



Beatriz Restrepo Cortés<sup>1</sup>, Ángela Liliana Londoño Franco<sup>2\*</sup>, Juan Farid Sánchez López<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Grupo de investigación en enfermedades cardiovasculares y metabólicas. Universidad del Quindío. Armenia, Quindío, Colombia.

<sup>2</sup>Grupo de investigación en Salud pública. Universidad del Quindío. Armenia, Quindío, Colombia.

<sup>3</sup>Universidad del Quindío. Armenia, Quindío, Colombia.

\*Corresponding author: angelaliliana@uniquindio.edu.co

Recibido: 4 de Agosto de 2016. Aceptado: 28 de Septiembre de 2016.

## Valores de colinesterasa plasmática y eritrocitaria con ácido 6-6'-ditiodinicotínico (DTNA) como indicador

### Resumen

Se realizó un estudio descriptivo transversal empleando ácido 6-6'-ditiodinicotínico (DTNA) como indicador para calcular los valores de la actividad de colinesterasa plasmática (AchP) y eritrocitaria (AchE) humana y estandarizarlos para ser utilizados como indicadores de riesgo laboral por exposición a organofosforados y carbamatos en la población de la zona cafetera de Colombia. Se eligió esta técnica pues es una alternativa precisa, sencilla y económica: con pocos interferentes permite analizar AchP y AchE, no se tiene que corregir con hemoglobina; el DTNA es estable congelado o refrigerado y permite analizar muchas muestras en poco tiempo. Se evaluaron 819 muestras de agricultores. La AchE fue significativamente mayor en las personas menores de 45 años y en personas no fumigadoras, la AchP fue mayor en los fumigadores; esto es un indicador de que la población fumigadora se encuentra expuesta a organofosforados y carbamatos de forma prolongada. Se sugiere utilizar como valores máximos de referencia de la AchE y AchP 11378 U/L y 10354 U/L, respectivamente como indicadores de intervención ocupacional.

**Palabras clave:** intoxicación por plaguicidas, colinesterasa plasmática, colinesterasa eritrocitaria, DTNA.

## Plasma and erythrocyte cholinesterase values with 6-6'-dithiodinicotinic acid (DTNA) as indicator

### Abstract

A cross-sectional descriptive study using 6-6'-dithiodinicotinic acid (DTNA) as an indicator was performed to calculate the values of plasma cholinesterase (AchP) and erythrocyte (AchE) activity and to standardize them to be used as indicators of occupational risk by exposure to organophosphates and carbamates in the population of the Colombian Coffee Growing Area. This method was chosen because it is an accurate, simple, and nonexpensive alternative: with few interferents it allows measuring both AchP and AchE, it does not have to be corrected with hemoglobin; The DTNA is stable frozen or refrigerated and allows to analyze many samples in a short time. A number of 819 samples from farmers were evaluated. While AchE was significantly higher in people under 45 years and in non-fumigating people, AchP was higher in fumigators; this result is an indicator that the fumigant population is exposed to organophosphates and carbamates on a long-term basis. It is suggested to use as maximum reference values of AchE and AchP 11378 U / L and 10354 U / L, respectively as indicators of occupational intervention.

**Keywords:** pesticide poisoning, plasma cholinesterase, erythrocyte cholinesterase, DTNA.

## Valores da colinesterase plasmática e eritrocitária utilizando o ácido 6-6'-ditiodinicotínico (DTNA) como indicador

### Resumo

Foi realizado um estudo descriptivo transversal usando ácido 6-6'-ditiodinicotínico (DTNA) como indicador a fim de calcular os valores de atividade da colinesterase plasmática (AchP) e eritrocitária (AchE) humana e padronizar estes valores para ser utilizados na região cafeteira da Colômbia. Esta técnica foi elegida porque é uma alternativa precisa, simples e econômica: tem poucos interferentes e permite analisar AchP e AchE, não deve corrigir-se com hemoglobina; o DNTA é estável congelado ou refrigerado e permite analisar muitas amostras em pouco tempo. Foram avaliadas 819 amostras de agricultores. A AchE foi significativamente maior nas pessoas com menos de 45 anos e em pessoas não pulverizadoras, a AchP foi maior nas pessoas pulverizadoras; isso é um indicador de que a população pulverizadora encontra-se exposta a organofosforados e carbamatos de maneira prolongada. Sugere-se utilizar como valores máximos de referência da AchE e AchP 11378 U/L y 10354 U/L, respectivamente como indicadores de intervenção ocupacional.

**Palavras-Chave:** envenenamento por pesticidas, colinesterase plasmática, colinesterase eritrocitária, DNTA.

## Introducción

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor que posibilita la transmisión del impulso nervioso en determinadas terminales nerviosas y uniones neuromusculares. La ACh debe ser eliminada para que se interrumpa el paso de dicho impulso nervioso. Esta eliminación está a cargo de la acetilcolinesterasa, enzima que se encarga de hidrolizar la acetilcolina en ácido acético y colina. Si la degradación del neurotransmisor no sucede, la ACh continúa el impulso nervioso, generando una sobre estimulación que conduce a alteraciones que van desde una intoxicación aguda (miosis, bradicardia, broncorrea, bronco constricción, dolor abdominal, cólico, diarrea, sialorrea, hipotensión, visión borrosa, entre otros) hasta una poli neuropatía retardada (1-5).

