

INSTITUTO "LOPEZ-NEYRA" DE PARASITOLOGIA. GRANADA
Unidad de Bioquímica y Fisiología del Parasitismo

INFLUENCIA DEL ANTICOAGULANTE, TEMPERATURA Y PH SOBRE LA
ACTIVIDAD COLINESTERASA DE GANADO VACUNO Y PORCINO

M.C. López López (*); R. Hermoso; M. Monteoliva y L. Thomas(†)

RESUMEN

Utilizando el sistema pH-stat, técnica volumétrica-potenciométrica, se han determinado las actividades colinesterasas de eritrocitos y plasma de ganado vacuno y porcino. Al estimar la influencia del anticoagulante se concluye que EDTA y heparina son los anticoagulantes idóneos para posteriores estudios de dichos enzimas. Se establece en 37°C y pH 8,0, la temperatura y pH óptimos de medida de actividad "in vitro" del enzima acetilcolinesterasa. A pH ácidos se observa un descenso brusco de la actividad enzimática, haciéndose nula a pH próximo a 5,0.

SUMMARY

Using the pH-stat system, a volumetric-potentiometric technique, the cholinesterases activities of erythrocytes and serum from cattle and pig were studied. The analysis of different anticoagulants effect reveals that EDTA and heparin are the preferred anticoagulants for belong studies of those enzymes. A 37°C temperature and pH=8,0 are the optimal values for "in vitro" acetylcholinesterase activity measurement. At acidic pH a strong decrease of the enzyme activity is detected. The activity value is zero when the pH is about 5,0.

INTRODUCCION

El uso en las últimas décadas de los plaguicidas organofosforados para combatir plagas agrícolas, en la industria alimenticia, de medicamentos y cosméticos e incluso e higiene humana y veterinaria, está llegando a nuestros días a ser excesivo. No hay duda de que el empleo de estos productos redundan en gran medida en bene-

(*) Centro de Biología Molecular. C.S.I.C., Cantoblanco, Madrid.

ficio de nuestra sociedad; sin embargo, hay que tener en cuenta que son, en términos generales, uno de los factores principales contaminantes del medio ambiente, con el riesgo que ello supone para la salud del hombre (1).

El mecanismo de acción de estos plaguicidas se lleva a cabo a través de la inhibición del enzima colinesterasa, por fosforilación irreversible y, por tanto, bloqueo de los receptores para el neurotransmisor acetilcolina (2,3). De este modo se produce una "intoxicación endógena de acetilcolina", que da lugar a una serie de efectos graves con sintomatología poco específica (4).

Numerosos autores han sugerido que la determinación de los niveles del enzima colinesterasa, es el procedimiento más exacto para detectar una intoxicación por estos compuestos (5,6,7).

En el presente trabajo, hemos estimado la influencia de diferentes anticoagulantes sobre las actividades colinesterasas de suero y eritrocitos de ganado vacuno y porcino, así como el efecto de la temperatura y pH de medida de dichas actividades.

MATERIAL Y METODOS

La sangre de ganado vacuno y porcino (plasma y eritrocitos) se recoge sobre diferentes anticoagulantes (heparina sódica, 10 μ g/ml; oxalato potásico, 2 mg/ml; fluoruro sódico, 2 mg/ml; citrato sódico, 2 mg/ml; VAG^R (EDTA-Na₂, 8 por ciento p/v), 0,04 ml/ml y etilendiaminotetracético sódico y potásico 1 mg/ml); tras recuento de eritrocitos midiendo el valor hematocrito, se centrifuga a 200 g durante 5 minutos a fin de separar plasma de eritrocitos. El precipitado de eritrocitos se lava con solución salina 0,9 por ciento, y se deja suspender en un volumen de solución salina 0,9 por ciento tal que su cantidad sea de 5×10^6 mm³. Seguidamente son hemolizados mediante sonicación (8).

La actividad enzimática se determina en pool de 5 animales mediante el sistema pH-stat (9) en las condiciones descritas en anteriores estudios (10). Como sustrato utilizamos cloruro de acetilcolina 4,2 mM, para eritrocitos y yoduro de butirilcolina 8,4 mM, para la determinación del enzima de plasma.

RESULTADOS

En ambos ganados se detecta una considerable mayor actividad acetilcolinesterasa que pseudocolinesterasa (Tabla I).

De los anticoagulantes ensayados oxalato potásico, fluoruro sódico, citrato sódico y VAG producen apreciable inhibición de la actividad enzimática que oscila entre el 9 y 40 por ciento. El enzima de ganado vacuno se inhibe en mayor grado por dichos anticoagulantes que el procedente de ganado porcino. Por otra parte, en ambos ganados se detecta máxima actividad al emplear EDTA o heparina (Tabla I).

