estudio fue realizado con tejidos de matadero de bovinos y porcinos y con muestras de sangre de animales sanos, donde se pidió el consentimiento informado de los propietarios.

Recolección de muestras. Los encéfalos y retinas se obtuvieron de bovinos (n=7) y cerdos (n=5) sacrificados en las últimas 12 horas en la planta de beneficio de Medellín y que posteriormente se mantuvieron congeladas a -20°C hasta su análisis. Los cerebros caninos se obtuvieron de cinco animales que murieron por intoxicación con fluoroacetato sódico, y cuya actividad ChE debe ser normal con respecto a los valores fisiológicos, ya que este rodenticida no afecta la actividad colinesterasa. La sangre se obtuvo de muestras recibidas en el Laboratorio de Unidad de Diagnóstico de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia, de las siguientes especies: caninos (n=11), felinos (n=5), equinos (n=12), y bovinos (n=5). Debido a que gran parte de la actividad colinesterasa sanguínea se localiza en los eritrocitos, tan solo se seleccionaron muestras de animales con hematocritos y hemoglobinas normales, y sin sospecha de padecer intoxicaciones.

Procesamiento de muestras. La actividad colinesterasa se determinó mediante el método de Ellman (7) con las modificaciones de Harlin y Ross (8) para la sangre, y de Harlin y colaboradores (4) para el cerebro y retina. Una vez descongelados los encéfalos completos (incluyendo cerebelo y tronco encefálico), se procesaron en una batidora durante dos a tres minutos hasta conseguir una mezcla homogénea del tejido. Las retinas se extrajeron del globo ocular teniendo precaución de no arrastrar el pigmento negro del iris.

Encéfalo y retinas. La homogenización se realizó en un tampón fosfato (0.1 M, pH 8.0) que contenía 1% de Triton-X, a razón de 0.5 g/25 mL (encéfalos) y 0.1 g/10 mL (retinas), y mediante maceración intensa en un mortero. La medición de la actividad ChE se llevó a cabo en un volumen final de 3 mL que contenía sucesivamente: 2.7 mL de tampón fosfato (0.1 M, pH 8) con Triton-X al 1%, 200 µL del homogeneizado cerebral o retinal, 50 µL de DTNB (solución de ácido ditiobisnitrobenzoico al 0.01 M en tampón), y finalmente 20 µL del sustrato enzimático ACTI (solución de acetiltiocolina iodada al 0.075 M en H₂O destilada) (4).

Sangre. Se diluyeron 10 µL de sangre anticoagulada en 10 mL de tampón fosfato (0.1 M, pH 8.0). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 3 mL que contenían sucesivamente: 2.9 mL de la dilución 1:1000 de sangre, 50 µL de DTNB (solución de ácido ditiobisnitrobenzoico al 0.01 M en tampón) y finalmente 20 µL del sustrato enzimático ACTI (solución de acetiltiocolina iodada al 0.075 M en H₂O destilada).

Espectrofotometría y cálculo de actividad ChE. El cambio de absorbancia/min se midió a 412

nm durante 6 minutos en un espectrofotómetro de ultravioleta (Thermo Scientific Biomate 3 UV-Visible spectrophotometer) a una temperatura aproximada de 25°C. La actividad expresada en µmoles de acetiltiocolina iodada hidrolizada/minuto/gramo de tejido fresco se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$\mu\text{moles}/\text{min}/\text{g} = \text{Abs}/\text{min} \times \text{factor de conversión}$$

$$\text{Factor de conversión} = [1000 / (1.36 \times 10^4 \times 1)] \times \text{DF}$$

donde $1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ = coeficiente de extinción de anión amarillo DNTB; 1000 = conversión de mmol/mL a µmol/mL; 1 = ancho de la cubeta, cm; y DF = factor de dilución = 1000 (sangre); 750 (encéfalo), 1500 (retina). Los factores de conversión fueron de 73.53 (sangre), 55 (cerebro), 110 (retina). Cada muestra se analizó por duplicado y se obtuvo la media como valor final. Los valores para cada especie se expresan como actividad media ± desviación estándar.

