

Determinación de los niveles de referencia de la colinesterasa plasmática en el ganado vacuno de la Zona Sur del Lago de Maracaibo, Venezuela.

RAMÍREZ MARÍA ISABEL, SÁNCHEZ NADIA CAROLINA, JOSÉ RAFAEL LUNA*,
JESÚS ALBERTO PEÑA, CARMEN ZULAY LABRADOR, JOSÉ FERNANDO OVALLES.

*Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. e-mail: lunajr@ula.ve

RESUMEN

En Venezuela, los niveles considerados como referencia de la colinesterasa plasmática en el ganado vacuno generalmente son de distintas poblaciones; esta distinción se debe a variaciones que incluyen factores como raza, edad, sexo, condiciones climáticas y geográficas, entre otras. Debido a esto, es recomendable establecer niveles de referencia propios de las poblaciones consideradas con riesgo de exposición a sustancias inhibitoras de la colinesterasa, y obtener de esta manera los niveles basales más cercanos a la población ganadera de una región determinada. Con base a lo anterior, en este trabajo, se determinaron los niveles de referencia de la colinesterasa plasmática en dos fincas ubicadas en la Zona Sur del Lago de Maracaibo. Los resultados obtenidos, muestran un valor comprendido entre 251.77 y 459.57 U/l. Estos resultados, permitirán no solo establecer controles periódicos de los animales de esa región, sino también utilizarlos como herramienta de diagnóstico en caso de intoxicación por inhibidores de la colinesterasa.

ABSTRACT

The values of cholinesterase in cattle considered in Venezuela as reference values generally belong to different populations. It is owed to variations such as race, age, sex and climatic and geographical conditions. Therefore, it is very important to establish values of reference of each population with some risk of exposure to cholinesterase inhibitors.

As a result of this fact, in this study reference values for plasmatic cholinesterase activities were determine in apparently healthy cattle from the South Zone of the Maracaibo Lake, Venezuela. Determination of blood cholinesterase activity in cattle is a valuable indicator of exposure to cholinesterase inhibitors. These results

will allow establishing periodic controls of the cattle of this region. Furthermore, these results could be used as a tool of diagnostic to indicate the extent of exposure and hence provide the basis for advice on measures to be taken.

PALABRAS CLAVE

Inhibición de la colinesterasa, Ganado vacuno, niveles de referencia, organofosforados.

AGRADECIMIENTO

Se agradece a la Comisión de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad de los Andes por el financiamiento del trabajo.

INTRODUCCIÓN

La producción agropecuaria, es una actividad en donde se utilizan una importante cantidad de sustancias químicas para el control de plagas, siendo una práctica generalizada en todo el mundo. En razón de ello, y debido a la liberalización del mercado, el uso de plaguicidas ha ido en aumento constante, fomentándose su uso de manera indiscriminada y multiplicándose su consumo por un factor de 32 entre 1950 y 1986, con un aumento muy grande en América Latina donde pasa de una tasa de 8,4 % anual durante los años 70 a una tasa del 36 % en los años 80, por encima de Asia y África (www.eurosur.org, 2004).

En Venezuela, la situación no ha sido diferente a la del resto del mundo, por cuanto, la agricultura y la ganadería son actividades de gran importancia, en la cual, la población rural encuentra oportunidades de producción y empleo. Por otra parte, la actividad agropecuaria es favorecida en algunas regiones, tanto por los tipos de suelos existentes indispensables para

el desarrollo de buenos pastizales, así como las condiciones climáticas. Dentro de las regiones con mayor potencial ganadero en Venezuela, se encuentra la Zona Sur del Lago, que pertenece a la jerarquía térmica cálida con temperaturas medias anuales superiores a 26.5 °C. Estas temperaturas favorecen el crecimiento del forraje durante todo el año, lo que conlleva a la necesidad de utilizar plaguicidas para controlar malezas y enfermedades. La mayoría de estos plaguicidas son creados, probados y fabricados en países desarrollados de clima templado, y, el uso de los mismos se incrementa en países en vías de desarrollo con clima tropical, por lo que un gran porcentaje de muertes por envenenamiento a causa de plaguicidas ocurre en estos países no desarrollados (Pernalet, 2000).