TABLA I.- Actividad acetilcolinesterasa (eritrocitos) y butirilcolinesterasa(plasma) de ganado vacuno y porcino, utilizando diferentes anticoagulantes

Anticoagulantes	Actividad enzimática			
	Plasma		Eritrocitos	
	G. vacuno	G. porcino	G. vacuno	G. porcino
Heparina	0,40±0,06 ^a	0,45±0,02	3,19±0,05	2,15±0,04
EDTA Sodio	0,39±0,04	0,45±0,03	3,06±0,02	1,98±0,03
VAG ^a	0,32±0,03	0,40±0,02	2,76±0,04	1,74±0,01
EDTA Potasio	0,39±0,03	0,44±0,02	3,03±0,04	1,87±0,04
Citrato	0,24±0,01	0,41±0,01	2,57±0,02	1,96±0,02
Fluoruro	0,23±0,01	0,32±0,01	2,63±0,04	1,38±0,02
Oxalato	0,31±0,02	0,40±0,02	2,80±0,02	1,78±0,07

a: actividad enzimática media \pm SD, de 15 ensayos

La temperatura óptima de medida para el enzima acetilcolinesterasa de ambos ganados se cifra en 37°C (Fig. 1). Se aprecia un incremento de la actividad en un 25 y 40 por ciento al elevar la temperatura de 20 a 37°C para ganado vacuno y porcino respectivamente. El intervalo óptimo de pH de medida oscila entre 8,0 y 8,5 para la acetilcolinesterasa de ambas muestras. A valores de pH ácidos la actividad decrece, haciéndose nula a pH 5,0 y a pH alcalinos, superior a 8,5, se detecta una considerable hidrólisis no enzimática del sustrato cloruro de actilcolina (Fig. 2).

DISCUSION

Los resultados obtenidos según el efecto de los anticoagulantes sobre la actividad del enzima colinesterasa, muestra que EDTA y heparina son los anticoagulantes más idóneos de los ensayados para estudios de actividad de dichos enzimas. Estos anticoagulantes actúan de forma diferente sobre ambas colinesterasas, lo cual podría deberse a la conjunción de dos hechos. Por una parte, EDTA produce una cierta inhibición enzimática indirecta (11) por su acción quelante sobre el ión calcio, catión divalente con efecto activador de la colinesterasa (12); y por otra dicho anticoagulante parece activar, mediante un mecanismo aún desconocido, la colinesterasa de plasma (13); así hemos detectado valores enzimáticos menores en suero (resultados no tabulados) que en plasma (EDTA), ambos procedentes de la misma fuente enzimática.

Los resultados del efecto de la temperatura y pH en los intervalos ensayados, sobre la actividad acetilcolinesterasa (Fig. 1 y 2), muestran que la variación de la temperatura de medida influye en menor grado que el pH sobre dicha actividad.

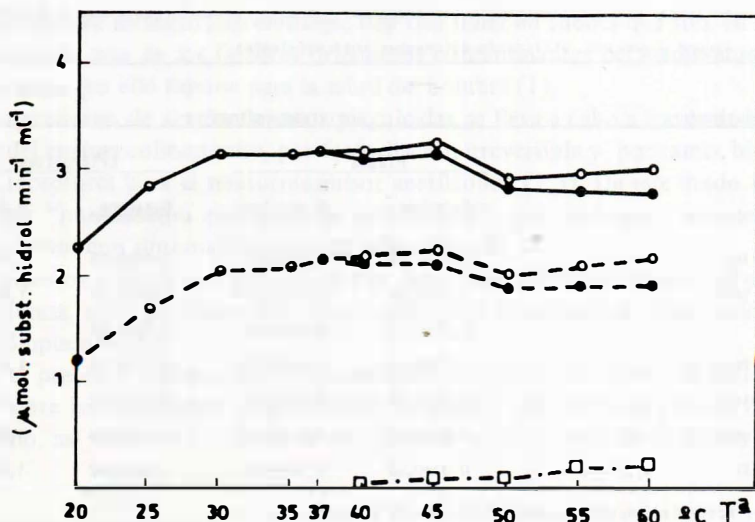


Fig. 1.— Variación de la actividad acetilcolinesterasa con la temperatura. Ganado vacuno (—); Ganado porcino (---); Actividad enzimática total (o); Actividad enzimática real (●); Actividad debida a hidrólisis no enzimática (□). Se considera como actividad enzimática real, la total menos la de hidrólisis no enzimática. Cada valor enzimático representa la media aritmética de 10 ensayos.