La precisión de la técnica, se calculó con la misma muestra de encéfalo bovino, realizando diez repeticiones el mismo día, y en diez días distintos, dando como coeficientes de variación intraensayo el 6% e interensayo un 8%.

RESULTADOS

La media (±D.E.) de actividad ChE en µmol/min/mL de sangre fue de 2.37 ± 0.22 (n=11), 1.52 ± 0.28 (n=5), 1.91 ± 0.34 (n=12) y 2.52 ± 0.22 (n=5), para caninos, felinos, equinos y bovinos, respectivamente.

La figura 1 representa el valor medio de actividad ChE para cada una de las especies, así como el punto de corte correspondiente a dos

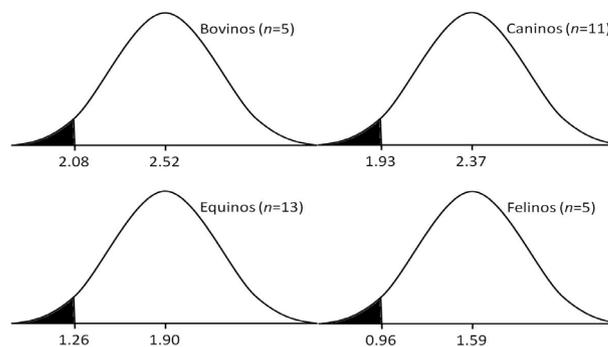


Figura 1. Media de la actividad colinesterasa (µmol/min/mL) en sangre de caninos, felinos, bovinos y equinos. Por debajo del punto de corte (zona negra) la actividad se consideraría menor del valor normal para la especie y compatible con una exposición a un inhibidor de las colinesterasas (explicación en el texto).

desviaciones estándares por debajo de la media, y por debajo del cual la enzima se consideraría inhibida. En el encéfalo, la actividad ChE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ peso fresco), fue de 4.0 ± 0.4 ($n=7$), 5.4 ± 0.3 ($n=5$), y 4.92 ± 0.32 ($n=5$) en bovinos, porcinos y caninos, respectivamente. La retinas bovinas mostraron una actividad de 21.7 ± 2.45

$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ($n=11$), aproximadamente unas 5.5 veces más actividad que los encéfalos procedentes de los mismos animales.

La tabla 1 muestra los valores obtenidos en este estudio junto con los reportados por otros laboratorios para las mismas especies y muestras biológicas usando la misma metodología.

Tabla 1. Valores de actividad colinesterasa* reportados en el presente estudio y por distintos laboratorios en varias especies domésticas.

Especie/Tejido	N	Media \pm D.E	Rango (min-máx.)	Ref
BOVINO				
Corteza Cerebral	33	2.47 \pm 0.76		9
	21	3.01 \pm 0.14	1.91-4.28	10
Cerebro completo	5	4.01 \pm 0.45	3.62-4.87	Ψ
	51	4.07 \pm 0.75		4
		3.96	2.09-5.69	†
Retina	11	21.73 \pm 2.46	16.35-25.55	Ψ
	10	19.57 \pm 3.13		4
		19.74	8.76-30.3	†
Sangre	5	2.52 \pm 0.21	2.32-2.82	Ψ
	2	2.68 \pm 0.61		4
		2.15	1.12-3.41	†
EQUINO				
Corteza Cerebral	3	2.31 \pm 0.57		9
Cerebro completo	10	4.0 \pm 0.7	2.6-5.0	3
Retina	10	11.0 \pm 2.3	7.3-14.6	3
Sangre	13	1.91 \pm 0.33	1.5-2.5	Ψ
		1.88	1.28-2.74	†
PORCINO				
Corteza Cerebral	8	2.72 \pm 1.24		9
	15	3.88 \pm 0.27	1.58-5.96	10
Cerebro completo	5	5.42 \pm 0.33	4.95-5.82	Ψ
		5.76	3.19-8.89	†
CANINO				
Corteza Cerebral	13	3.21 \pm 1.6		9
Cerebro completo	3	4.92 \pm 0.32	4.55-5.13	Ψ
		3.91	2.88-5.10	†
Sangre	11	2.35 \pm 0.22	2.08-2.79	Ψ
		1.46	0.70-2.11	†
	23	1.59 \pm 0.19		11
FELINO				
Corteza Cerebral	8	7.30 \pm 2.51		9
Cerebro completo	3	10.11 \pm 0.61		5
Retina	3	3.96 \pm 0.77		5
Sangre	5	1.52 \pm 0.28	1.1-1.87	Ψ
	3	1.69 \pm 0.28		5
		1.38	0.66-2.23	†

