

U. N. A. M.
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS
UNIVERSIDAD MOTOLINIA

**METODO ULTRAMICROANALITICO PARA
LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD
COLINESTERASICA EN SANGRE DE
TRABAJADORES EXPUESTOS A
PLAGUICIDAS ORGANO-FOSFORADOS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO PRESENTA

MARTHA A. PINEDA RABADAN

méxico, d. f.
1 9 6 4



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**A LA MEMORIA DE MI PADRE
NICEFORO PINEDA ORTIZ**

**A MI MADRE
EMELINA RABADAN VDA. DE PINEDA**

**A MIS HERMANOS
ANTONIO
LILIA
LOBELIA
RAQUEL
ELVA**

11691

A LA ESCUELA

A MIS MAESTROS

**AL Q. B. P. HORACIO OLIVERA
POR SU VALIOSA DIRECCION.**

**AL DR. GUSTAVO VINIEGRA OSORIO
DIRECTOR DE HIGIENE INDUSTRIAL**

AL HONORABLE JURADO

A EL

CAPITULOS

I.—INTRODUCCION

II.—METODOS DE ANALISIS

III.—RESULTADOS

IV.—RESUMEN

V.—CONCLUSIONES

VI.—BIBLIOGRAFIA

CAPITULO I

INTRODUCCION

En este trabajo se designa como plaguicida, toda substancia, cualquiera que sea su composición química y sus características físicas, capaz de repeler, controlar, destruir, abatir la incidencia o matar insectos, roedores, hongos o hierbas nocivas, y por tanto, se comprenden bajo esta denominación, toda clase de rodenticidas, parasiticidas, fungicidas, herbicidas, pesticidas, etc., ya sea que actúen por contacto, por ingestión, o a través de la respiración, aunque solamente se refiera a aquéllos que pueden designarse como organofosforados.

Actualmente el uso de los plaguicidas se ha generalizado de tal manera, que no se puede prescindir de su auxilio, debido a lo cual existe la urgente necesidad de controlar dicho uso, pues las intoxicaciones, leves o graves, que provocan en el organismo humano o animal expuesto, son cada día más alarmantes.

Los plaguicidas sintéticos orgánicos, son muy importantes, especialmente los clorados y fosforados.

El alemán Gerhard Schrader, durante la segunda guerra mundial, tratando de encontrar los gases más tóxicos, accidentalmente, descubrió los plagui-

cidas organofosforados, que vinieron a evolucionar la agricultura. Sintetizó alrededor de 300 compuestos conteniendo fósforo orgánico.

Ahora existe una gran cantidad de compuestos organofosforados que se usan como plaguicidas y son compuestos que tienen en su molécula C, H, O y también pueden encontrarse S, N, Cl, F, grupos nitrilo, fenilo, alifáticos insaturados, dependiendo esto último del plaguicida de que se trate.

Entre los compuestos organofosforados más tóxicos se encuentra el parathion, que, en particular, ha causado muchos accidentes mortales, pero su supremacía en el mercado, ha descendido por el desarrollo de compuestos menos peligrosos como el malation, el clortion y el diazinón.

Según el modo de actuar de estos compuestos frente a las plagas, se les divide en dos grupos:

- a).—Los que se depositan sobre las superficies de las plantas, siendo ahí el lugar donde el insecto los toma, por ejemplo el parathion, y
- b).—Los que son absorbidos por las raíces de las plantas, para ser transportados a todos los tejidos, por medio de la savia y quedando así la planta con una concentración determinada de plaguicida, que es digerido por el insecto con las consecuencias inherentes, por ejemplo el octametilpirofosforamida (Metasistox de Bayer).

En 1956, en el Estado de California se registraron 156 casos de intoxicaciones por plaguicidas fosforados, siendo 128 por exposición al parathion, con tres muertes. En 1958, en México, se reportaron dos casos concretos de intoxicación. Uno de ellos, produjo la muerte. No sería remoto que hubieran ocurrido más, sin haber tenido noticias de ello.

Los riesgos por exposiciones a plaguicidas organofosforados, empiezan desde la fabricación o formulación, el almacenaje, transporte, distribución y comercio, y persisten hasta el momento de su aplicación y aún posteriormente, según su poder residual, lo que representa un factor de intoxicación potencial

en los seis millones de personas expuestas por razón de su trabajo a dichos plaguicidas, sin poderse precisar a cuántos más se extiende su amenaza en la República Mexicana y en el Mundo.

Más de dos millones de toneladas de plaguicidas sólidos y cincuenta mil toneladas de líquidos, se consumen, en México con fines agrícolas. Los algodoneros llegan a utilizar hasta un 10% del valor total de su cosecha, en gastos relacionados con la aplicación de plaguicidas.

La importancia de millares de productos empleados como plaguicidas y la aparición, día a día, de nuevas sustancias, hace más difícil el control adecuado. Debido a la gran cantidad y a lo variado de sus dosis letales, es difícil su clasificación desde el punto de vista químico o toxicológico, pero puede hacerse una clasificación de acuerdo con las vías de absorción, que son tres: la gastrointestinal, la absorción a través de la piel y por el tracto respiratorio. Atento lo anterior, debe evitarse el contacto de la piel con el líquido o con los polvos impregnados de plaguicidas; y debe evitarse la ingestión o la inhalación de polvos, vapores o pulverizaciones de esos productos. La gran mayoría refleja sus efectos sobre el sistema nervioso central, aún en dosis muy pequeñas.

Los plaguicidas organofosforados y todos sus derivados, tienen una acción importante que es su capacidad para inhibir o destruir la colinesterasa; la cual hidroliza a la acetilcolina en ácido acético y colina, encontrándose en sangre y tejidos principalmente.

ACTIVIDAD COLINESTERASICA

Existen dos enzimas que desdoblan a la acetilcolina:

a).—La colinesterasa o acetilcolinesterasa (verdadera o específica), que se encuentra principalmente en los tejidos nerviosos, en el cerebro y en los eritrocitos; en la médula adrenal y en la neuro-hipófisis, se encuentran grandes cau-

tidades de acetilcolinesterasa. Su concentración es más alta en la substancia gris que en la blanca del eje cerebroespinal, y

b).—La Pseudocolinesterasa (esterasa no específica), que se encuentra en varios tejidos animales como el plasma, páncreas, hígado, glándulas salivales, etc.

Los signos y síntomas de intoxicación por plaguicidas organofosforados, son, fundamentalmente, el resultado de la enérgica estimulación que se produce cuando la colinesterasa es insuficiente para destruir la acetilcolina que se acumula en las fibras postganglionares parasimpáticas, sistema nervioso central y sinápsis neuromuscular de los músculos estriados.

La muscarina estimula directamente las estructuras inervadas por los nervios colinérgicos postganglionares. Es un veneno poderoso que retarda los movimientos del corazón, produce descenso de la presión arterial, causa miosis, estrecha los bronquios, estimula la secreción de las glándulas salivales y sudoríparas y aumenta el peristaltismo intestinal. Además, no sólo actúa después de la sección de los nervios vegetativos, sino después de haber aparecido ya la degeneración de las fibras nerviosas.

La nicotina actúa principalmente en tres sitios:

- 1.—Sobre los ganglios del sistema nervioso vegetativo,
- 2.—Sobre las uniones mioneurales somáticas y,
- 3.—En el sistema nervioso central, preferentemente en el cerebro.

La acetilcolina actúa como la muscarina y la nicotina, en ciertos aspectos, de donde se deduce que los síntomas de estimulación parasimpática, son fácilmente identificados, y frecuentemente, son los primeros que aparecen en las intoxicaciones por plaguicidas organofosforados.

La acción que tiene la acetilcolina es bastante fugaz debido a que rápidamente es destruida por la colinesterasa.

REACCIONES QUIMICAS DE INHIBIDORES FOSFATO CON ESTERASAS

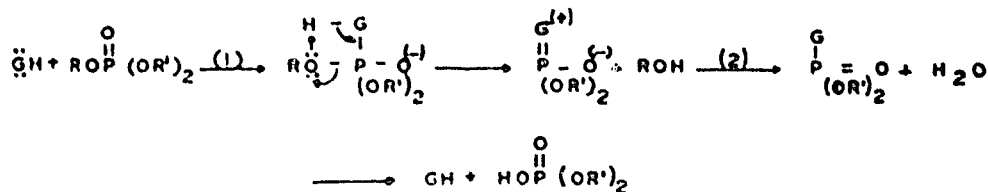
Se ha demostrado que por el uso de compuestos marcados con isótopos radioactivos y por análisis químico, que una variedad de compuestos organofosforados tóxicos se combinan con esterases en proporción de 1:1 por fosforilación de los centros activos de las enzimas. Parece que las enzimas actúan sobre estos inhibidores como los sustratos normales, los grupos básicos de la enzima hacen un ataque nucleofílico sobre el átomo de fósforo positivo, de tal manera que el éster es roto por actividad electrónica y protónica, pero en vez de separar los fragmentos de la hidrólisis de la enzima, como en el caso del sustrato normal acetilcolina, el átomo de fósforo permanece firmemente unido al lugar activo de la enzima, formando un compuesto estable, el cual no puede ser reactivado por dilución o diálisis como son los inhibidores de carbamato.