En el campo laboral, los agricultores están expuestos a algunos agroquímicos: los carbamatos y organofosforados inhiben la colinesterasa, de forma reversible los primeros y de forma irreversible los segundos (4, 5), lo cual obliga al monitoreo biológico de sus efectos (4, 6-10).

La determinación analítica depende del tipo de colinesterasa, la acetilcolinesterasa eritrocitaria (AChE) (acetilcolina-acetilhidrolasa, también llamada colinesterasa verdadera o específica: EC 3.1.1.7) evalúa principalmente la afectación de tipo crónico. Es una enzima esencial con un alto grado de especificidad al sustrato, está unida a estructuras celulares en las regiones de las sinapsis colinérgicas, la sustancia gris del sistema nervioso central, los ganglios autonómicos, las sinapsis simpáticas pre y postganglionares y las terminaciones motoras de los músculos, así como en las sinapsis postganglionares parasimpáticas y los eritrocitos. Como parte del sistema de la ACh, la AChE tiene la función fisiológica de desdoblar rápidamente la acetilcolina neurotransmisora en colina y ácido acético, y, de esta manera, eliminarla (11).

La actividad de la AChE se inhibe lentamente, toma varias semanas y hasta meses para retornar a niveles normales. Su determinación tiene utilidad en la detección de sobreexposición a organofosforados y carbamatos (12, 13). La AChE es utilizada por los sistemas de vigilancia epidemiológica para evaluar la exposición de los trabajadores agrícolas y tomar las medidas indicadas antes de que la toxicidad se manifieste clínicamente (14).

Por otro lado, las pseudocolinesterasas (AChP) (acetilcolina-acetilhidrolasas, también llamadas colinesterasas no específicas, pseudocolinesterasas, colinesterasas plasmáticas o séricas, butirilcolinesterasas y benzoilcolinesterasas) clasificada como EC 3.1.1.8, evalúan la afectación aguda, forman un grupo de isoenzimas menos específicas y están presentes en todo el organismo, principalmente en el hígado (1-3). Aún se desconoce su función fisiológica: algunos sugieren que juega un papel importante en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas, regulando la concentración de la colina en plasma o evitando la acumulación de butirilcolina a través de sus efectos nicotínicos, durante el metabolismo de ácidos grasos y lipogénesis (15, 16).

La AChP cuenta con algunas funciones farmacológicas: desdoblar fármacos como la procaina, la succinilcolina o succinilbiscolina y el ácido acetilsalicílico, así como la de la detoxificación de fosfatos y carbamatos. La AChP se inhibe más rápidamente que la AChE y sus niveles normales se restablecen dentro de los 60 días posteriores a la exposición. Además de la inhibición en intoxicaciones agudas, la AChP es de importancia clínica para identificar formas atípicas o con sensibilidad aumentada hacia el anestésico succinilcolina.

Aunque se señala que la actividad de la colinesterasa es un marcador de metabolismo lipídico anormal, tal como hiperlipoproteinemia, obesidad y diabetes mellitus (15), esto no ha sido totalmente comprobado (11, 17, 18).

Es conveniente precisar que los niveles de AChP se reducen durante el embarazo, la menstruación, en anemias, quemaduras, desnutrición o cáncer, enfermedades hepáticas, epilepsia, tuberculosis, fiebre reumática, enfermedades del colágeno y mixedema. Se incrementan en condiciones de alcoholismo, diabetes, artritis, hiperlipidemia y obesidad. Algunos medicamentos también pueden inhibir la actividad de las AChE y AChP, como los anticonceptivos orales, estrógenos, beta bloqueadores, corticoides, clorpromazina, bloqueadores H<sub>2</sub>, antiarrítmicos y ciclofosfamida (19, 20, 21).

Los límites máximos permisibles o TLV (Threshold Limit Values) de exposición a contaminantes del medio ambiente laboral, son la cantidad de sustancia a la que se espera pueda estar expuesto un trabajador durante 8 horas al día y 40 a la semana durante su vida laboral sin que sufra menoscabo o daño a su salud, y se concibe como guía para las actividades de prevención y control de los factores de riesgo presentes en el ambiente de trabajo (22). Para los plaguicidas inhibidores de la colinesterasa, la AChP y la AChE se emplean como índices biológicos de exposición. Los TLV no son líneas definidas de separación entre la concentración segura y la concentración peligrosa, no son índices relativos de toxicidad, entra en este punto en juego la muy particular condición biológica de cada individuo expuesto, por ello se establece un "nivel de acción" para la implementación de conductas tendientes a evitar el riesgo y las consecuencias en el organismo. La prevención de la exposición se inicia con la adquisición del agente y continúa en cada uno de los pasos de su empleo: transporte, almacenamiento, trasvase, preparación, aplicación, desecho de residuos, lavado máquinas de aplicación, manejo de las ropas de los aplicadores, disposición final de los envases de agroquímicos (22).