Es bien conocido por los ganaderos, que los pastizales más productivos son aquellos en donde además de otras condiciones existe un bajo porcentaje de malezas, por lo que el control de las mismas es tan importante como tener un buen pasto o buenos animales. Además, la invasión de malezas, las enfermedades de las plantas y los insectos provocan la pérdida de gran parte de la cosecha; lo que confirma que si no se usarán plaguicidas las pérdidas en producción serían de gran importancia (Fernández, 2000).

El principio básico de la acción de los plaguicidas reside en su toxicidad con respecto al menos de uno de los objetivos (tipo de insecto, maleza, etc.); pero como el grado de especificación de tales compuestos no es preciso, ellos son también tóxicos para otras especies o alteran su comportamiento. Estudios, han demostrado que más del 40% del plaguicida aplicado cae fuera del área objetivo, lo que sumado a la poca selectividad de los plaguicidas (non target specific), conllevan a un efecto destructivo de otros sistemas de producción, siendo uno de estos el rubro de la ganadería (www.eurosur.org, 2004).

Algunos de los compuestos químicos más utilizados para combatir plagas son los organofosforados y carbamatos. Ambos tipos de compuestos son considerados altamente tóxicos para los mamíferos, debido a que originan un síndrome colinérgico, por ser inhibidores de la enzima colinesterasa. Este efecto trae como consecuencia la posible intoxicación del ganado bovino en aquellas fincas de producción pecuaria y agropecuaria, lo que pudiera afectar la producción ganadera, sobre todo en donde la producción es de carácter importante, como ocurre en la Zona Sur del Lago de Maracaibo, Venezuela (Buck et al, 1981; Hardman et al, 1996).

El diagnóstico de los casos de intoxicación por sustancias inhibitoras de colinesterasa, se establece partiendo de los antecedentes de exposición, así como las manifestaciones clínicas que indiquen un síndrome

colinérgico (Buck et al, 1981).

Actualmente, uno de los análisis que permite el diagnóstico de intoxicación por organofosforados y carbamatos, tanto en humanos como en ganado vacuno, es la determinación de la actividad de la colinesterasa (Hardman et al, 1996; Wingfield, 1997; Marquez, et al, 1995). Sin embargo, los valores considerados como niveles de referencia de la colinesterasa en el ganado vacuno son de poblaciones distintas a las encontradas en el Sur del Lago de Maracaibo, esta distinción se debe a variaciones que incluyen aspectos tales como raza, edad, sexo, condiciones climáticas y geográficas, entre otras. Debido a esto, es recomendable establecer niveles de referencia propios de las poblaciones consideradas con riesgo de exposición a sustancias inhibitoras de la colinesterasa y obtener de esta manera los valores basales más cercanos a la población ganadera que habita en la región (Wingfield, 1997; Marquez, et al, 1995; Di Michele et al, 1990; Khan, 1988; Halbrook et al, 1992; Khan et al 2001).

Con base a lo anterior, se observa la necesidad de determinar los niveles de referencia de colinesterasa plasmática en la Zona Sur del Lago de Maracaibo, Venezuela, con la finalidad de establecer controles periódicos de los animales de esa región y de utilizarlos como herramienta de diagnóstico en caso de intoxicación por insecticidas organofosforados y carbamatos.