Aldridge, ha calculado que la mayor fuerza entre el átomo de fósforo y la enzima, es de cerca de 14 kilo-calorías/Mol, mejor que lo que resultaría de una absorción física.

Se ha sugerido un mecanismo de fosforilación presentándolo como un desarrollo en el que GH simboliza el grupo esterásico.

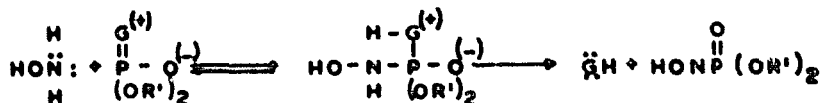
H, representa la porción ácida y G, el grupo del electrón transferible.

Step, los clasifica determinando cuando es baja la cantidad de enzima inactivada.



In vitro, la desfosforilación, después de la inhalación de TEPP ocurre muy lentamente (50% en cuatro semanas) y más rápidamente por la reacción con reactivos nucleofílicos, tales como la colina (75% en tres días), hidroxilamina (80% en cinco horas).

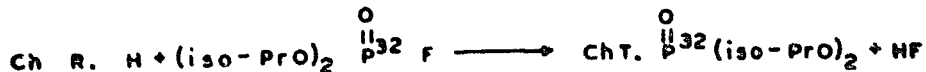
El mecanismo de la reacción reversible de la hidroxilamina, o la inhibición de la enzima, fué sugerido en la forma siguiente:



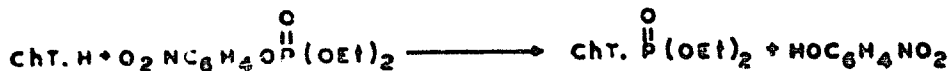
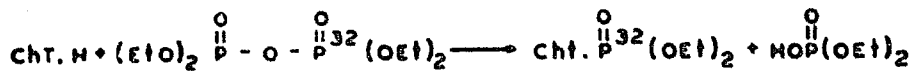
Ciertos ésteres fosforados, tales como o-o-dimetil-o-p-nitrofenil fosfato, presentan realmente una reacción reversible y la primera constante ha sido determinada como $8.7 \text{ (min}^{-1}\text{)}$ a 37°C , para la reacción de estos compuestos de colinesterasa de eritrocitos de conejos.

La acción natural de inhibición de la colinesterasa por los tóxicos fosforados está indicada por la fuerte acción protectora conseguida por el pretratamiento de la mamaliana o colinesterasa de los insectos por acetilcolina, colina o eserina.

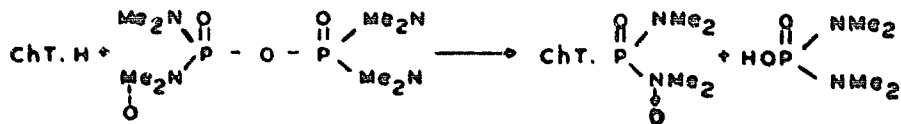
La siguiente reacción de fosforilación ha sido demostrada usando la quimotripsina purificada, la cual es realmente cuantable en forma cristalina y tiene una acentuada actividad esterolítica y colinesterásica.



En esta reacción el P^{32} y dos grupos iso propoxi, fueron demostrados como atacantes de la enzima, la cual fué reestabilizada en una forma reactiva y el HF fué liberado en un grado equimolar.



La octametil pirofosforamida 15 M, no inhibió la quimotripsina, pero al ser oxidado por KMnO_4 produjo un compuesto que inhibió la enzima a 5×10^{-3} M. La enzima inhibida contenía una cantidad equimolar de fósforo y una cantidad 1:1.5 M de grupos Me_2NH_2 y HCHO . La reacción es:



Una reacción similar tiene lugar con DFP y colinesterasa purificada.



En esta reacción el DFP no fué obtenido por diálisis o precipitación, mientras en la presencia de acetilcolinesterasa la cantidad de DFP fijada fué sólo de 6.7% de la obtenida en ausencia de acetilcolina.

El DFP $(iso-PrO)_2 \cdot \overset{O}{\parallel} P^{32} OH$ hidrolizado no tiene acción para las enzimas.

Estudios similares se han hecho usando DFP³² y colinesterasa de suero de caballo y esterasa de hígado de caballo y con C¹⁴ hexaetil tetrafosfato y colinesterasa de plasma purificada.

En las experiencias anteriores se llegó a la conclusión de que el éster fosfórico tóxico inhibe la esterasa por fosforilación del núcleo activo.

La formación de un compuesto enzima, inhibidor complejo, ha despertado mucho interés por determinar la forma en que se lleva a cabo la formación del grupo activo de la enzima.

Se ha demostrado que el diisopropil clorofosfato, el DFP y TEPP, pueden combinarse con grupos aminos y fenólicos para formar compuestos cristalinos definidos de la siguiente manera:



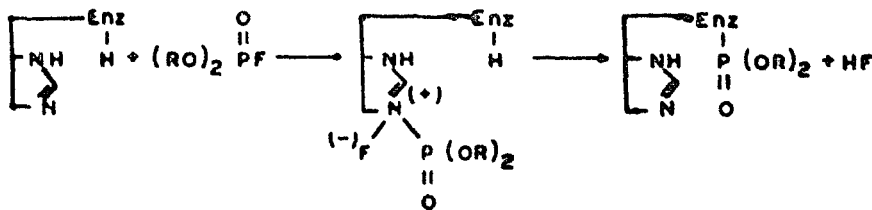
Con vic trihidroxifenoles, 1, 3-difosforilado se forman los productos siguientes:



En la continuación de estos estudios se encontró que la imidazola y compuestos ternarios nitrogenados similares, forman complejos inestables con el DFP.

De esta manera, se ha sugerido que el grupo imidazol sea el grupo funcional de la molécula de la colinesterasa.

El siguiente esquema propone la formación del complejo de la enzima de DFP y la fosforilación subsecuente:



Cuando la quimotripsina es inhibida por el DFP y el producto es hidrolizado por degeneración con ácido o por enzima, el ácido serín fosfórico es aislado e identificado con el ácido l-serín fosfórico sintético. Desde luego, las serinas proteínicas no reaccionan con el DFP. Parece ser que una configuración de aminoácidos puede representar el centro activo de la enzima rodeado de un residuo de serina reactiva en la quimotripsina.

HIDROLISIS ENZIMATICA DE LOS TOXICOS FOSFORADOS

Mazur, demostró que los dialquilfluorofosfatos fueron realmente detoxificados por una enzima, DFPasa, en hígado y riñón humanos y de conejos y también en plasma de conejo, en los que rompen los compuestos para formar el ión fluoruro y el ácido dialquilsfosfórico. La enzima actúa más fuertemente en los

compuestos con grupos alquilo más pequeños y fué inhibida por ión Hg, Ni, Zn y P y, en cambio, fué activada por el ácido p-Cl mercuribenzoico y por el nitrato fenil-mercurico. Aldridge, ha expresado que la alfa esterasa de la malmalian del plasma hidrolizó o-o-dietyl o-p-nitrofenilfosfato (para-oxón) pare formar parnitrofenol y ácido dietilfosfórico. Esta reacción fué inhibida por Cu, Ni, y ácido para-cloro mercuri-benzoico. La misma enzima hidrolizó el dietil-3-N-metil quinolina fosfato metasulfato (metasulfatofosfato de dietil-3-N-Metil quinolina). Una esterasa aromática similar, que hidroliza el para-oxón, parathión y compuestos similares, se encontró en los tejidos de los insectos.

TRANSFORMACION DE TIONOFOSFATOS A FOSFATOS

El parathión y muchos otros tionofosfatos plaguicidas producen síntomas colinérgicos en insectos y vertebrados. En casos severos de envenenamientos, varias colinesterasas tisulares se encontraron completamente inactivadas in vivo. Cuando en las primeras preparaciones de parathión, hubo continuaciones con el isómero S etil, un anticolinesterásico de alta actividad, se reportó que el parathión era por sí mismo un fuerte inhibidor in vitro de colinesterasa. Posteriormente fué demostrado que el parathión puro casi no tenía acción anticolinesterásica. Esta relativa inactividad fué también encontrada en muestras puras de metil e isopropil parationes, EPN, malatión, y otros tionofosfatos tóxicos. Algunas veces parece que estos compuestos son incapaces de combinarse directamente y fosforilar las esterasas como se ha demostrado con los ésteres del fósforo.

La incapacidad de ciertos tionofosfatos para funcionar directamente como enzimas inhibitoras, es probablemente el resultado de la gran estabilidad para la hidrólisis enzimática, puesto que se ha expresado que hay grados de correlación entre el grado de hidrólisis y la acción anticolinesterásica de un número de compuestos organofosforados.

Puesto que está ampliamente demostrada la inactivación de la colinesterasa por compuestos fosforados, podrá utilizarse esta característica para ayudar al diagnóstico médico en las intoxicaciones por plaguicidas organofosforados.

La actividad de la colinesterasa es diferente en cada organismo, y debido a esto, se han elaborado métodos para su determinación más exacta. A la fecha, se siguen elaborando estudios para obtener técnicas fáciles y a la vez favorables.