Ahora bien, se han desarrollado varios métodos para la cuantificación, entre los que se incluyen la determinación del cambio de pH que acompaña la hidrólisis de los ésteres de colina (23) y aquellos basados en la detección de la liberación de tiocolina de sus ésteres empleando como indicador el reactivo de Ellman (5,5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico), DTNB (24). Aunque estos últimos métodos tienen mayor aceptación, la alta actividad catalítica de la enzima en suero, sumado a la alta sensibilidad de la reacción indicadora, demandan una predilución o un volumen muy pequeño de la muestra. Ambas medidas contribuyen necesariamente a una imprecisión inevitable y hacen difícil la automatización del método (25). Adicionalmente, el pico de absorción del tionitrobenzoato a 412 nm, coincide con el pico de absorción de la hemoglobina, lo que presenta un problema al analizar muestras ricas en hemoglobina.

Algunos métodos usados en veterinaria emplean cromóforos diferentes al DTNB, con el fin de obtener un producto de reacción entre el cromóforo y la tiocolina que posean un máximo de absorbancia alejado del espectro de la hemoglobina y, de este modo, evitar su interferencia. Uno de ellos es el método 2,2'-ditiopiridina (2-PDS), cuyo producto de reacción con la tiocolina, la 2-tiopiridona, posee su máxima absorbancia a 343 nm de longitud de onda. Sin embargo, este método reacciona con el glutatión e inhibe la colinesterasa a altas concentraciones. Otro método utiliza 4,4'-ditiopiridina (4-PDS), cuya máxima absorbancia se encuentra a 324 nm de longitud de onda, la cual está fuera del espectro visible (26).

Una técnica usada en Colombia en el Programa de vigilancia de organosforforados y carbamatos (VEO) es el estuche Lovibond® (14, 27) que mide la actividad enzimática en sangre total con la técnica de Limperos y Ranta (28), luego modificada por Edson (29), conocida también como técnica tintométrica o colorimétrica de Edson (27). Es un procedimiento semicuantitativo que expresa valores de actividad enzimática en nueve intervalos de 12,5% cada uno, correspondientes a una actividad de 100%, 87,5%, 75% y así sucesivamente, con respecto a un control no expuesto a plaguicidas inhibidores de colinesterasa (30).

En el método propuesto por Jiménez y Martínez (1, 2) se emplea el ácido 6-6'-ditiodinicotínico (DTNA) como sustituto del DTNB, a 30 °C y pH 7,6. La AchP se determina a partir de propioniltiocolina; la colinesterasa libera tiocolina, la cual reacciona con el DTNA formando ácido tionicotínico y, a partir de acetiltiocolina, la AchE libera tiocolina, formando ácido tionicotínico. Ambas determinaciones presentan un pico máximo de absorbancia a 340 nm, permitiendo así el monitoreo directo de la reacción.

Usando el DTNA, puede utilizarse suero para la AchP y sangre entera para determinar la AchE, permitiendo el uso de muestras más concentradas. Este método no es sensible a la luz, es de fácil reproducibilidad, los reactivos son más económicos y la estabilidad de los mismos es prolongada (DTNA almacenado en botella ámbar es estable por 6 meses a 4-8 °C); la bilirrubina y la hemoglobina no presentan interferencia. A diferencia de la prueba que usa como indicador el DTNB que es muy sensible a la luz y requiere realizar diluciones de las muestras ya que presentan interferencia a 412 nm con la hemoglobina.

Por lo anterior, este método constituye una alternativa precisa, sensible y conveniente para la determinación de acetilcolinesterasa humana (1, 2) y se elige para calcular los valores de la actividad de AchP y AchE en el presente estudio. Con ello, se pretende dar el paso inicial hacia la estandarización de dichos valores con esta técnica para ser utilizada en la zona cafetera de Colombia.

## Materiales y métodos

### Población y tipo de estudio

Se realizó un estudio descriptivo transversal en una muestra probabilística de 819 agricultores (480 hombres y 339 mujeres) que residían y/o laboraban en fincas productoras de café y plátano en el departamento del Quindío. Se diseñó una encuesta clínica epidemiológica realizada o supervisada por médicos para determinar condiciones clínicas y antecedentes de los participantes. Se excluyeron participantes embarazadas, con tuberculosis, neoplasias o enfermedades crónicas (hepáticas, diabetes, epilepsia, enfermedades del colágeno, mixedema, alcoholismo, obesidad, anemia) y a quienes consumían medicamentos como corticoides, clorpromazina, antiarrítmicos y ciclofosfamida.

## Materiales

Para los análisis enzimáticos se empleó un espectrofotómetro Thermo Scientific™ GENESYS 10S UV-Vis de Thermo Fisher Scientific, USA. Baño maría Selecta, S.A. Se tomaron muestras de sangre (no se requiere ayuno) en tubos comerciales Vacutainer® con EDTA K<sub>2</sub>; usando una centrífuga refrigerada marca Hermle Z 326 K de rotor fijo, la separación del suero y los eritrocitos se hizo a 3000 rpm por 5 min y 1000 g gravedades, a una temperatura a 20 °C para realizar en cada muestra la AchE (en eritrocitos) y la AchP (en suero). Los reactivos utilizados fueron obtenidos de la compañía Sigma Aldrich comercializados para Colombia.