En la actualidad existen diferentes métodos para valorar la colinesterasa. Por otra parte, la mayoría de los sistemas analíticos que permiten la detección de la actividad de la enzima requieren de dos componentes: Un sistema para originar la reacción de reducción de un sustrato y la formación de un producto, y un sistema de detección para identificar los cambios originados. Hoy en día, se pueden clasificar en métodos clásicos que incluyen métodos biológicos, tritimétricos y manométricos; métodos electrométricos, cromatográficos, misceláneos de poco uso como los métodos radiométricos y fluorescentes, y por último los métodos espectroscópicos que utilizan el ácido 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoico y el ácido 6,6-dithiodinicotinico (Braselton et al, 2000; Michel, 1949; Ellman et al, 1961; Wiener, 2002; Harlin et al, 1990; Laine-Cessac et al, 1989; Jiménez et al, 2000).

Todos estos métodos, permiten la valoración de la enzima colinesterasa, sin embargo, en los laboratorios asistenciales por lo general se utilizan métodos comerciales, debido a que permiten una fácil disponibilidad, relativa economía, y tecnología común en los distintos centros de análisis. Tomando en cuenta estos aspectos, se propone determinar la enzima colinesterasa en ganado vacuno utilizando un método comercial, con la finalidad de establecer niveles de referencia de una población muestreada en la Zona Sur

del Lago de Maracaibo, Venezuela.

MATERIALES Y METODOS

Población a estudiar: Se trata de ganadería vacuna ubicada en la Zona Sur del Lago de Maracaibo, Venezuela y en las siguientes Fincas Productoras:

a. Finca La Esperanza, situada en el Municipio García de Hevia, Parroquia José Antonio Páez, Sector La Playa, con una población de ganado bovino de 180, de los cuales serán muestreados 55 animales.

b. Finca La Gloria situada en el Municipio Samuel Darío Maldonado, Parroquia San Isidro, Sector el Bojalcon con una población de 300 animales, de los cuales serán muestreados 78 animales.

Para obtener información de variables tales como raza, edad, sexo, peso, enfermedades padecidas en los animales; plaguicidas utilizados en las fincas productoras, fines de la producción en las fincas, entre otros, se aplicará un formato de recolección de datos al momento de coleccionar la muestra biológica.

Recolección de la muestra: La muestra biológica a coleccionar es sangre total, extraída por punción de la vena yugular, con aguja número 18 y coleccionada en tubos de ensayo con anticoagulante EDTA. Una vez en los tubos, serán refrigeradas en cava y transportadas al laboratorio. En el laboratorio, las muestras serán centrifugadas a 1500 x g x 10 min. con la finalidad de separar el plasma del paquete celular (Laine-Cessac et al, 1989; Jiménez et al, 2000).

Método para determinar la enzima colinesterasa: Se utilizará como método de análisis el método cinético a 405 nm de la casa comercial WIENER, previamente optimizado. Este método utiliza la butirilcolina como sustrato y como fuente de la enzima el plasma. Las lecturas se llevan a cabo en un espectrofotómetro CL 750 Spectrophotometro-Shimadzu (Ellman et al, 1961; Wiener, 2002; Harlin et al, 1990).

Metodología Estadística: Desde el punto de vista estadístico los animales muestreados se seleccionarán de manera aleatoria. Los resultados obtenidos serán procesados mediante el software estadístico SPSS y se analizarán según el siguiente procedimiento estadístico (SPSS, 2000; Waine, 2000; Montgomery, 1996; Reed et al, 1971):

a. Estadística descriptiva de la muestra estudiada: número de observaciones, media, y desviación típica.

b. Pruebas de significancia Kolmogorov-Smirnov con la finalidad de contrastar si la muestra se ajusta a la distribución normal.

c. Pruebas de Levene para determinar la

homogeneidad de varianzas de los niveles de colinesterasa de ambas fincas.

d. Análisis de varianza de una vía para determinar si existen diferencias significativas en los niveles promedio de colinesterasa en el ganado vacuno de ambas fincas.

e. El intervalo de referencia se determinará mediante el método del factor K.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez aplicado el formato de recolección de datos, se detectó que la muestra seleccionada para el estudio consistió en animales hembras, dedicadas a la producción de leche, entre 4 y 6 años de edad, con pesos promedios entre 380 y 450 kilogramos. De razas mestizo, entre Pardo-Holstein y Pardo-Cebú con su respectiva evaluación sanitaria periódica, seleccionadas y ubicadas como animales aparentemente sanos, que según el veterinario no presentaron enfermedad de importancia en los últimos seis meses previos al muestreo.