De los métodos más empleados para la determinación de dicha actividad tenemos:

- 1.—El Manométrico de Ammon.
- 2.—El Electrométrico de Michel H. O.
- 3.—La determinación de lo que se llama "Número de Dibucaina".
- 4.—El método Microcolorimétrico de Hestrin-Metcalf.
- 5.—Método visual de Davies y Nicholls, para estimar la Actividad de la colinesterasa en la sangre.

En el presente trabajo se realiza la comparación de dos métodos: Uno de ellos, el Davies y Nicholls, que es sencillo y rápido, y el propuesto en este trabajo, que es una modificación al ultramicroanálisis del método microcolorimétrico de Hestrin-Metcalf, el cual es muy laborioso pero tiene la ventaja de ser muy exacto.

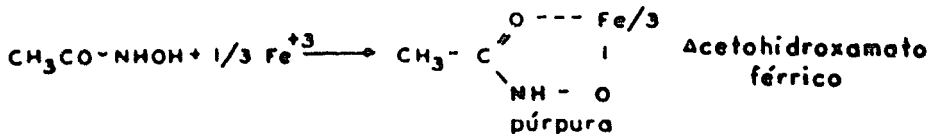
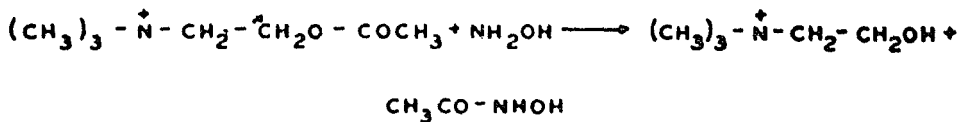
CAPITULO II

METODOS DE ANALISIS

ADAPTACION AL ULTRAMICROANALISIS DEL METODO DE HESTRIN METCALF

En el método microcolorimétrico, Hestrin determinó el cambio colorimétrico de la acetilcolina en presencia de un exceso del ión férrico al terminar la reacción enzimática, formando el acetohidroxamato férrico (acetilcolina-hidroxi-amilamina) de color púrpura, midiéndose a 540 mμ.

Las reacciones químicas que se llevan a cabo durante el proceso son las siguientes:



Los ésteres de ácidos carboxílicos y otras sustancias pueden también producir el color púrpura e interferir el método.

REACTIVOS

I.—Solución reguladora de fosfato, pH 7.2.

Se prepara mezclando 7 partes por volumen de una solución de difosfato de sodio $2H_2O$ (Na_2HPO_4) 11.576 g/lt. y 3 partes de una solución de fosfato de potasio (KH_2PO_4) 9.078 g/lt. Esta solución debe contener 0.004M de bromuro de acetilcolina. (Consérvese en el refrigerador cuando no se use).

II.—Clorhidrato de hidroxilamina, 2M en agua destilada. (Guárdese en el refrigerador mientras no se use).

III.—Hidróxido de sodio, 3.5 N

IV.—Acido clorhídrico conc. de p.e. 1.18. Diluir en dos partes por volumen de agua.

V.—Cloruro Férrico, 0.37 M en HCl 0.1N

PREPARACION DE LA CURVA ESTANDARD

En vasos de 10 ml. se colocan 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 y 1 ml. de la solución I (Solución reguladora de fosfato), y se lleva a 1.5 ml. con agua bidestilada. Se prepara una solución fresca de la mezcla de partes iguales de reactivos II y III, agregándose 3 ml. a cada uno de los vasos que contienen el reactivo I y agua, agitando vigorosamente.

Después de un minuto se agregan 1.5 ml. del reactivo IV, se agitan y se ajusta el pH a 1.2 ± 0.2 ; una vez ajustado el pH se agregan 1.5 ml. del reactivo V, se pasa cada problema a tubos de centrifuga y se centrifuga a 2500 RPM durante diez minutos. Es importante agitar la mezcla después de cada adición para evitar la formación de burbujas en el recipiente. La intensidad del color formado se determina inmediatamente a 540 m μ en el espectrocolorímetro (co

lorimetro fotoeléctrico), usando un blanco de corrección para color no específico con 1.5 ml. de agua bidestilada que se tratan como antes, excepto que el orden de la adición de la hidroxilamina alcalina (II y III) y el ácido clorhídrico (IV) se invierten. La transmitancia de los valores por ciento, se convierte a densidad óptica y se relaciona contra micromoles de acetilcolina en cada muestra, resultando una curva como la Fig. I.

Lecturas en el espectrocolorimetro a 540 m μ . (Spinco). Puntos resultantes:

<i>Transmitancia</i>	<i>Absorbancias</i>	<i>Abs. corregida.</i>	
Blanco	89	0.051	
0.1	84	0.076	0.025
0.2	79.8	0.098	0.047
0.3	74.5	0.128	0.087
0.5	66.5	0.177	0.126
1.0	50.0	0.301	0.248

Factor de Curva: 15.71

DETERMINACION ULTRAMICROANALITICA DE COLINESTERASA EN PLASMA

En este método se utilizó el equipo para ultramicroanálisis Beckman-Spinco. Se recogen aproximadamente 2 ml. de sangre venosa en tubos citratados al 30%.

La sangre se centrifuga en tubos de polietileno de 5 a 10 minutos a 2500 RPM para separar el plasma claro. De este se toman 20 μ l. y se pone dentro de un vaso de 10 ml. conteniendo 1.5 ml. de solución reguladora de bromuro de acetilcolina, pipeteando con pipeta de Shali y esta se lava tres veces (es conveniente llevar dos muestras a la vez), con solución reactivo. Esto es el "problema". El tiempo se anota y el vaso se mete en el baño maría a 37°C (preparado con anterioridad).

Al mismo tiempo, se preparan los blancos de reactivos y de plasma:

a).—Blanco de plasma. 1.5 ml. de solución I sin plasma.

b).—Blanco de reactivos. 1.5 ml. de agua bidestilada.

El problema, la solución "a" y la "b" se introducen al mismo tiempo en el baño maría y después de treinta minutos, exactamente, se agregan 3 ml. de mezcla de partes iguales de los reactivos II y III, a la muestra "Problema". Después de un minuto se agregan 1.5 ml. de ácido clorhídrico diluido. Se mezcla perfectamente y se toman 1.5 ml. de cada muestra, aforando después con agua bidestilada a 6 ml. Se ajusta el pH a 1.2 ± 0.2 . Por último, se agregan 1.5 ml. de cloruro férrico, a la muestra "a" o tipo, inmediatamente después de sacarla del baño maría, se le agregan 3 ml. de mezcla de partes iguales de los reactivos II y III. Se mezcla, se agregan 20 ul. de plasma claro con pipeta de Shali. Se mezcla perfectamente y se adicionan 1.5 ml. de ácido clorhídrico. Se toman 1.5 ml. del total de la muestra y se afora a 6 ml. con agua bidestilada, ajustando el pH a 1.2 ± 0.2 . Se agrega el cloruro férrico (1.5 ml.); a la muestra "b", se agrega inmediatamente después de los treinta minutos en el baño maría el ácido clorhídrico 1.5 ml., mezclar y adicionar 3 ml. de la mezcla alcalina de hidroxilamina. Se hace la dilución que se hizo en la muestra "problema" y muestra "a", se ajusta el pH a 1.2 ± 0.2 . Se agrega el cloruro férrico 1.5 ml.; y todas las muestras: "problema", "a" y "b", se centrifugan en tubos de centrífuga a 2500 RPM, durante diez minutos. Después de haber centrifugado, se lee a 540 m μ en el espectrocolorímetro y se hacen las correcciones de acuerdo con la curva ya preparada.

La muestra "a" o tipo tiene por objeto la corrección de las determinaciones por la hidrólisis no enzimática de la acetilcolina.

La cantidad de acetilcolina residual de la muestra se resta de la cantidad encontrada en el tipo o muestra "a" y el resultado representa los valores de la cantidad de acetilcolina en μ M hidrolizadas por 20 ul. de plasma en 30 minutos a 37°C.

El objeto de la muestra "b" o blanco es ajustar el aparato a 0.

Tomando en cuenta la cantidad de material biológico usado en el análisis, así como las diluciones practicadas para encontrar el valor de la actividad colinesterásica en uM de acetilcolina hidrolizadas, basta con aplicar la siguiente fórmula:

$$\text{Plasma} = A \times f_1$$

En donde A representa la diferencia de las densidades ópticas del problema y el tipo (valor de la hidrólisis no enzimática), y f_1 representa el factor numérico que resulta de considerar, tanto el factor de la curva de calibración, como las diluciones practicadas y corresponde .. 3152.

DETERMINACION ULTRAMICROANALITICA DE COLINESTERASA EN ERITROCITOS

Se centrifuga la sangre citratada a 2500 RPM durante 5-10 minutos y se separa el plasma que debe ser claro.