*Valores de actividad expresados en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ (cerebro, retina) y $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ (sangre) a 25°C. Todos los trabajos utilizaron la misma técnica basada en el método de Ellman et al, 1961. †Dr Wilson Rumble. Comunicación personal de los valores que manejan en Michigan State University (Septiembre, 2009). Ψ Estudio presente.

DISCUSIÓN

Los valores de actividad obtenidos en este estudio son muy similares a los tabulados por laboratorios que usan la misma metodología y están acreditados por la Asociación Americana de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario (12) (Tabla 1). Comparando los valores presentes con estudios procedentes de la Universidad de Illinois, que usaron el mismo procesamiento para el encéfalo, retina y sangre de bovino (4), o sangre de felino (5), la media y variación de actividad ChE fue muy similar. De igual manera, los valores procedentes de la Universidad de Michigan (Tabla 1, Rumble, comunicación personal), coinciden para todos los tejidos excepto para los de sangre canina, en que la actividad obtenida en este estudio es paradójicamente algo superior a la reportada en otros laboratorios (11,13). Como se puede observar en la tabla 1, algunos laboratorios prefieren utilizar la corteza cerebral en vez del encéfalo, probablemente por la menor cantidad de muestra requerida, permitiendo así conservar el resto del órgano para realizar análisis posteriores. No obstante, ello implica que se excluyan áreas de una gran actividad ChE, como son el cerebelo y tronco encefálico, y que hace que los valores normales obtenidos para la corteza cerebral siempre resulten ligeramente inferiores a los del encéfalo completo (3). En el presente estudio se utilizó el encéfalo completo para evitar excluir áreas con distinta actividad y así favorecer la homogeneidad entre muestras de animales distintos.

Uno de los principales desafíos a la hora de interpretar la actividad ChE lo constituye determinar el porcentaje de descenso que sería indicativo de una exposición o intoxicación por inhibidores de la ChE. Por lo general, en casos de intoxicaciones letales por insecticidas OF/carbamatos, la actividad ChE encefálica suele deprimirse >50% y lo normal es observar actividades de tan solo el 20-25% de la actividad normal (4,10,14). A diferencia del cerebro, se ha observado que la actividad colinesterasa en sangre es mucho más sensible a inhibidores, y puede reducirse casi por completo con exposiciones terapéuticas a insecticidas que

ni siquiera llegan a producir signos clínicos de toxicosis (6,15). Para muchos parámetros bioquímicos de patología clínica, incluyendo la actividad ChE (2), se establecen como valores anormales aquellos que se encuentran dos desviaciones estándares por encima o debajo de la media aritmética. Ésta es básicamente una forma conservadora de expresar que los valores obtenidos están fuera de la curva de distribución normal que incluiría el 95% de individuos de una población. Basándose en dicho criterio, los umbrales que se considerarían como inhibitorios para la actividad ChE en sangre se representan gráficamente en la figura 1. No obstante, la experiencia muestra que en animales con intoxicaciones agudas, lo normal es encontrar valores de ChE sanguíneos prácticamente nulos o muy por debajo de la curva de distribución normal (6).

