

EFFECTO DE DIFERENTES TECNICAS DE HEMOLISIS SOBRE LA ACTIVIDAD ACETILCOLINESTERASA

M. C. LOPEZ-LOPEZ, R. HERMOSO, M. MONTEOLIVA

RESUMEN

Se evalua el efecto de diferentes métodos de ruptura eritrocítica sobre la actividad acetilcolinesterasa, utilizando tejido sanguíneo humano, vacuno y porcino.

Los procedimientos ensayados son: Congelación, sonicación y agitación con agua destilada; utilizándose el sistema pH-stat como técnica de medida cuantitativa de la actividad enzimática, con los sustratos acetilcolina y butirilcolina a una concentración de $4.2 \times 10^{-3}M$.

En todos los casos obtenemos un valor enzimático mayor al de hematies intactos, estimando que la sonicación es la técnica más adecuada.

PALABRAS CLAVES: Acetilcolinesterasa, hemolisis, pH-stat.

SUMMARY

The effect of different erythrocyte breaking methods on acetylcholinesterase activity, using human, cattle and pig blood tissue, was studied.

The procedures tested were: Deep-freezing, sonication and shaking in distilled water; the pH-stat system was used as the quantitative procedure to measure the enzymatic activity, with acetylcholine and butyrylcholine as substrates at a concentration of $4.2 \times 10^{-3}M$.

With all the techniques, a greater enzymatic value than that corresponding to intact erythrocytes was found, estimating sonication as the most adequate method.

KEY WORDS: Acetylcholinesterase, haemolysis, pH-stat.

RESUME

Nous avons étudié l'effet des différentes méthodes de rupture d'érythrocytes sur l'activité acétylcholinesterase, en utilisant du sang humain, bovin et porcin.

Les méthodes essayées sont les suivantes: congélation, sonication et agitation dans l'eau distillée. Le système pH-stat a été utilisé comme procédé de mesure quantitative de l'activité enzymatique, avec les substratums acetylcholine et butyrylcholine à une concentration de 4.2×10^{-3} M.

Dans tous les cas, nous avons trouvé une valeur enzymatique plus élevée que celle des hématies intactes, en jugeant la sonication comme la méthode la plus appropriée.

MOTS CLES: Acétylcholinesterase, hémolyse, pH-stat.

INTRODUCCION

Aunque se ha progresado en la lucha contra los vectores de las enfermedades parasitarias y plagas agrícolas por vías alternativas no contaminantes, sigue siendo indispensable el uso de los plaguicidas. El mecanismo de acción de los plaguicidas organofosforados interfiriendo el paso de impulsos nerviosos por inhibición del enzima acetilcolinesterasa, es a su vez el mecanismo tóxico de dichos compuestos (1, 2, 3). Este enzima en eritrocitos se encuentra ligada a la parte interna de la membrana hemática (4, 5), y por ello para determinar un valor enzimático más real es aconsejable trabajar con eritrocitos hemolizados.

En la numerosa bibliografía consultada se observa una gran disparidad en cuanto a la técnica de hemolisis empleada, utilizándose tratamientos tales como butanol (6), digestión con pancreatina o tripsina (7,4), empleo de sustancias tensioactivas como saponinas, taninos, tritón X-100 (8, 9, 10, 11), o simple agitación con agua destilada (12, 13); otras técnicas empleadas son la congelación-descongelación y la sonicación (14, 15, 16).

En el presente estudio tratamos de evaluar el efecto que diferentes métodos de hemolisis ejercen sobre la actividad colinesterásica de eritrocitos.

MATERIAL Y METODOS

Muestra biológica: Sangre humana, vacuna y porcina.

Preparación de las muestras: A partir de sangre heparinizada obtenida recientemente, separamos los eritrocitos por centrifugación (10 min, 2.000 rpm, 4°C); a continuación son lavados tres veces con solución salina 0'9% y posteriormente se centrifugan 10 min, 2.000 rpm, 4°C. Finalmente los eritrocitos se suspenden en un volumen de suero fisiológico tal, que el número de ellos sea de 5×10^6 por mm^3 .

Para cada muestra biológica preparamos 10 «pool» formados por volúmenes equivalentes de eritrocitos de 10 individuos diferentes o cabezas de ganado. Cada «pool» es dividido en cuatro partes iguales. De esta forma podremos comparar la actividad enzimática entre eritrocitos intactos y hemolizados mediante tres procedimientos.

Procedimientos de hemolisis

- Agua destilada: Partiendo de un volumen conocido de glóbulos rojos (5×10^6 por mm^3), se añade un volumen doble de agua destilada, se agita enérgicamente y se mantiene en reposo 10 minutos. Seguidamente adicionamos tetracloruro de carbono en un volumen igual al de eritrocitos de partida y tras agitación y reposo de 30 minutos, se mide la actividad enzimática en el sobrenadante.
- Sonicación: Empleando sonicador MSE 1.300, sometemos la suspensión de eritrocitos a tres períodos ultrasónicos de 45 segundos, a intervalos de 1 minuto.
- Congelación: Las muestras envasadas en viales, son almacenadas en arcón congelador de -20°C . Las actividades se miden cuando ha transcurrido al menos un intervalo de 24 horas desde su congelación.

Técnica de medida: Utilizamos el sistema pH-stat (12), en las condiciones descritas por López López y col. Sustrato cloruro de acetilcolina y yoduro de butirilcolina $4'2 \times 10^{-3}$ M, temperatura 37°C y pH igual a 8'0.