Las células rojas se lavan con solución de cloruro de sodio al 0.9%, centrifugando en tubos de polietileno y desechando el líquido sobrenadante cada vez (tres veces). Finalmente, se pipetea 20 ul. de células rojas lo más limpias posible en 100 ul. de agua bidestilada para hemolizarlas. La pipeta se lava absorbiendo tres veces en la solución. Para la determinación se usan 20 ul. de las células rojas hemolizadas, que se agregan a 1.5 ml. de la solución reguladora de bromuro de acetilcolina, como se describe para la determinación de la colinesterasa en plasma, siguiendo el mismo procedimiento; usando un tipo o muestra "a", que contiene el mismo volumen de células hemolizadas, agregándolas después del reactivo de hidroxilamina alcalina, la muestra "problema" y el blanco de reactivos "b", invirtiendo el orden del ácido clorhídrico y la hidroxilamina alcalina.

Se calcula la cantidad de acetilcolina hidrolizada en los eritrocitos igual que para el plasma, con diferencia en los cálculos, los que a continuación se describen:

$$\text{Eritrocitos} = B \times f_2$$

En donde B es la diferencia de las densidades ópticas del problema y el tipo (valor de la hidrólisis no enzimática) y f_2 representa el factor numérico que resulta de considerar el factor de la curva de calibración, así como las diluciones practicadas y corresponde a: 18933.

NOTA:—Es conveniente llevar a cabo todas las determinaciones al mismo tiempo, para aprovechar al máximo las condiciones de temperatura, pH y así también los aparatos como centrífuga, fotocolorímetro, baño maría, etc.

METODO VISUAL DE DAVIES Y NICHOLLS PARA ESTIMAR LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN SANGRE

Limperos y Ranta informaron de una prueba visual basada en el principio del método electrométrico en el cual el cambio de pH es seguido por el cambio en el color de un indicador, azul de bromotimol (ABT), en un medio de incubación, conteniendo sustrato y la muestra de sangre.

Davies y Nicholls encontraron que los diferentes colores empleados para la caracterización de los diferentes niveles de la actividad de la colinesterasa por esta prueba, eran difíciles de distinguir, sugiriendo, por lo tanto, utilizar como medida el tiempo requerido para el cambio de un color estable (por ejemplo: del verde al naranja). Los exámenes del método propuesto por Davies y Nicholls mostraron que podría obtenerse una enorme precisión en el

empleo del ABT como indicador de la actividad de la colinesterasa en la sangre, mediante el uso de un color ambarino logrado en el punto final a un pH de 6.7 ± 0.05 . Con el uso de este punto de coloración final, el tiempo de reacción se ha correlacionado con el nivel de la actividad de colinesterasa en sangre total empleando acetilcolina como sustrato.

REACTIVOS

- I.—Cloruro de acetilcolina. Disolver 300 mg. en 50 ml. de agua bidestilada.
- II.—Azul de Bromotimol, (ABT) 40 mg. de la sal de sodio se disuelven en el mínimo volumen de agua bidestilada y se afora con la misma a 140 ml. En seguida, se agregan 15 mg. de saponina y se agita hasta que la solución sea completa. A continuación, se agrega NaOH diluida, gota a gota, hasta que aparece un color azul. Finalmente, se ajusta el pH a 7.3-7.5. Después, se afora a 150 ml., con agua bidestilada. Esta solución puede cambiar de azul a azul verdoso con el tiempo, por tal motivo cada 24 hs., deberá ajustarse el pH con NaOH 0.1N.

III.—Solución reguladora de fosfato estándar 0.3M, pH 6.60-6.62; se mezcla 4.08% de KH_2PO_4 con solución 4.25% de Na_2HPO_4 , agitando hasta que el pH es 6.60-6.62. La adición de 0.5 ml. de solución reguladora a una mezcla de ABT y 0.02 ml. de sangre, dará una coloración ámbar con un pH 6.65-6.75.

METODO

A.—Un ml. de ABT se coloca en cada uno de tres tubos de 75x10 mm. El dedo de donde se extraerá la sangre deberá ser lavado con agua y jabón (si es posible con agua tibia), después se limpia con alcohol y una vez seco, el dedo, se punciona con una lanceta estéril, en tal forma que puedan obtenerse

tres muestras de 20 ul. sin apretar el dedo. Cada muestra se vacía dentro de los tubos que contienen ABT y se agita.

B.—Preparación del estándar de color: 0.5 ml. de la solución reguladora de fosfato 0.3M con pH de 6.60, se agregan a una de las mezclas y el ABT para lograr el color estándar (ámbar).

C.—Determinación de la actividad: Se colocan 0.5 ml. de la solución de acetilcolina 0.6% a los tubos de las muestras y se anota el tiempo exacto en que el color de la muestra experimental se iguala al del estándar preparado anteriormente.

Es preferible hacer la comparación contra luz blanca; la temperatura del ambiente debe anotarse.

Si el color inicial de la mezcla de ABT se aparta del color azul, es que ha habido una contaminación por un ácido y la prueba deberá repetirse.

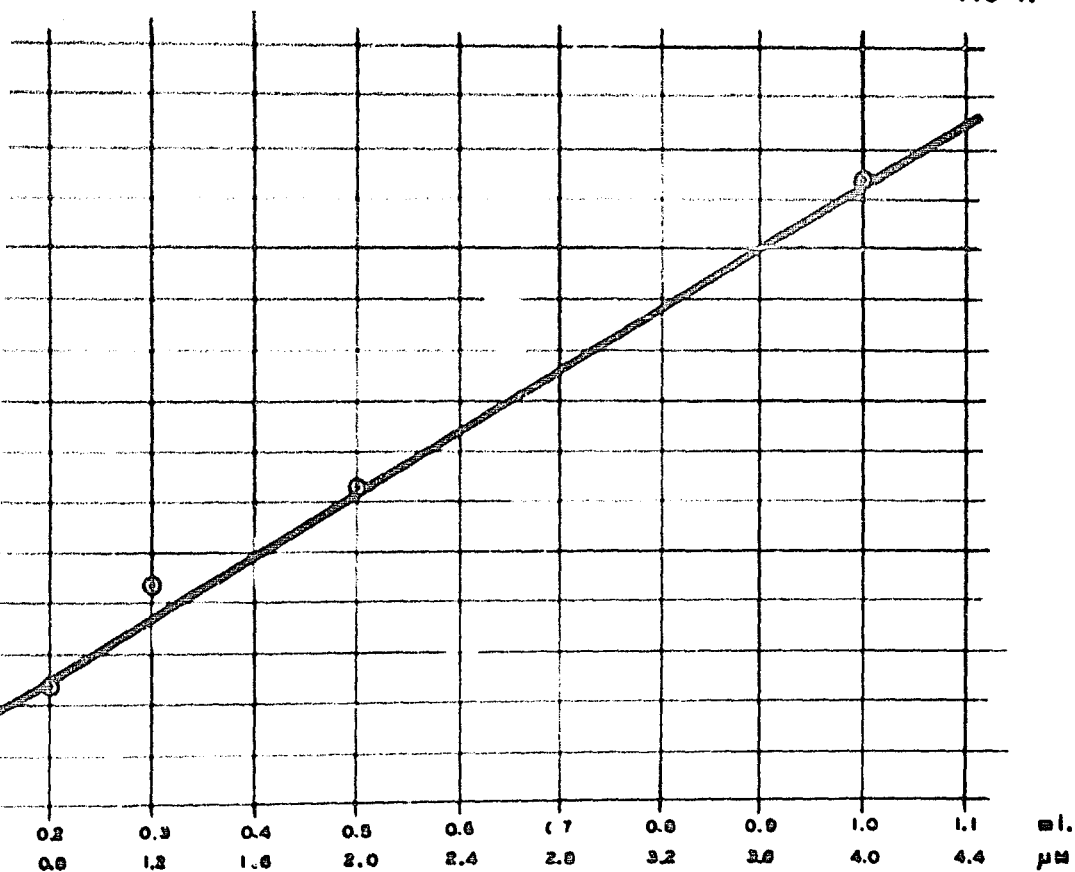
Los resultados obtenidos para el establecimiento de esta técnica, se dan en las tablas de la figura II, los cuáles al ser graficados, se obtuvieron las figuras III y IV, respectivamente.

Después de hacer el análisis a dichos resultados tomados como "normales" fué posible obtener la gráfica V, que nos permite calcular directamente la actividad de la colinesterasa en por ciento (%), haciendo uso de las fórmulas siguientes:

$$\frac{100}{\text{Tiempo encontrado}} = X$$

$$\text{Resultado} = \frac{X \times 100}{\text{Tiempo normal a temp. ambiente.}}$$

FIG 1.