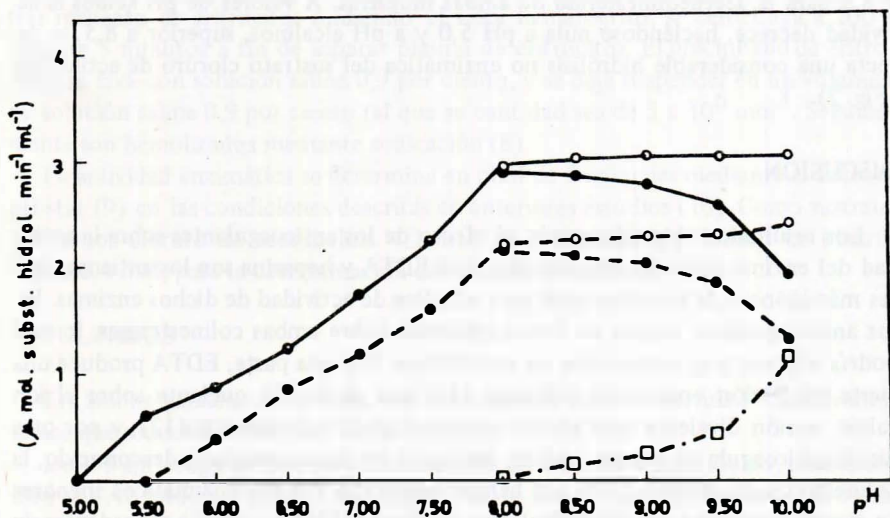


Fig. 2.— Variación de la actividad acetilcolinesterasa con el pH. Ganado vacuno (—); Ganado porcino (---); Actividad enzimática total (o); Actividad enzimática real (●); Actividad debida a hidrólisis no enzimática (□). Se considera como actividad enzimática real, la total menos la de hidrólisis no enzimática. Cada valor enzimático representa la media aritmética de 10 ensayos.

El intervalo de pH óptimo, comprendido entre 8,0 y 8,5 es relativamente pequeño y similar al detectado por otros autores (14) para el enzima de diferentes vertebrados. A valores de pH más alcalinos, incluso pH 8,5, se aprecia hidrólisis alcalina (no enzimática) del sustrato acetilcolina. La clara inhibición de la acetilcolinesterasa a pH ácido, tanto más intensa cuanto más bajo sea éste y que llega a hacerse nula a pH 5,0 ó 5,5 para ganado vacuno y porcino respectivamente, podría deberse a impedimentos estéricos y/o electrostáticos al ataque del enzima al nitrógeno de la molécula de acetilcolinesterasa.

BIBLIOGRAFIA

1. LABORDA, E.; DE LA PEÑA, E.; VALCARCE, E.; BARRUECO, C.; CANGA, C.; MARTINEZ, A. y LABORDA, P. – Rev. San. Hig. Publ., 55, 1109-1118, (1981).
2. DERACHE, R. – Organophosphorus Pesticides, 1ª Ed., Pergamon Press, Luxembourg, 19-25, (1978).
3. HUSSAIN, M.A.; BLATHERWICK, F.J., GAUNCE, A.P. and MACKENZIE, C.J.G. – J. Environ. Sci. Health, 16, 1-9, (1981).
4. GOODMAN, L.S. and GILMAN, A. – Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 5ª Ed., Interamericana, México, 374-392, (1978).
5. BELLO, T.R.; AMBORSKI, G.F. and TORBERT, B.J. – Am. J. Vet. Res. 35, 73-78, (1974).
6. FERNANDEZ, J.J. – Rev. Inst. I. Med., 7, 336-365, (1978).
7. WIDMANN, F.K. – Interpretación Clínica de las Pruebas de Laboratorio, 2ª Ed., Jims, Barcelona, 323-339, (1981).
8. LOPEZ LOPEZ, M.C.; HERMOSO, R. y MONTEOLIVA, M. – Ars Pharm., 24, (4), 317-322, (1983).
9. NABB, D.P. and WHITFIELD, F. – Arch. Environ. Health, 15, 147-154, (1967).
10. LOPEZ LOPEZ, M.C.; HERMOSO, R. y MONTEOLIVA, M. – Rev. Iber. Parasitol., 41 (2), 251-257, (1981).
11. OLIVER, W.T., and FUNELL, B.A. – Am. J. Vet. Res., 24, 32-38, (1963).
12. AUGUSTINSSON, K.B. – Methods of Biochemical Analysis, 5, Interscience, New York, 1-63, (1957).
13. PRESCOTT, F. and HESS, T.L. – Am. J. Vet. Res., 32, 499-503, (1971).
14. MERSMANN, H.J. and SANGUINETTI, M.C. – Am. J. Vet. Res., 35, 579-583, (1974).