TABLA I

EFEECTO DE DIFERENTES PROCEDIMIENTOS DE HEMOLISIS DE ERITROCITOS, SOBRE EL ENZIMA ACETILCOLINESTERASA HUMANA, DE GANADO VACUNO Y DE GANADO PORCINO.

Procedimiento hemolisis	N.º ensayos	Actividad enzimática media (μ moles sustrato hidrol./min/ml) \pm SD					
		HUMANA		VACUNA		PORCINA	
		Ach	Buch	Ach	Buch	Ach	Buch
Agua destilada	10	5'17 \pm 0'09	0'97 \pm 0'05	2'93 \pm 0'03	0'55 \pm 0'05	2'07 \pm 0'05	0'53 \pm 0'03
Sonicación	10	5'49 \pm 0'10	1'10 \pm 0'07	3'15 \pm 0'08	0'63 \pm 0'05	2'23 \pm 0'10	0'59 \pm 0'06
Congelación	10	5'33 \pm 0'08	0'98 \pm 0'06	2'99 \pm 0'05	0'59 \pm 0'03	2'09 \pm 0'08	0'55 \pm 0'03
Eritrocitos intactos	10	4'80 \pm 0'04	0'77 \pm 0'06	2'80 \pm 0'07	0'45 \pm 0'05	1'91 \pm 0'05	0'44 \pm 0'02

Ach: Sustrato cloruro de acetilcolina; Buch: Sustrato ioduro de butirilcolina.

RESULTADOS

Como podemos observar (Tabla I), se detecta un aumento considerable de la actividad enzimática al hemolizar los eritrocitos, obteniéndose el valor máximo al emplear la técnica de sonicación.

DISCUSION

Se estudia el efecto comparativo de diferentes procedimientos de hemólisis sobre el enzima colinesterasa humana, vacuna y porcina, ensayando técnicas tales como la sonicación, congelación a -20°C y agitación con agua destilada, a fin de comprobar la idoneidad de cada una de ellas, pues como apuntan algunos autores (14, 18) no todas las técnicas de ruptura eritrocítica son adecuadas para la posterior determinación cuantitativa del citado enzima.

Como se muestra en la tabla I, con cualquiera de las técnicas ensayadas se detectan valores enzimáticos mayores al de hematíes intactos, si bien las cifras obtenidas no son exactamente iguales para todas ellas. La sonicación es de los ensayos el método más adecuado de hemólisis para este tipo de determinaciones enzimáticas obteniéndose con él, un valor enzimático superior en todas las muestras biológicas estudiadas; ello debido a que produce la rotura de la membrana hemática facilitando la solubilización del enzima (14).

Por otra parte, se observa para las tres muestras biológicas y técnicas ensayadas (tabla I), un considerable aumento del valor enzimático al emplear el sustrato acetilcolina, debido a la mayor especificidad por este sustrato de la acetilcolina hidrolasa (EC 3.1.1.7), tipo de colinesterasa de presencia casi exclusiva en eritrocitos (19, 20).

BIBLIOGRAFIA

1. DUBOIS, K. P. (1971). *Bull. Org. Mond. Santé*, 44, 233-240.
2. CASIDA, J. E. (1973). *Toxicology information*, 822, National Institutes of Health, United States, 259-278.
3. HUSSAIN, M. A., BLATHERWICK, F. J., GAUNCE, A. P. and MACKENZIE, C. J. G. (1981). *J. Environ. Sci. Health*, 16, 1-9.
4. HERZ, F., KAPLAN, E. and STEVENSON, J. H. (1963). *Nature*, 200, 901-908.
5. STECK, T. L. (1974). *J. Cell. Biol.*, 62, 1-11.

6. COHEN, J. A. and WARRINGA, G. P. J. (1953). Citado por Henry, R. J. *Química clínica*, 1, 1.^a ed., Jims, Barcelona, 600-608 (1969).
7. WARRINGA, G. P. J. and COHEN, J. A. (1955). Citado por Gordon, J. J. and Rutland, J. P. (14).
8. ZITTLE, C. A., DELLA MONICA, E. S. and CUSTER, J. H. (1954). Citado por Sihotang, K. *Biochem. Biophys. Acta*, 370, 468-476 (1974).
9. SCHNEIDERMAN, L. J. (1965). Citado por Gordon, J. J. and Rutland, J. P. (14).
10. HERZ, F. and KAPLAN, E. (1968). *Nature*, 217, 1.258-1.266.
11. STAVINOHA, W. B., RYAN, N. and ENDECOTT, B. R. (1969). *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, 14, 469-474.
12. NABB, D. P. and WHITFIELD, F. (1967). *Arch. Environ. Health*, 15, 147-154.
13. SILVESTRI, G. R. (1977). *Am. J. Vet. Res.*, 38, 659-662.
14. GORDON, J. J. and RUTLAND, J. P. (1967). *Nature*, 214, 850-851.
15. ALDRICH, F. D., WALKER, G. F. and PATNOE, C. A. (1969). *Arch. Environ. Health*, 19, 617-620.
16. REINER, E. and SKRINJARIC-SPOLJAR, M. (1980). *Comp. Biochem. Physiol.*, 60, 149-152.
17. LOPEZ-LOPEZ, M. C., HERMOSO, R. y MONTEOLIVA, M. (1981). *Rev. Iber. Parasitol.*, 41, 251-257.
18. HERZ, F. (1975). *Blut*, 31, 17-20.
19. AUGUSTINSSON, K. B. (1971). *Bull. Org. Mond. Santé*, 44, 81-89.
20. SIHOTANG, K. (1974). *J. Biochem.*, 75, 939-941.