CURVA PARA DETERMINAR ACTIVIDAD COLINESTERASICA
 METODO DE NESTRIN - METCALF FACTOR: 15-71

martha a. pineda rebadan

FIGURA II

EXPERIENCIAS PARA DETERMINAR LA VARIACION DE LA HIDRO-SILOSIS ENZIMATICA CON RELACION A LA TEMPERATURA

Prueba A	Temperatura	Tiempo (T)	100/T
1	20°C	13 min. 20 seg.	7.518
2	20°C	14 min. 55 seg.	6.711
3	20°C	17 min.	5.882
4	20°C	15 min. 30 seg.	6.451
5	20°C	17 min.	5.882
Promedio 100/T=6.663			

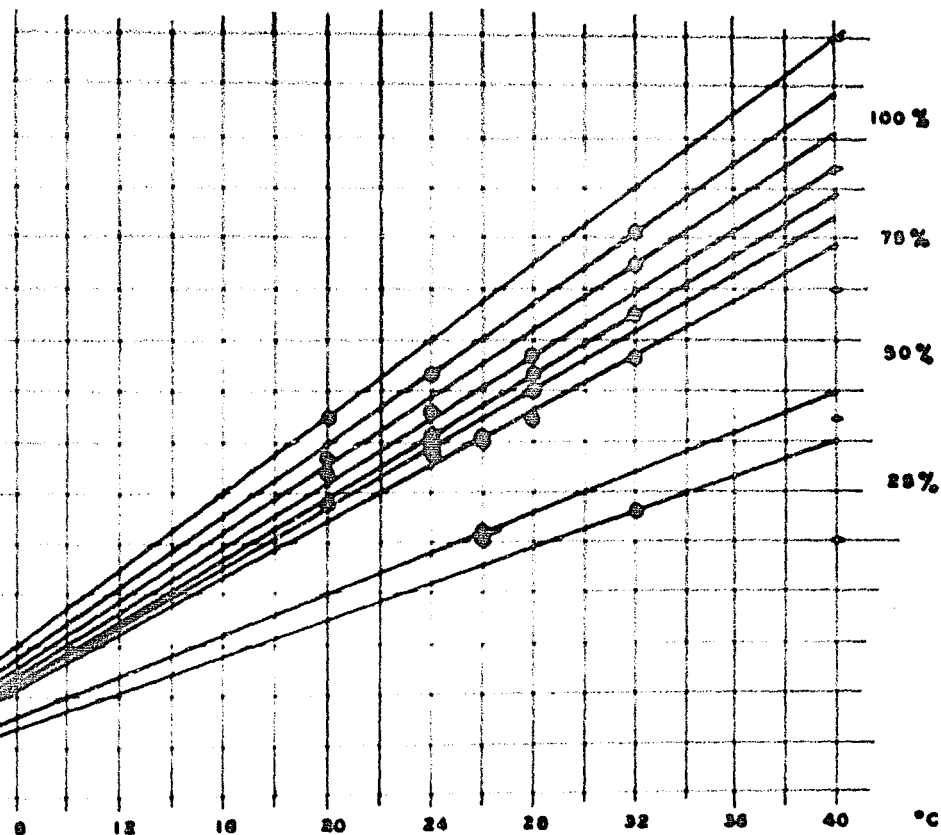
Prueba B	Temperatura	Tiempo (T)	100/T
1	24°C	12 min.	8.333
2	24°C	13 min.	7.692
3	24°C	14 min.	7.142
4	24°C	14 min.	6.993
5	24°C	14 min. 20 seg.	6.896
Promedio 100/T=7.411			

Prueba C	Temperatura	Tiempo (T)	100/T
1	26°C	19 min.	5.263
2	26°C	14 min.	7.142
3	26°C	20 min.	5.000
4	26°C	15 min.	7.000
5	26°C	19 min.	5.263
Promedio 100/T=7.88			

Prueba D	Temperatura	Tiempo (T)	100/T
1	28°C	13 min. 25 seg.	7.462
2	28°C	12 min.	8.333
3	28°C	12 min. 30 seg.	8.000
4	28°C	11 min. 30 seg.	8.333
5	28°C	11 min. 35 seg.	8.695
Promedio 100/T=8.322			

Prueba E	Temperatura	Tiempo (T)	100/T
1	32°C	17 min. 40 seg.	5.68
2	32°C	9 min. 30 seg.	10.52
3	32°C	10 min. 35 seg.	9.52
4	32°C	11 min. 30 seg.	8.69
5	32°C	9 min.	11.11
Promedio 100/T=9.12			

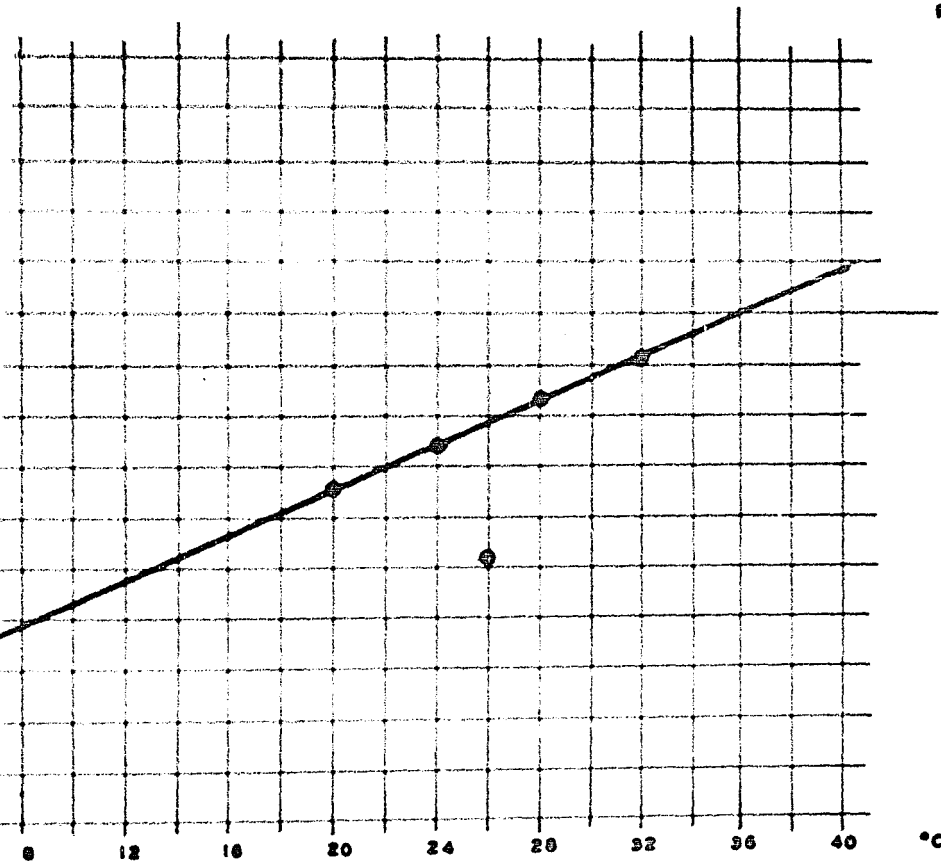
FIG III



CURVA PARA DETERMINAR ACTIVIDAD COLINESTERASICA
 METODO DEL A.B.T. EN SANGRE TOTAL

martha a. pineda rabaden

FIG IV



CURVA PARA DETERMINAR ACTIVIDAD COLINESTERASICA
 METODO DEL A.B.T. EN SANGRE TOTAL (PROMEDIO)

martha a. pineda rabadan

FIGURA V

100

T

Temp. °C	100%	75%	50%	25%
20	6.6	4.95	3.3	1.65
21	6.8	5.1	3.4	1.7
22	7.0	5.25	3.5	1.75
23	7.2	5.4	3.6	1.8
24	7.42	5.56	3.71	1.85
25	7.65	5.73	3.82	1.91
26	7.88	5.91	3.94	1.97
27	8.1	6.07	4.05	2.02
28	8.3	6.22	4.15	2.07
29	8.5	6.37	4.25	2.12
30	8.7	6.42	4.35	2.17
31	8.9	6.67	4.45	2.22
32	9.12	6.84	4.56	2.28

CAPITULO III

RESULTADOS

Los resultados que en este capítulo se presentan, y que se obtuvieron siguiendo las técnicas y lineamientos dados en capítulos anteriores, serán expuestos y analizados en tal forma, que sirvan para demostrar, tanto las ventajas que la técnica microcolorimétrica de Hestrin-Mectalf proporciona, como un método de precisión y alta sensibilidad en la dosificación de la actividad de colinesterasa, como las que posee el método de la estimación de la actividad de la colinesterasa en sangre total, de Davies y Nicholls.

Como se ha mencionado en múltiples ocasiones, a lo largo de este estudio, la actividad de la colinesterasa decrece, entre otras causas, por efecto de los plaguicidas organofosforados. Por otra parte, el valor enzimático que pudiera considerarse como basal y punto inicial del descenso, provocado por la acción de las sustancias anticolinesterásicas, es variable y lejos de ser un valor constante para un grupo de individuos, presenta variantes, a diferentes niveles, para uno solo de ellos. Con base en este hecho, en un estudio riguroso, es necesario practicar la determinación de la actividad de la enzima a los individuos, antes de ser expuestos, con objeto de encontrar su nivel basal promedio. Como esto resulta difícil de llevar a cabo en la práctica, se ha considerado

que los valores promedio de la actividad colinesterásica, de un grupo de individuos no expuestos, puede con las limitaciones del caso, tomarse como un valor basal para las posibles alteraciones en el personal en estudio. Indudablemente que esto acarreará un error, que quizá en algunos casos sea considerable, sin embargo, para las condiciones practicadas sobre las que está planteado el problema de las intoxicaciones en el campo y en la industria, debe aceptarse que un individuo con 80, 90, 100 ó 110% de la actividad de la colinesterasa, tanto desde el punto de vista clínico como preventivo, tiene el mismo significado. Ahora bien, pudiera presentarse el caso de aquellas personas cuya actividad enzimática es baja, en su valor original, lo cual sólo indica que este tipo de individuos son inaptos para este tipo de labores, por lo que no debe ser permitida su exposición.