## Soluciones de trabajo

Se prepararon 4 soluciones: la primera, llamada *solución de trabajo 1* era DNTA 0,2 mmol/L, con pH ajustado a 7,6 con buffer fosfatos, esta se utilizó para determinar AchP. *Solución de trabajo 2* se utilizó para cuantificar AchE, era igual a *solución de trabajo 1*, además tenía 25,8 ppm de hidrocloreto de quinidina y 1000 ppm de Tritón X-100. *Sustrato para AchP* era yoduro de propioniltiocolina 1272 mmol/L y *Sustrato para AchE* era yoduro de acetiltiocolina 10,5 mmol/L. Se utilizó la balanza analítica Mettler Toledo Ax205 Delta Range peso máximo 81g/220g con una desviación d = 0,01mg/0,1mg.

## Procedimiento

Se replicó el procedimiento descrito por Jiménez y Martínez (1, 2), así como el coeficiente de absortividad molar reportado para sus condiciones experimentales, las mismas que fueron replicadas para este experimento. A continuación se presentan las condiciones de reacción: pH = 7,6; T = 30 °C; λ = 340 nm; tincubación = 2 min; blanco de reacción: agua destilada. De igual modo, se toma la definición de actividad enzimática reportada por Jiménez y Martínez (1, 2) (ecuación [1])

$$A_{(U/L)} = \left( \frac{\Delta A}{min} \right) \left( \frac{V_T}{V_m} \right) * \epsilon \quad [1]$$

Donde A<sub>(U/L)</sub> es la actividad de la colinesterasa; ΔA/min es la variación de la absorbancia, determinada mediante el promedio de 3 medidas sucesivas cada minuto; V<sub>T</sub> es el volumen total de la mezcla de reacción: 2,105 mL; V<sub>m</sub> es el volumen de la muestra (suero para determinar la AchP y sangre total para determinar AchE): 5 μL, expresado en mL y ε es el coeficiente de absortividad molar reportado: 10,80 L/(mol·cm).

## Análisis estadístico

La información se analizó con SPSS versión 19. Se determinó la normalidad de las variables cuantitativas mediante la prueba de Kolmogorov. Se calcularon medias de AchE y AchP con sus intervalos de confianza 95%, y diferencia de medias (T Student); se buscó correlación de Pearson entre la AchE y AchP.

Para la determinación del porcentaje de inhibición de la colinesterasa se asumieron dos valores máximos. A pesar de la distribución paramétrica que representaron los datos, hubo valores extremos por lo cual en lugar de desviaciones estándar se escogieron medidas de posición para representar la inhibición de la colinesterasa: el percentil 100 y el percentil 95, en ambos considerando el 25% del valor de las AchE y AchP como posible indicador de intervención en el ámbito ocupacional de acuerdo a las recomendaciones internacionales y a la normativa del país (31-33). Se calculó odds ratio (OR) para observar variables de riesgo relacionadas con la inhibición de la actividad de colinesterasa.

## Resultados y discusión

Los participantes fueron 819 (58,6% hombres y 41,4% mujeres), con media de edad de 48,2 años (IC 95% 47,2-49,2). La mayoría de los participantes contaba con una escolaridad menor a 8 años (67,7%); un 47,6% (n 390) afirmaron fumigar como única actividad o como parte de sus actividades en el campo (n 370).

Los promedios y las medidas de posición de los valores obtenidos de AchE y AchP se pueden observar en las Tablas 1 y 2. La media de AchE fue significativamente mayor que la AchP ( $p = 0,000$ ), no se encontró correlación entre ellas. AchE fue significativamente mayor en las personas menores de 45 años ( $p = 0,000$ ); no se encontraron diferencias de los valores de colinesterasa entre distintos sexos o escolaridad.

Para ambas colinesterasas se halló diferencia significativa cuando se analizó entre fumigadores: la AchE fue significativamente más baja entre las personas fumigadoras ( $p = 0,022$ ) mientras que la AchP lo fue entre los no fumigadores ( $p = 0,010$ ).

**Tabla 1.** Promedios de AchE y AchP en la población de estudio.

Total n	AchE (U/L)		Sig.	AchP (U/L)		Sig.
	Promedio (IC 95%)			Promedio (IC 95%)		
	11858,5 (11684,4-12032,5)			10017,0 (9845,4-10188,7)		0,00
Sexo						
Masculino	11785,6 (11551,5- 12019,6)			10223,1 (10016,7-10429,5)		
Femenino	11961,7 (11701,9-12221,6)	0,33		9945,8 (9429,4-10462,2)		0,33
Edad						
< 45	12401,1 (12169,4-12632,8)	<b>0,00</b>		10090,4 (9806,7-10374,1)		
≥45	11508,7 (11268,9-12632,8)			9966,8 (9749,4-10184,2)		0,93
Escolaridad						
< 8 años	11893,9 (11683,8-12103,9)	0,85		10180,3 (9841,8-10518,9)		0,61
≥ 8 años	11859,1 (11551,8-12166,4)			9953,3 (9672,6-10233,9)		
Fumigación						
Si	11668,1 (11408,8-11927,3)	<b>0,02</b>		10252,7 (10015,0-10490,4)		<b>0,01</b>
No	12078,2 (11847,2-11927,3)			9974,8 (9555,9-10393,7)		

**Tabla 2.** Medidas de posición AchE y AchP en la población de estudio.

Total n	n (%)	AchE (U/L)			AchP (U/L)		
		Mínimo	Mediana	Máximo	Mínimo	Mediana	Máximo
		819 (100)	3588	12246	16341	3549	10179
Sexo							
Masculino	480 (58,6)	3744	12148	16341	3549	10413	19227
Femenino	339 (41,4)	3588	12402	15912	1349	9711	18954

Al calcular el 25% de inhibición de colinesterasa (A 25%), se observó que para la AchP hubo escasos valores extremos que excedían en mucho al percentil 95, se calculó el valor de referencia máximo de 19227 U/L y la A 25% fue de 10354 U/L; en la AchE los porcentajes de inhibición con los percentiles 95 y 100 fueron más semejantes, y el valor de A 25% fue de 11378 (Tabla 3).