Por otra parte, las fincas además de utilizarse con fines de producción lechera, existe la presencia de equinos y también se utilizan con propósitos agrícolas, cultivándose naranjas, limones y cocos. Algunos de los plaguicidas reportados como de uso frecuente por los productores son: Amina 6 Libros (ácido 2,4-difenoxiacético 70%), Combo (picloran 24% + metsulfuran 60%), Gramoxone NF (paraquat 18,50 %) y garafos (malathion 99%).

Una vez obtenidos los resultados de la actividad de la colinesterasa en la muestra estudiada, se procedió a realizar los análisis estadísticos respectivos, cuyos resultados se representan en tablas, con la finalidad de determinar los niveles de referencia de la enzima.

La Tabla 1 y la Tabla 2, muestran la prueba de Kolmogorov-Sminov de la Finca La Gloria y Finca La Esperanza. Esta, es una prueba que permite contrastar la hipótesis nula de que los datos obtenidos se ajustan a la distribución normal. En ambos casos se obtiene una probabilidad de 0.200 que está por encima de la probabilidad del nivel de significancia (n.s.) establecido en 0.05. Este resultado permite demostrar que no se tiene evidencia suficiente para rechazar que los datos obtenidos para cada finca no se ajusten a una distribución normal.

Tabla 1. Pruebas de normalidad Kolmogorov-Sminov para la Finca La Gloria.

	Estadístico	gl	P*
Valores de la enzima Colinesterasa (U/l)	0.063	78	0.200

* P>0.05 se considera significativo

Tabla 2. Pruebas de normalidad Kolmogorov-Sminov para la Finca La Esperanza.

	Estadístico	gl	P*
Valores de la enzima Colinesterasa (U/l)	0.100	55	0.200

* P>0.05 se considera significativo

Una vez verificado que los datos de ambas muestras se ajustan a una distribución normal, se evalúa la estadística descriptiva de los datos obtenidos, los cuales se indican en la Tabla 3. En esta tabla, se observa que para la Finca La Gloria de los 78 animales muestreados, se obtiene como resultado una media de la enzima colinesterasa de 349.09 U/l, con una desviación típica de 54.45. En la finca La Esperanza de los 55 animales muestreados, se obtiene una media de 365.00 U/l y una desviación típica de 49.89, para un total de 133 animales.

Tabla 3. Estadística descriptiva de las muestras poblacionales estudiadas.

Finca	n	Media Colinesterasa (U/l)	Desviación Típica
La Gloria	78	349.09	54.45
La Esperanza	55	365.00	49.89
	Total 133		

Como se observa, el promedio encontrado para la Finca La Gloria (349.09 U/l) se encuentra incluido dentro del intervalo del promedio mas o menos la desviación típica de la Finca La Esperanza, es decir entre 315.11 y 414.89 U/l. Por otra parte, el promedio encontrado para la Finca La Esperanza (365.00 U/l) se encuentra incluido dentro del intervalo del promedio mas o menos la desviación típica de la Finca La Gloria, es decir entre 294.64 y 403.54 U/l. Debido a esto, por intuición podríamos decir que ambos promedios no son distintos, sin embargo para comprobarlo se lleva a cabo una prueba de diferencias de medias a través de un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de homogeneidad de las varianzas (Estadístico de Levene) cuyos resultados se muestran en la Tabla 4 y 5 respectivamente.

Tabla 4. Prueba de homogeneidad de varianzas para las dos fincas.