Una vez definidos estos puntos aclaratorios fundamentales, se presentan en el Cuadro VI, los valores de actividad de la colinesterasa obtenidos en el grupo de personas no expuestas tomado como base en este estudio.

El análisis estadístico de este estudio se presenta a continuación:

PARA ACTIVIDAD DE COLINESTERASA EN PLASMA

Grupos de Frec.	Punto Medio	Z	X	N	ZX	ZX ²
40-69	55	2	0	2	2	4
70-99	85	15	1	17	15	225
100-129	115	29	2	46	58	3364
130-159	145	8	3	54	24	576
160-199	175	3	4	57	12	144
200-229	215	0	5	57	0	0
230-259	245	2	6	59	12	144
260-289	275	1	7	60	7	49
					<hr/> 130	<hr/> 4503

$$I.C. = 30$$

$$40 \cdot 250$$

$$V_1 = \frac{130}{60} = 2.1; \quad V_2 = \frac{4506}{60} = 75.1$$

$$\bar{M}_2 = 75.1 - (2.1)^2 = 70.69$$

$$M_2 = 70.69 \cdot 0.0833 = 70.6067$$

$$G = \sqrt{M_2} = \sqrt{70.6067} = 8.41$$

$$\text{Media} = (2.1 \times 30) + 55 = 118 \times \frac{2}{1000} = 0.236$$

$$\text{Desv. standard} = 8.41 \times 30 = 252.3$$

$$\text{Coef. de variación} = \frac{252.3}{118.0} = 2.13$$

$$\text{E.S. media} = \frac{252.3}{\sqrt{60}} = \frac{252.3}{7.71} = 32.7$$

$$\text{E.S. Desv. Standard} = \frac{252.3}{34.5} = \frac{252.3}{\sqrt{2 \times 60}} = 7.31$$

$$R - 118.0 - 32.7 = 0.2360 - 0.0654$$

Resultado final: 0.236-0.065 Milimoles de acetilcolina hidrolizados por ul de plasma en una hora a 37°C.

PARA ACTIVIDAD DE COLINESTERASA EN ERITROCITOS

Grupos de frec.	Punto medio.	Z	N	X	XZ	ZX ²
220-309	45	7	7	0	0	0
310-399	355	15	22	1	15	225
400-489	445	14	36	2	28	784
490-579	535	12	48	3	36	1296
580-669	625	6	54	4	24	576
670-759	715	3	57	5	15	225
760-849	805	1	58	6	6	36
850-939	895	2	60	7	14	196
		60			138	3338

IC. — 90

220 910

$$V_1 = \frac{138}{60} = 2.3; \quad V_2 = \frac{3338}{60} = 55.633$$

$$\bar{M}_1 = 55.633 - 5.29 = 50.343.$$

$$M_2 = 50.343 - 0.0833 = 50.2597.$$

$$G = \sqrt{50.25} = 7.22$$

$$\text{Media} = (2.3 \times 90) + 265 = 472 \times \frac{2}{1000} = 0.944$$

$$\text{Desv. Standard} = 7.22 \times 90 = 649.8$$

$$\text{E.S. media} = \frac{64.98}{7.71} = 8.42$$

$$\text{Coef. de Variación} = \frac{64.98}{472} \times 100 = 137.6$$

$$\text{E.S. desv. standard} = \frac{64.98}{65.42} = 1.21$$

Resultado final: 0.944 \pm 0.0178 milimoles de acetilcolina hidrolizados por ul-
de eritrocitos en una hora a 37°C.

En donde: I.G. = Intervalo de grupo.

Punto medio— Valor medio del primer grupo de frecuencia (añadir, al límite inferior del grupo, la mitad del intervalo).

Z —No. de datos que caen en cada grupo.

N —Frecuencia acumulativa (de Z), el último número debe ser el número de datos analizados.

X —Numeración a partir de 0 en orden ascendente.

ZX — Multiplicando el valor de Z por el de X.

ZX²—El valor de ZX elevado al cuadrado.

Los resultados de la dosificación colinesterásica, de las personas no expuestas, referido al valor encontrado como de 100% y las cifras obtenidas en la dosificación de sangre total, de Davies y Nicholls, se indican en el cuadro VII.

Como puede observarse, en el cuadro VII existen diversos individuos cuyos valores porcentuales en relación al promedio, se encuentran en el grupo que podría considerarse como clínicamente significativo, no obstante, estas personas son normales desde el punto de vista médico y sólo corroboran lo antes mencionado, de ser funcionalmente inaptas para ser expuestas a los inactivadores colinesterásicos. En los cuadros VI y VII se observa que existen diferencias entre los valores normales, obtenidos para cada una de las personas no expuestas, quizá debido a las diferentes condiciones de vida. Esto indica que para una investigación de los valores basales colinesterásicos, los grupos en estudio deben constituirse con individuos de las mismas regiones y hábitos que las personas propuestas para ser estudiadas, con objeto de efectuar estimaciones más certeras de los valores reales.

Una vez establecidos nuestros valores basales se consideró necesario el evaluar la bondad de las técnicas propuestas en un grupo de personas efectivamente expuestas a los tóxicos fosforados ya mencionados. Para esto, se seleccionó el personal que labora en la zona agrícola de Apatzingán, Mich., en la que son usados los plaguicidas del tipo del metil y etil parathión y o-etil. p-paranitrofenil, fenil fosforo tioato.

Los resultados encontrados en el grupo de personas examinadas, así como la relación entre los hallazgos médicos y los valores de laboratorio, se encuentran en el cuadro VIII, en el que se aprecia la relación que existe entre los valores encontrados con la técnica de Hestrin-Metcalf y los encontrados con la técnica estimativa de Davies y Nicholls. De tales valores se desprende que la prueba de Hestrin-Metcalf guarda una relación estrecha con respecto a las condiciones clínicas del individuo, hecho que en forma general se observa también en las cifras obtenidas con el método de Davies y Nicholls.

CUADRO VI

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE COLINESTERASA EN SANGRE DE PERSONAS NORMALES.

CASO No.	PLASMATICA	ERITROCITICA
1	242.8 Unidades	979.8 Unidades
2	265.8 "	892.0 "
3	242.0 "	730.2 "
4	212.6 "	627.6 "
5	249.4 "	737.8 "
6	229.2 "	1024.2 "
7	256.6 "	737.8 "
8	289.6 "	743.4 "
9	280.6 "	748.8 "
10	254.8 "	594.6 "
11	239.3 "	462.4 "
12	239.2 "	704.8 "
13	258.4 "	787.5 "
14	227.4 "	627.6 "
15	196.2 "	726.8 "
16	254.0 "	859.0 "
17	254.8 "	594.6 "
18	188.0 "	979.8 "
19	238.0 "	737.8 "
20	220.6 "	563.4 "
21	328.2 "	737.8 "
22	204.2 "	447.8 "

CASO No.	PLASMATICA	ERITROCITICA
23	166.0 Unidades	621.4 Unidades
24	88.2 "	946.6 "
25	163.8 "	624.7 "
26	195.4 "	511.1 "
27	182.8 "	549.0 "
28	327.8 "	946.6 "
29	258.4 "	492.2 "
30	258.4 "	511.1 "
31	170.2 "	795.0 "
32	88.2 "	946.6 "
33	163.8 "	624.7 "
34	195.4 "	511.1 "
35	182.8 "	549.0 "
36	327.8 "	946.6 "
37	258.4 "	492.2 "
38	258.2 "	511.1 "
39	195.4 "	755.0 "
40	214.2 "	908.6 "
41	239.2 "	908.6 "
42	263.4 "	870.6 "
43	239.2 "	643.6 "
44	208.0 "	870.7 "
45	195.4 "	719.2 "
46	264.6 "	681.4 "
47	226.8 "	586.8 "

CASO No.	PLASMATICA	ERITROCITICA
48	239.4 Unidades	757.2 Unidades
49	258.4 "	624.6 "
50	233.2 "	530.0 "
51	182.8 "	832.8 "
52	277.2 "	681.4 "
53	298.8 "	908.6 "
54	252.0 "	832.8 "
55	182.8 "	984.2 "
56	245.8 "	946.4 "
57	258.4 "	605.7 "
58	233.2 "	548.9 "
59	195.4 "	530.0 "
60	277.2 "	567.9 "

CUADRO VI

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE COLINESTERASA EN SANGRE DE PERSONAS NORMALES.