**Tabla 3.** Valores de referencia para cálculo de inhibición del 25% de actividad (A25%) de AchE y AchP.

	Mín.	Percentiles					Máx.	A25%	
		5	25	50	75	95		P95	P100
AchE (U/L)	3588,0	5421,0	10647,0	12246,0	13767,0	15171,0	16341,0	11378	12256
AchP (U/L)	3549,0	5070,0	8541,0	10179,0	11583,0	13806,0	19227,0	10354	14420

Tomando como referencia el percentil 95, se encontró que un 36,0% de los participantes tenían una inhibición de la actividad de AchE y un 51,8% de la AchP. Se observó disminución en la actividad de la AchE significativamente mayor en los agricultores de sexo masculino (OR: 1,3), de 45 y más años y fumigadores. La AchP fue significativamente mayor en las mujeres y en no fumigadores (Tabla 4).

**Tabla 4.** Disminución de la actividad (A 25%) de la colinesterasa.

	AchE A 25%			AchP A 25%		
	P95	P100		P95	P100	
	n (%)	OR (IC 95%) sig.	n (%)	n (%)	OR (IC 95%) sig.	n (%)
Sexo						
Masculino	184 (38,3)	<b>1,3 (0,9-1,7) p 0,06</b>	253 (52,7)	232 (48,3)	<b>0,72 (0,54-1,95) p 0,01</b>	469 (97,7)
Femenino	111 (32,7)		162 (47,8)	192 (56,6)		330 (97,3)
Edad						
< 45	91 (28,3)	<b>1,7 (1,3-2,4) p 0,00</b>	145 (45,2)	158 (49,2)	1,2 (0,9-1,6) p 0,14	316 (98,4)
≥45	204 (41,0)		270 (54,2)	266 (53,4)		483 (97,0)
Escolaridad						
< 8 años	188 (34,1)	0,93 (0,7-1,2) p 0,35	275 (49,8)	281 (50,9)	0,52 (0,17-1,6) p 0,17	536 (97,1)
≥ 8 años	102 (38,9)		135 (51,5)	141 (53,8)		258 (98,5)
Fumigación						
Si		<b>1,4 (1,1-1,9) p 0,01</b>			<b>0,72 (0,54-0,94) p 0,01</b>	
No	157 (40,3)		216 (55,4)	185 (47,4)		380 (97,4)
Total	138 (32,2)		199 (46,4)	239 (55,7)		419 (97,7)
Total	295 (36,0)		415 (50,7)	424 (51,8)		799 (97,6)

Ahora bien, en la determinación de la actividad de la colinesterasa existe variabilidad inter e intraindividual: la primera se da entre individuos de una misma especie, y puede llegar a suponer hasta un 30% de la actividad colinesterasa (34). La variabilidad intraindividual se produce por factores relacionados con el estado fisiológico de la persona, como la edad, el sexo, el estado reproductivo y la salud del individuo. Parece ser que estos factores afectan más a la actividad de la colinesterasa plasmática que a la eritrocitaria (35, 36).

En la práctica, el monitoreo de la variación intraindividual es un reto difícil de cumplir dado que la medición previa a la exposición laboral es casi imposible de conseguir. Hacer muestras periódicamente es una alternativa para la vigilancia del cumplimiento del uso de las medidas de protección individual pero la inestabilidad laboral y los desplazamientos constantes de los agricultores hace de esta alternativa algo muy difícil de cumplir (37).



En este estudio se pudo determinar que en la población por encima de los 45 años los valores de AchE fueron significativamente menores que en los de menor edad. No se observaron diferencias por sexo ni en AchE ni en AchP. No se consideraron otras variables intraindividuales porque para controlar los resultados se hicieron criterios de exclusión de las mismas. Sin embargo, la inhibición en la actividad de la AchE fue significativamente mayor en los agricultores hombres, de 45 y más años y fumigadores; mientras que la AchP fue significativamente mayor en las mujeres y en no fumigadores.

Las diferentes técnicas de laboratorio utilizadas para la medición de la colinesterasa dificultan las comparaciones entre regiones o tiempos determinados (21) y se hace necesaria la realización de estudios poblacionales para detectar aquellos individuos más susceptibles a la intoxicación por organofosforados (38, 39). Sin embargo, las valoraciones médicas pre ocupacionales y de tipo periódico no se realizan en los predios de residencia o trabajo; si bien es cierto que la Resolución 2346 de 2007 indica la obligatoriedad de la realización de las valoraciones médicas ocupacionales, al igual que el Artículo 2.2.4.2.2.18 del Decreto único reglamentario del sector trabajo de 2015, esta norma no es aplicada en el sector rural, con muy contadas excepciones (40, 41). Esto impide tener conocimiento de las comorbilidades que pueden alterar los valores de la prueba y que deben ser tenidas en cuenta al momento de ubicar un trabajador en actividad que implique riesgo por exposición a agroquímicos inhibidores de la colinesterasa.