Otro aspecto de gran interés práctico para el veterinario, es la preservación de las muestras hasta su llegada al laboratorio. Con respecto a la estabilidad post-mortem de la actividad ChE, otros estudios han demostrado que la enzima cerebral es muy estable a temperatura ambiente (25°C) durante varios días (incluso seis días) después de la muerte (10). Esto implica que cerebros recolectados varios días después de

la muerte pueden retener la actividad ChE y por tanto ser de interés diagnóstico. No obstante, cuando las temperaturas ambiente se acercaban a los 37°C se observó que la actividad normal disminuía rápidamente en pocas horas (10); lo que podría dar lugar a una interpretación errónea de la actividad como si la enzima estuviese inhibida. Por ello y para evitar el efecto de la descomposición post-mortem, lo ideal en casos de sospechas de intoxicación es extraer el encéfalo y/o globo ocular cuanto antes después de la muerte, y enviar las muestras en estado congelado o refrigeradas al laboratorio. Por su parte, la sangre se ha visto que mantiene la actividad ChE durante al menos dos semanas si se conserva a temperatura de refrigeración (4°C), mientras que temperaturas de $\geq 25^\circ\text{C}$ provocan un descenso rápido (horas) de la actividad normal (10, 13).

En conclusión, este estudio pone de manifiesto que la actividad ChE en distintos tejidos animales puede ser fácilmente reproducible entre laboratorios y se han establecido valores de referencia internos que son esenciales a la hora de diagnosticar casos de intoxicación por compuestos inhibidores de la colinesterasa.

REFERENCIAS

1. Tecles F, Cerón JJ. Determinación espectrofotométrica de colinesterasa en sangre entera de animales domésticos: factores pre y analíticos. *An Vet (MURCIA)* 2003; 19:61-76.
2. Fairbrother A, Bennett JK. The usefulness of cholinesterase measurements. *J Wildl Dis* 1988; 24:587-590.
3. Plumlee KH, Tor ER. Total cholinesterase activity in discrete brain regions and retina of normal horses. *J Vet Diagn Invest* 1997; 9:109-110.
4. Harlin KS, Hamdy S, Beasley VR. Preliminary studies with bovine retina cholinesterase determinations in organophosphorus insecticide poisoning. *J Vet Diagn Invest* 1989; 1:356-358.
5. Harlin KS, Dellinger JA. Retina, brain and blood cholinesterase levels in cats treated with oral dochlorvos. *Vet Hum Toxicol* 1993; 35:201-203.
6. Osweiler GD, Carson TD, Buck WB, Van Gelder GA. Organophosphorus and carbamate Insecticides. En: *Clinical and Diagnostic Veterinary Toxicology*. Tercera edición. Dubuque, Iowa: Kendall/Hunt Publishing Company; 1985.
7. Ellman GL, Courtney KD, Andres VJ, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7:88-92.
8. Harlin KS, Ross PF. Enzymatic-spectrophotometric method for determination of cholinesterase activity in whole blood: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 1990; 74:616-619.
9. Blakey BR, Yole MJ. Species differences in normal brain cholinesterase activities of animals and birds. *Vet Hum Toxicol* 2002; 44:129-132.

10. Mount ME, Oehme FW. Brain cholinesterase activity in healthy cattle, swine, and sheep and in cattle and sheep exposed to cholinesterase inhibiting insecticides. *Am J Vet Res* 1981; 42:1345-1350.
11. Kolf-Clauw M, Jez S, Ponsart C, Delamanche I. Acetyl- and pseudo-cholinesterase activities of plasma, erythrocytes, and whole blood in male Beagle dogs using Ellman's assay. *Vet Hum Toxicol* 2000; 42:216-218.
12. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Accreditation. [consultada: 3 de octubre de 2011]. URL Disponible en: <http://www.aavld.org/accreditation>.
13. Tecles F, Gutiérrez Panizo C, Martínez Subiela S, Cerón JJ. Effects of different variables on whole blood cholinesterase. *J Vet Diagn Invest* 2002; 14:132-139.
14. Khan O. Organophosphate poisoning in a group of replacement heifers and dry cows. *Can Vet J* 2001; 42:561-563.
15. Hooser SB, Beasley VR, Sundberg JP, Harlin KH. Toxicologic evaluation of chlorpyrifos in cats. *Am J Vet Res* 1988; 49:1371-1375.