CASO No.	PLASMATICA	ERITROCITICA
1	242.8 Unidades	979.8 Unidades
2	265.8 "	892.0 "
3	242.0 "	730.2 "
4	212.6 "	627.6 "
5	249.4 "	737.8 "
6	229.2 "	1024.2 "
7	256.6 "	737.8 "
8	289.6 "	743.4 "
9	280.6 "	748.8 "
10	254.8 "	594.6 "
11	239.3 "	462.4 "
12	239.2 "	704.8 "
13	258.4 "	787.5 "
14	227.4 "	627.6 "
15	196.2 "	726.8 "
16	254.0 "	859.0 "
17	254.8 "	594.6 "
18	188.0 "	979.8 "
19	238.0 "	737.8 "
20	220.6 "	563.4 "
21	328.2 "	737.8 "
22	204.2 "	447.8 "

CASO No.	PLASMATICA	ERITROCITICA
23	166.0 Unidades	621.4 Unidades
24	88.2 "	946.6 "
25	163.8 "	624.7 "
26	195.4 "	511.1 "
27	182.8 "	549.0 "
28	327.8 "	946.6 "
29	258.4 "	492.2 "
30	258.4 "	511.1 "
31	170.2 "	795.0 "
32	88.2 "	946.6 "
33	163.8 "	624.7 "
34	195.4 "	511.1 "
35	182.8 "	549.0 "
36	327.8 "	946.6 "
37	258.4 "	492.2 "
38	258.2 "	511.1 "
39	195.4 "	755.0 "
40	214.2 "	908.6 "
41	239.2 "	908.6 "
42	263.4 "	870.6 "
43	239.2 "	643.6 "
44	208.0 "	870.7 "
45	195.4 "	719.2 "
46	264.6 "	681.4 "
47	226.8 "	588.8 "

CASO No.	PLASMATICA	ERITROCITICA
48	239.4 Unidades	757.2 Unidades
49	258.4 "	624.0 "
50	233.2 "	530.0 "
51	182.8 "	832.8 "
52	277.2 "	681.4 "
53	298.8 "	908.6 "
54	252.0 "	832.8 "
55	182.8 "	984.2 "
56	245.8 "	946.4 "
57	258.4 "	605.7 "
58	233.2 "	548.9 "
59	195.4 "	530.0 "
60	277.2 "	567.9 "

CUADRO VII

DETERMINACION DE LA COLINESTERASA EN SANGRE DE PERSONAS NORMALES

Caso No.	Método de Hestrin-Metcalf.		Método de Davies-Nicholls
	Plasmática	Eritrocítica	Total
1	102.8 %	146.2 %	113.9 %
2	112.6 ..	133.1 ..	168.0 ..
3	102.5 ..	108.9 ..	97.7 ..
4	90.0 ..	93.6 ..	111.0 ..
5	105.5 ..	110.1 ..	118.0 ..
6	97.1 ..	152.2 ..	115.0 ..
7	108.7 ..	110.1 ..	112.0 ..
8	122.7 ..	110.9 ..	117.0 ..
9	118.8 ..	111.6 ..	112.0 ..
10	107.9 ..	88.7 ..	112.0 ..
11	101.3 ..	69.0 ..	110.0 ..
12	101.3 ..	105.1 ..	117.5 ..
13	109.4 ..	117.5 ..	118.1 ..
14	96.3 ..	93.6 ..	101.0 ..
15	83.1 ..	108.4 ..	93.6 ..
16	107.6 ..	128.2 ..	110.0 ..
17	107.9 ..	88.7 ..	112.0 ..
18	79.6 ..	146.2 ..	62.2 ..
19	100.8 ..	110.1 ..	112.0 ..
20	93.4 ..	84.0 ..	101.6 ..

Caso No.	Plasmática	Eritrocítica	Total
21	139.0 %	110.1 %	112.0 %
22	86.4 "	66.8 "	97.7 "
23	70.3 "	92.7 "	95.6 "
24	37.3 "	141.2 "	76.6 "
25	69.4 "	93.2 "	79.5 "
26	82.7 "	76.2 "	84.1 "
27	77.4 "	81.9 "	86.3 "
28	138.8 "	141.2 "	93.4 "
29	109.4 "	73.4 "	76.5 "
30	109.4 "	76.2 "	91.6 "
31	76.3 "	118.6 "	95.6 "
32	37.3 "	141.2 "	76.6 "
33	69.4 "	93.2 "	79.5 "
34	82.7 "	76.2 "	84.1 "
35	77.4 "	81.9 "	86.3 "
36	138.8 "	141.2 "	93.4 "
37	109.4 "	73.4 "	76.5 "
38	109.4 "	76.2 "	91.6 "
39	82.7 "	112.6 "	77.1 "
40	90.7 "	135.5 "	112.0 "
41	101.3 "	135.5 "	96.2 "
42	111.6 "	129.8 "	83.0 "
43	101.3 "	95.5 "	116.5 "
44	88.1 "	129.8 "	97.7 "
45	82.7 "	107.4 "	76.3 "
46	112.1 "	101.7 "	91.9 "
47	96.1 "	87.5 "	115.3 "

Caso No.	Plasmática	Eritrocítica	Total
48	101.5 ..	113.0 ..	121.2 ..
49	109.4 %	93.2 %	111.8 %
50	98.8 ..	79.1 ..	131.0 ..
51	77.4 ..	124.1 ..	100.0 ..
52	117.4 ..	101.7 ..	106.0 ..
53	122.7 ..	135.5 ..	126.2 ..
54	106.7 ..	124.1 ..	72.3 ..
55	77.4 ..	146.8 ..	102.9 ..
56	104.1 ..	141.2 ..	95.3 ..
57	109.4 ..	90.4 ..	91.9 ..
58	98.8 ..	81.9 ..	105.0 ..
59	82.7 ..	78.1 ..	94.8 ..
60	117.4 ..	84.7 ..	98.0 ..

CUADRO VIII

RELACION DE LA DETERMINACION DE COLINESTERASA EN SANGRE
DE PERSONAS EXPUESTAS A PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Caso No.	Método de Hestrin Metcalf.		Método de Davies-Nicholls
	Plasmática	Eritrocítica	Total
1	232.0 Unid.	670.0 Unid.	82.3 %
2	179.8 "	642.4 "	72.1 "
3	147.6 "	433.6 "	80.0 "
4	269.6 "	706.4 "	64.2 "
5	77.0 "	385.4 "	66.2 "
6	263.2 "	384.0 "	82.4 "
7	122.0 "	384.0 "	121.3 "
8	160.0 "	449.6 "	83.7 "
9	70.6 "	674.4 "	59.1 "
10	256.8 "	578.0 "	79.5 "
11	224.0 "	578.0 "	50.7 "
12	384.0 "	513.8 "	103.5 "
13	198.8 "	578.0 "	153.8 "
14	109.2 "	321.2 "	63.4 "
15	70.6 "	449.6 "	46.8 "
16	64.0 "	642.4 "	50.8 "
17	122.0 "	321.2 "	95.6 "
18	295.2 "	513.8 "	31.7 "
19	173.2 "	578.0 "	79.3 "
20	64.0 "	674.4 "	57.8 "

Caso No	Plasmática	Eritrocítica	Total
21	122.0 Unid.	449.6 Unid.	70.4 %
22	295.2 "	706.6 "	76.3 "
23	173.2 "	546.0 "	77.0 "
24	64.0 "	417.4 "	29.1 "
25	64.0 "	546.0 "	77.0 "
26	295.2 "	898.0 "	95.0 "
27	141.2 "	64.8 "	32.6 "
28	166.8 "	417.4 "	72.5 "
29	147.8 "	610.2 "	65.3 "
30	147.8 "	546.0 "	81.1 "
31	141.2 "	931.4 "	60.3 "
32	6.4 "	0.0 "	15.5 "
33	151.2 "	289.0 "	70.4 "
34	134.8 "	417.4 "	42.3 "
35	147.6 "	546.0 "	59.8 "

RESULTADOS DADOS EN POR CIENTO

Caso No.	Método de Hestrin-Metcalf		Método de Davies-Nicholls
	Plasmática	Eritrocítica	Total
1	91.3 %	100.0 %	82.3 %
2	76.1 "	95.8 "	72.1 "
3	62.5 "	64.7 "	80.0 "
4	114.2 "	105.3 "	64.2 "
5	32.6 "	57.5 "	66.2 "
6	111.5 "	57.3 "	82.4 "
7	51.6 "	57.3 "	121.3 "
8	68.2 "	67.1 "	83.7 "
9	29.9 "	100.5 "	59.1 "
10	108.8 "	86.4 "	79.5 "
11	94.2 "	86.4 "	50.7 "
12	162.2 "	76.6 "	103.5 "
13	83.9 "	86.4 "	153.8 "
14	46.2 "	47.9 "	63.4 "
15	29.9 "	67.1 "	46.8 "
16	27.1 "	95.8 "	50.8 "
17	51.6 "	47.9 "	95.6 "
18	125.0 "	76.6 "	31.7 "
19	73.3 "	86.4 "	79.3 "
20	27.1 "	100.5 "	57.8 "
21	27.1 "	67.1 "	70.4 "
22	125.0 "	105.3 "	76.3 "
23	62.5 "	81.4 "	77.0 "

Caso No.	Plasmática	Eritrocítica	Total
24	46.2 %	124.5 %	29.1 %
25	78.8 "	81.4 "	77.0 "
26	125.0 "	134.0 "	95.0 "
27	59.8 "	9.5 "	32.6 "
28	70.6 "	124.5 "	72.5 "
29	62.6 "	91.0 "	65.3 "
30	62.6 "	81.4 "	81.1 "
31	59.8 "	139.0 "	60.3 "
32	2.7 "	0. "	15.5 "
33	64.0 "	86.2 "	70.4 "
34	57.1 "	124.5 "	42.3 "
35	62.5 "	81.4 "	59.8 "

CAPITULO IV

RESUMEN

En este trabajo se hace un estudio de la determinación de la actividad de colinesterasa en sangre a los trabajadores expuestos a plaguicidas organo-fosforados.