Basados en los resultados de la correlación entre la AchP y AchE, se concluyó que no existe relación directa entre las actividades de estas dos enzimas. La primera indica exposición aguda mientras que la segunda exposición crónica. Se considera que hidroliza tanto en AchE como en AchP, una molécula de acetilcolina en ácido acético y colina en menos de un milisegundo, calculándose un tiempo de recambio de 150  $\mu$ s aproximadamente (42). Trabajadores agrícolas con exposiciones repetidas y prolongadas pueden presentar disminución de AchP y AchE o únicamente de AchE (3, 16, 25, 43).

Los valores de referencia hallados en la estandarización del método con DTNA por Jiménez y Martínez (1, 2) fueron: AchP entre 12120-2176 U/L, y para la AchE entre 10567-2227 U/L. En otro estudio realizado por el mismo investigador en una población agrícola costarricense, aparentemente sana, sin exposición previa a plaguicidas, usando la reacción de Ellman con el indicador DTNB, se obtuvieron rangos de actividad para la AchP en 139 mujeres de 3700-9700 U/L y en 134 hombres de 4500-9900 U/L. Estos datos no permiten comparar la actividad de AchE con nuestro estudio porque ellos usaron la dilución de las muestras y las corrigieron con hemoglobina (3).

Otro autor determinó las relaciones matemáticas entre tres técnicas cuantitativas empleadas para medir la actividad de la AchP, a partir de los valores de referencia establecidos parados poblaciones de Antioquia, Colombia (21); se encontraron valores promedio que resultaron similares, tanto con el método de Michel como con EQM (método espectrofotométrico con colorímetro con fuente diódica emisora de luz) ( $P > 0,05$ ), pero no con Monotest donde se encontraron rangos entre  $5743 \pm 1662$  U/L para Aburrá y  $5459 \pm 1585$  U/L para agricultores del oriente Antioqueño con ( $P = 0,01$ ), concluyendo que en la actualidad se emplean numerosas técnicas para medir la concentración de la colinesterasa en los eritrocitos, la sangre y el plasma. Sin embargo, debido al uso no regulado de esas técnicas se hace difícil comparar los resultados (20).

En este estudio se encontraron valores de AchP y AchE con niveles máximos superiores a los anteriormente descritos y los mínimos similares (19227-3549 U/L y 16341-3588 U/L respectivamente).

Aunque no fue objeto de esta investigación el comparar los niveles de colinesterasa según los plaguicidas utilizados, llama la atención que la inhibición de AchP sea significativamente mayor en no fumigadores y en las mujeres, lo cual pudiera indicar que están más expuestos a la concentración en el ambiente de los agroquímicos, empleo inadecuado de medidas de protección individual a través de fómites (ropa de los trabajadores expuestos directamente, utensilios empleados en varias actividades incluyendo fumigación, recipientes de agroquímicos empleados luego de terminado el producto), etc.

Para cumplir el objetivo de obtener los valores de referencia para agricultores de zona cafetera con la técnica propuesta, primero se utilizó como valor máximo el percentil 100 para determinar el porcentaje de inhibición considerando 25% como indicador de intervención con los trabajadores expuestos. Se halló un valor de 14420 U/L como 25% de la actividad de AchE y 12256 U/L para AchP. Sin embargo, y considerando los valores mayores tan extremos, sobre todo para la AchP, se decidió proponer los percentiles 95 (P 95) como valores de referencia máximos; bajo estas condiciones con los nuevos valores máximos de referencia (P 95), se determinó la existencia de inhibición de un 25% de la actividad de colinesterasa en la población estudiada correspondiente a un 36% para AchE y un 51,8% para AchP.

## Conclusiones

De acuerdo a lo anterior, los límites máximos obtenidos en el presente estudio fueron 15171 U/L para AchP y 13806 U/L para AchE. Con base en dichos valores, se calculó el porcentaje de inhibición, este fue: 10354 U/L para AchP y 11378 U/L para AchE. Se propone además que con disminución del 25% en los valores de la actividad de la colinesterasa se debe proceder a repetir la muestra y de confirmarse se deberá apartar el trabajador de la exposición y se repetirá el análisis dos semanas más tarde; con valores superiores al 25% de inhibición, de forma inmediata, se debe retirar el trabajador del ambiente laboral donde se da la exposición. El criterio para esta decisión se fundamenta en el hecho de iniciar intervención en una franja del valor del biomarcador donde no se esté generando daño irreparable en la salud.

Se debe insistir en la importancia que tiene la vigilancia médica de la salud en los trabajadores expuestos a agroquímicos, no solamente con mediciones rutinarias de la colinesterasa, tanto eritrocítica como plasmática (monitoreo biológico de efecto), sino la vigilancia integral de los mismos a través de los exámenes médicos ocupacionales pre exposición, periódicos y post exposición.

## Agradecimientos

A los agricultores y sus familias participantes del estudio. Este trabajo fue financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia y Tecnología de Colombia (Colciencias), código 1113-569-33303 y número de contrato 40-2013. Proyecto interno # 648 de 2013 de la Universidad del Quindío .