Estadístico de Levene	gl1	gl2	P*
0.839	1	131	0.361

* P>0.05 se considera significativo

Tabla 5. ANOVA Para la diferencia de las medias de la Finca la Esperanza y Finca La Gloria.

Fv	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P*
Colinesterasa	8168.728	1	8168.728	2.950	0.088
Error	362700.555	131	2768.707		
Total	370869.282	132			

* P>0.05 se considera significativo

En la Tabla 4, se observa una probabilidad de 0.361, la cual está por encima del nivel de significancia de 0.05, lo lleva a concluir que las varianzas no son diferentes. Además, en la Tabla 5 se observa una probabilidad de 0.088, indicando que no existen diferencias significativas entre las medias de ambas fincas, al estar la probabilidad por encima del nivel de significancia de 0.05.

Los resultados anteriores, indican que las muestras se pueden tratar como si fueran una sola. Sin embargo, esta unificación de todas las observaciones debe ser sometida a una prueba de normalidad. Por lo tanto, para evaluar la normalidad de las observaciones como una sola muestra representativa de una población, se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. El resultado de la prueba se muestra en la Tabla 6. En la misma, debido a una probabilidad de 0.200 se demuestra, que no hay evidencias suficientes para concluir que los valores de colinesterasa no se ajustan a una distribución normal.

Tabla 6. Pruebas de normalidad Kolmogorov-Sminov para las observaciones totales.

	Estadístico	gl	P*
Valores de la enzima Colinesterasa (U/l)	0.065	133	0.200

* P>0.05 se considera significativo

Una vez constatado, que las observaciones de ambas fincas pueden tratarse como una sola muestra y se distribuyen normalmente, se aplica el Método del Factor k para hallar el intervalo de referencia. Este método consiste en determinar un valor k, para una muestra de tamaño n, tal que una proporción P de observaciones poblacionales se encuentren entre un límite inferior L y un límite superior U, con $L = \bar{X} - kS$ y $U = \bar{X} + kS$, donde: \bar{X} es el nivel promedio de colinesterasa de los 133 animales que corresponde 355,67; S, es la desviación estándar, que corresponde a 53,01 (Tabla 7). Se considera un p=0,05 y 1- α =0,95. Entonces de acuerdo a la distribución normal estándar, $k = \pm 1,96$.

Tabla 7. Estadística descriptiva de la muestra poblacional total.

Finca	n	Media Colinesterasa (U/l)	Desviación Típica
La Gloria	133	355.67	53.01

Así, el intervalo de referencia está dado por: $355,67 \pm 1,96 * 53,01$, que corresponde a: $L = 251,77$ y $U = 459,57$. Por lo tanto, se tiene una confianza del 95 % de que al menos el 95 % de los niveles de colinesterasa del ganado vacuno de en condiciones aparentemente normales de salud, para la Zona Sur del Lago de Maracaibo, se encuentren entre 251,77 y 459,57 respectivamente.

Una vez obtenidos los niveles de referencia, se procedió al análisis de muestras provenientes de la región estudiada para determinar sus niveles de colinesterasa y compararlos con los niveles de referencias encontrados. Las muestras, provienen de cuatro animales aparentemente sanos y una muestra de un animal intoxicado, luego de haberse bañado según reporte del veterinario con garafos (plaguicida organofosforado), los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Valores de colinesterasa obtenidos de animales ubicados en la Zona Sur del Lago de Maracaibo.

Muestra de animales aparentemente sanos	Colinesterasa (U/l)
Animal 1	378.49
Animal 2	431.41
Animal 3	340.65
Animal 4	401.20
Muestra de animal intoxicado	158.97

Como se puede apreciar en la Tabla 8, los valores de colinesterasa en los animales sanos se encuentran ubicados en el intervalo de referencia, y, el valor del animal intoxicado se encuentra ubicado por debajo del intervalo de referencia, lo que indicaría una disminución de la actividad de la enzima, como consecuencia de la exposición a un plaguicida inhibidor de la colinesterasa.