Después de mencionar brevemente otros métodos que no se estudian por estimarse que presentan mayores dificultades y menos seguridad en sus resultados, se proponen dos métodos para dicha determinación: El de Davies y Nicholls, que se realiza en sangre total, y el de Hestrin-Metcalf que se hace en plasma y eritrocitos, separadamente. El primero (en sangre total), es un método rápido y grueso, que permite hacer un diagnóstico precoz de la intoxicación por plaguicidas organo-fosforados, para seleccionar el personal al que habrá de practicarse el segundo método (en plasma y eritrocitos), que es más preciso y veraz, para un diagnóstico definitivo.

En la exposición que se hace en este trabajo, se aprecia la comparación de la actividad de la colinesterasa, por los dos métodos, tanto en personal no expuesto (testigos), como en personal expuesto a tóxicos fosforados. Por lo que se refiere a personas expuestas debe decirse que se hizo el estudio relativo en la

zona agrícola de Apatzingán, Mich., en donde, por su producción algodonera intensiva, se presenta el problema del control de las plagas, utilizando para tal objeto plaguicidas organo fosforados y como consecuencia existe el riesgo de las frecuentes intoxicaciones.

Con el apoyo de la Dirección de Higiene Industrial de la Secretaría de Salud y Asistencia, durante los últimos días de Noviembre del año anterior, se llevo material de Laboratorio a Apatzingán y se tomaron muestras a trabajadores de fábricas de plaguicidas, establecidas en la población. Como resultado del estudio que abarcó un período de mas de ocho meses, se encontró, que del grupo de personas analizadas, mas de la mitad tuvieron intoxicaciones previas. El diagnóstico final, realizado con la ayuda de la Clínica Médica de la propia Dirección de Higiene Industrial indicó: 11 normales; dos con absorción, no peligrosa, de éster fosfórico, y 22 (63.2%) con actividades de colinesterasa bajas; o sea, que sólo el 36.8% del grupo de obreros estudiados estaba en condiciones de trabajo.

Comparando los resultados de actividad plasmática y eritrocítica, con la total, como se hace notar en el capítulo relativo, se obtiene una concordancia de 73.7%, lo que indica que esta última, puede ser considerada como una buena prueba ceblazo, según se expresa en el siguiente y último capítulo de Conclusiones.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

Considerando que la intoxicación por plaguicidas fosforados, como se dijo en el primer capítulo de este trabajo, es un problema de mayor amplitud cada día, se pensó que era importante encontrar un método que resultara práctico y rápido, para la detección de tales intoxicaciones.

En el presente estudio se demostró que esto puede llevarse a cabo en el mismo lugar de trabajo, utilizando el método de Davies y Nicholls, básicamente, para identificar al personal intoxicado, o quizá, sólo sobreexposto en forma masiva. Sin embargo, este método no puede, por sí sólo, dar una idea precisa del grado de intoxicación del individuo, lo cual obliga a utilizar una técnica de mayor exactitud, aunque más laboriosa.

En consecuencia, con la técnica de Davies y Nicholls es posible seleccionar, en forma gruesa, al grupo de personas con actividades de colinesterasa abateda y sólo sobre este número reducido de individuos, utilizar el método de Hestrin Metcalf que en este trabajo se ha adaptado al ultramicroanálisis.

Para tener una relación de la actividad de la colinesterasa, en personas expuestas a plaguicidas organo-fosforados, se pensó hacer la determinación de esa

actividad de la colinesterasa, en trabajadores de la zona agrícola de Apantzingán, Mich., donde se usan dichos plaguicidas en grandes cantidades. En tal estudio se encontró que el 35% de un grupo de 35 trabajadores, han tenido intoxicaciones previas, de acuerdo con los resultados de actividad de colinesterasa y el estudio clínico correspondiente.

En este grupo, se obtienen promedios de 74.5% para la eritrocítica y 66.54% para la plasmática que son elementos que dan idea de la acción nociva de los plaguicidas.

En 35 casos estudiados por clínica y laboratorio, se obtuvieron los siguientes diagnósticos:

- 11 Normales.
- 2 casos con absorción, no peligrosa, de éster fosfórico; y
- 22 (63.2%) con actividad de colinesterasa baja, o sea que sólo 36.8% de este grupo, estaba en condiciones de trabajar en este tipo de industria.

La determinación de la actividad de la colinesterasa en sangre total, dió una concordancia de 73.7% comparando sus resultados con los de la plasmática y eritrocítica, separadamente, lo cual indica su utilidad como prueba coadjuva.

Se llega a la conclusión, por todos estos medios, de que la alta peligrosidad y funestos resultados, encontrados en este estudio, reflejan lo que está sucediendo en algunas zonas algodoneras y de cultivos intensivos del país, sin dejar de reconocer que, posiblemente, existan contadas zonas en las que se hacen aplicaciones de plaguicidas y se siguen buenas normas de protección.

Finalmente, se hace notar que en este trabajo solamente se trató de encontrar la solución para dosificar la actividad de la colinesterasa por dos de

actividad de la colinesterasa, en trabajadores de la zona agrícola de Apatzingán, Mich., donde se usan dichos plaguicidas en grandes cantidades. En tal estudio se encontró que el 58% de un grupo de 35 trabajadores, han tenido intoxicaciones previas, de acuerdo con los resultados de actividad de colinesterasa y el estudio clínico correspondiente.

En ese grupo, se obtienen promedios de 74.5% para la eritrocítica y 66.34% para la plasmática que son elementos que dan idea de la acción nociva de los plaguicidas.

En 35 casos estudiados por clínica y laboratorio, se obtuvieron los siguientes diagnósticos:

- 11 Normales.
- 2 casos con absorción, no peligrosa, de éster fosfórico; y
- 22 (63.2%) con actividad de colinesterasa baja, o sea que sólo 36.8% de este grupo, estaba en condiciones de trabajar en este tipo de industria.

La determinación de la actividad de la colinesterasa en sangre total, dió una concordancia de 73.7% comparando sus resultados con los de la plasmática y eritrocítica, separadamente, lo cual indica su utilidad como prueba ce-dazo.

Se llega a la conclusión, por todos estos medios, de que la alta peligrosidad y funestos resultados, encontrados en este estudio, reflejan lo que está sucediendo en algunas zonas algodoneras y de cultivos intensivos del país, sin dejar de reconocer que, posiblemente, existan contadas zonas en las que se hacen aplicaciones de plaguicidas y se siguen buenas normas de protección.

Finalmente, se hace notar que en este trabajo solamente se trató de encontrar la solución para dosificar la actividad de la colinesterasa por dos de

los métodos que se consideraron de mejor aplicación a nuestro problema. No obstante, los últimos y frecuentes avances de la tecnología analítica, han revelado nuevos y quizá mejores procedimientos. En consecuencia, las técnicas aquí propuestas pueden ser aplicadas para casos similares al descrito, con buenos resultados, como fué demostrado, sin que deba olvidarse la existencia de otros métodos con finalidad similar.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

- Dale J. "Pharmacol Exp. Therap".—Vol. VI, (1914) Pág. 147.
- Folch A. y Pi. "Tratado de Farmacología Aplicada".—Vol. II, (1953) Págs. 814, 844, 859.
- Gunter Cweig.—"Analytical Methods for Pesticides, Plant, Growth Regulators, and food additives".—Vol. I, (1963) Pág. 383.
- Havelton, L. W. "Pesticide Toxicity". Review of current knowledge of toxicity of inhibitors insecticides Agric. and food chem.—Vol. III, (1955) Págs. 312-319.
- Journal American Medical Association.—(1952) Págs. 149, 738.
- Fleisher Joseph H., M. S., H. G. Stanley Woodson, B. S. and Simet Leon, M. S. Army Chemical Center, Md.—(1956) Págs. 510-520.
- Journal of Economic Entomology.—Vol. 44, (1959) Págs. 883-890.
- Metcalf Robert L. Organic Insecticides.—(1955) Págs. 251, 252, 265, 275, 279.
- Malagón M. Bertha. Tesis Profesional. "La Actividad de la colinesterasa en la intoxicación por éteres del ácido fosfórico".—(1958) Págs. 11, 19.
- Plattner F. y H. Hunter, "Arch. Ges. Pflanzl".—(1930) Págs. 19, 22.
- Revista del Instituto de Salud Ocupacional.—Vol. VIII, No. 1. Enero, Junio, Lima, Perú. (1963).
- Stedman E. Stedman F. y Eason A. "Biochem Journal".—(1932) Págs. 26, 205.