## Referencias

- Jiménez-Díaz, M.; Martínez-Monge, V. Validación de la determinación de colinesterasa plasmática humana a 340nM. *Rev. Biomed.* **2000**, *11*, 91-98.
- Jiménez-Díaz, M.; Martínez-Monge, V. Validación de la determinación de acetilcolinesterasa eritrocítica humana a 340 nM. *Rev. Biomed.* **2000**, *11* (2), 161-168.
- Jiménez-Díaz, M.; Schosinsky-Neveermann, K. Valores de referencia de colinesterasa plasmática y eritrocítica en población Costarricense. Comparación del desempeño clínico de ambas enzimas. *Rev. Costarricense Cien. M.* **2000**, *21*, 3-4.
- Nelson LS, Ford MD. Acute poisoning. In Goldman L, Schafer AI, ed *Goldman's Cecil Medicina* 25 ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; **2016**; cap. 110. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-1-4377-1604-7.00110-x>.
- Aminoff, M. J.; So, Y.T. Effects of toxins and physical agents on the nervous system. En: *Bradley's Neurology in clinical Practice*. Elsevier Saunders. **2012**; cap. 58. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-1-4377-0434-1.00083-9>.
- Instituto Nacional de salud. Protocolo de vigilancia en salud pública de intoxicaciones por sustancias químicas, 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-deaccion/SubdireccionVigilanciaSivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Intoxicaciones.pdf>. [Consultado el 6 de Junio, 2016].
- Cárdenas, O.; Silva, E.; Morales, L.; Ortiz, J. Estudio epidemiológico de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en siete departamentos colombianos, 1998-2001. *Biomédica.* **2005**, *25* (2): 170-180. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1020-49892007000600005>.
- Medina, O. M.; Sánchez, L. H.; Flórez-Vargas, O. Actividad enzimática colinesterasa en muestras de sangre humana: efecto de las condiciones de almacenamiento. *Rev. Salud UIS.* **2015**, *47*, 151-158.
- O'Malley, M. Pesticidas. En *Diagnóstico y tratamiento en medicina laboral y ambiental*. Manual Moderno: México D.F., **2005**; pp. 597-646.
- Strelitz, J.; Engel, L.S.; Matthew, C.; Keifer, M.C. Blood acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as biomarkers of cholinesterase depression among pesticide handlers. *Occup. Environ. Med.* **2014**, *71* (12), 842-847. DOI: <https://doi.org/10.1136/oemed-2014-102315>.
- Colovic, M. B.; Krstic, D. Z.; Lazarevic-Pasti, T. D.; Bondzic, A. M.; Vasic, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr. Neuropharmacol.* **2013**, *11* (3), 315-335. DOI: <https://doi.org/10.2174/1570159x11311030006>.
- Layer, P.G.; Willbold, E. Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease. *Histochem. Cytochem.* **1994**, *29* (3), III-1 VII 92. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0079-6336\(11\)80046-x](https://doi.org/10.1016/s0079-6336(11)80046-x).
- Soreq, H.; Seidman, S. Acetylcholinesterase, new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, *2*, 294-302.
- Instituto Nacional de salud. Protocolo programa PICCVEO, 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/programas-de-calidad/piccveo/Protocolo%20Programa%20VEO%202015-vf200315.pdf>. [Consultada el 6 de Junio de 2016].
- Kutty, K.M. Biological function of cholinesterase. Review Article. *Clin. Biochem.* **1980**, *13*, 239-243. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(80\)80001-4](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(80)80001-4).
- Neupane, D.; Jørs, E.; Lars, B. Pesticide use, erythrocyte acetylcholinesterase level and self-reported acute intoxication symptoms among vegetable farmers in Nepal: a cross-sectional study. *Environ. Health.* **2014**, *13* (98) 1-7. DOI: <https://doi.org/10.1186/1476-069x-13-98>.
- McQueen, M. J. Clinical and analytical considerations in the utilization of cholinesterase measurements. *Clin. Chim. Acta.* **1995**, *237* (1-2), 91-105. DOI: [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(95\)06067-n](https://doi.org/10.1016/0009-8981(95)06067-n).
- Trundle, D.; Marcial, G. Detection of Cholinesterase Inhibition. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **1988**, *18* (5), 345-352.
- Carmona-Fonseca, J.; Henao, S.; Garcés, R. Valores de referencia de la actividad colinesterásica sanguínea en población laboral activa no expuesta a plaguicidas inhibidores de colinesterasa. *Rev. Fac. Nal. Salud Publ.* **2000**, *18* (2), 55-72.
- Carmona-Fonseca, J. Valores de referencia de la actividad de la colinesterasa eritrocitaria según las técnicas de Michel y EQM® y Monotest en población laboral de Antioquia, Colombia. *Rev. Panam. Salud Pública.* **2003**, *14* (5), 316-324. Disponible: <https://doi.org/10.1590/s1020-49892003001000006>.
- Carmona-Fonseca, J. Relationship between cholinesterase levels and blood groups ABO and Rh. *Acta Med. Colomb.* **2006**, *31* (3) 104-112.
- Center for disease control and prevention. Niosh pocket guide to chemical hazards. DHHS (NIOSH), 2007; Publication No. 2005-149. Disponible en: <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2005-149/pdfs/2005-149.pdf>. [Consultado el 26 de septiembre de 2016].
- Ivankovich, A.D.; Sidell N.; Vincent, J.; Cairoli, A.; Dietz, A.; Ronald, F.; et al. Dual action of pancuronium on succinylcholine block. *Canad. Anaesth. Soc. J.* **1977**, *24*, 228-242. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF03006236>.
- Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharm.* **1961**, *7*, 88-95. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- Cotton, J.; Lewandowski, P.; Brumby, S. Cholinesterase Research Outreach Project (CROP): measuring cholinesterase activity and pesticide use in an agricultural community. *BMC Public Health.* **2015**, *15*, 748. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12889-015-2076-8>.
- Teclés, F.; Gutiérrez-Panizo, C.; Martínez-Subiela, S.; Parra, M. D. Comparación de la 2,2'-ditiopiridina y el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico en la determinación de colinesterasa en sangre entera de perro. *An. Veterinaria.* **2000**, *16*, 41-54.
- Tintometer Lovibond. *The Lovibond cholinesterase test kit AF 267 (40-2670), Instruction*. Tintometer: Virginia, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1038/scientificamerican06071890-12034supp>.
- Limperos, G.; Ranta, K. E. A rapid screening test for the determination of the approximate cholinesterase activity of human blood. *Sci.* **1953**, *117*, 453-5. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.117.3043.453>.
- Edson, E. F. Blood tests for users of OP insecticides. *World Crops* **1950**, *10*, 49-51.
- Carmona-Fonseca, J. Colinesterasas en sangre total medidas con técnica semicuantitativa y en eritrocitos o plasma medidas con técnicas cuantitativas: relaciones. *Biomédica*, **2007**, *27*, 244-256. DOI: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v27i2.220>.
- Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias de Ambiente, Programa de salud y Ambiente OPS. Impacto de los plaguicidas en la salud y Ambiente. Monitoreo Biológico de Colinesterasa. Lima Octubre 1997, 1-6.

32. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias de Ambiente. Programa de salud y Ambiente. OPS. Impacto de los plaguicidas en la salud y Ambiente. Monitoreo Biológico de Colinesterasa. Lima, Octubre 1997, 1-6. Ministerio de la Protección Social. Resolución 1013 de Marzo 25 de 2008. Bogotá. 2008
33. Albiano, Nelson F. Toxicología Laboral: Criterios para el monitoreo de la salud de los trabajadores expuestos a sustancias químicas peligrosas / 4<sup>o</sup> Ed Ampliada. Buenos Aires: Superintendencia de riesgos del trabajo, 2015; p 522.
34. Halbrook, R. S.; Shugart, L. R.; Watson, A. P.; Munro, N. B.; Linnabary, R. D. Characterizing biological variability in livestock blood cholinesterase activity for biomonitoring organophosphate nerve agent exposure. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1992**, *201* (5), 714-725.
35. Banks, CN.; Lein, P. J. A review of experimental evidence linking neurotoxic organophosphorus compounds and inflammation. *Neurotoxicol.* **2012**, *33* (3), 575-584. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2012.02.002>.
36. Taghavian, F.; Vaezi, G.; Abdollahi, M. Comparative Toxicological Study between Exposed and Non-Exposed Farmers to Organophosphorus Pesticides. *Cell J.* **2016**, *18* (1), 89-96.
37. Tejada, R. E.; Matos, F. G.; Méndez, Z. K.; Duran, L. C.; Lee, V. J. Niveles de colinesterasa plasmática en trabajadores agrícolas de campos frutales de la región suroeste de república Dominicana. *Revista Médica.* **2011**, *72* (3), 67-69.
38. Hurtado-Clavijo, C. M.; Gutiérrez, M. Organophosphorates: acute intoxication practical issues. *Rev. Fac. Med.* **2005**, *53* (4), 244-258
39. Jørs, E.; Cervantes, M. R.; Condarco, A. G.; Huici, O.; Lander, F.; Bælum, J. *et al.* Occupational pesticide intoxications among farmers in Bolivia: a cross-sectional study. *Environ. Health* **2006**, *5* (1), DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1476-069X-5-10>.
40. Ministerio de la Protección Social. Resolución 2346 de Julio 11 de 2007.
41. Ministerio de Trabajo. Decreto único reglamentario del sector trabajo 1072 de 2015: Artículo 2.2.4.2.2.18. Bogotá. 2015. Disponible en: <file:///C:/Users/admin/Downloads/DUR%20Sector%20Trabajo%20Actualizado%20a%2015%20de%20abril%20de%202016.pdf>.
42. Fernández-Prieto, R. M.; Ramallo-Bravo, A.; Carmona-Carmona, G.; Carrasco-Jiménez M. S. Papel de las colinesterasas plasmáticas. Actualización. *Rev. Esp. Anestesiol. Reanim.* **2011**, *58*, 508-516.
43. Varona, U. M.; Combariza, D.; Díaz, S.; Palma, M. Plaguicidas. En *Sociedad Colombiana de Medicina del Trabajo*. Alvi Impresores, **2011**; pp 295-328.

**Article citation:**

Restrepo-Cortés, B.; Londoño-Franco, A. L.; Sánchez-López, J. F. Valores de colinesterasa plasmática y eritrocitaria con ácido 6-6'-ditiodinicotínico (DTNA) como indicador. *Rev. Colomb. Quim.* **2017**, *46* (1), 13-19. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n1.62849>.