CONCLUSIONES

Para finalizar, en este trabajo, se concluye que el intervalo de referencia de la enzima colinesterasa obtenido de la muestra estudiada, puede ser útil para el diagnóstico de la intoxicación por plaguicidas inhibidores de la colinesterasa. Sin embargo, en virtud de que la población estudiada se limitó a dos fincas, se recomienda ampliar este estudio a otras fincas ubicadas

en otras zonas geográficas de la Zona Sur del Lago de Maracaibo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Braselton, W., Johnson, J., Carlson, M., Schneider, N. 2000. **Gas chromatography/mass spectrometry identification and quantification of isazophos in a famphur pour-on and in bovine tissues after a toxic exposure.** J Vet Diagn Invest. 12(1):15-20.
2. Buck, W., Osweiler, G. 1981. **Toxicología Veterinaria. Clínica y Diagnóstica.** Editorial Acribia. España.
3. Di Michele de la Rosa, S., Otaiza, E., Cumare, V.1990. **Valores hematológicos y de la química sanguínea en los bovinos de los Estados Carabobo y Guárico.** Agronomía Tropical. 27(3): 273-292.
4. Ellman, G. , Copurtney, D. , Andrés , V. , Featherstone, R. 1961. **A new and rapid colorimetric determination of acetyl cholinesterase activity.** *Biochemical Pharmacology.* 7: 88-95.
5. Fernández, A. 2000. **Control Selectivo de Malezas Gramíneas en Potrerros.** Taller sobre pastos y forrajes. Enfermedades metabólicas del ganado vacuno.
6. Halbrook, R., Shugart, L., Watson, A., Munro, N., Linnabary, D. 1992. **Characterizing biological variability in livestock blood cholinesterase activity for biomonitoring organophosphate nerve agent exposure.** JAVMA. 201 (5): 714-725.
7. Hardman, J., Limbird, L., Molinoff, P., Raymond, R., Goodman, A. 1996. **Las bases farmacológicas de la terapéutica.** Editorial Mc Graw-Hil Interamericano. Novena Edición. Vol. I. p. 505-506.
8. Harlin, K., Ross, P. 1990. **Enzimatic-Spectrophotometric method for determination of cholinesterase activity in whol blood: collaborative study.** J Assoc off Anal Chem. 73(4): 616-619.
9. http://www.eurosur.org/medio_ambiente/bif62.htm (consulta enero de 2004).
10. Jimenez, M., Martínez-Monge, V. 2000. **Validación de la determinación de la colinesterasa plasmática humana a 340 nm.** Biomedic. 11: 91-98.
11. Khan, A., Coppock, R., Schuler, M., Lillie, L. 1988. **In vitro and in vivo effects of dichlorvos on blood cholinesterasa activities of cattle.** American Journal of Veterinary Research. 49: 1184-1187.
12. Khan, O. 2001. **Organophosphate poisoning in a group of replacement heifers and dry cows.** Can Vet J. 42(7): 561-563.
13. Laine-Cessac, P., Turcant, A., Allainp, P. 1989. **Determination of cholinesterase activity in plasma and erythrocytes by flow injection analysis, and application to identify subjects sensitive to succinylcholine.** Clinical Chemistry. 35(1): 77-80.

14. Márquez y Silvestre. 1995. **Farmacología Veterinaria.** Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracay.

15. Michel, H. 1949. **An electrometic method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity.** J. Lab. Clin. Med. 34: 1564-1568.

16. Montgomery, D. C.; Runger, G C. 1996. **Probabilidad y Estadística.** Editorial McGraw-Hill. P. 16-28, 323-445.

17. Pernalet, S. 2000. **Potencialidades y Limitaciones de los suelos del sur del lago para la producción de pastos.** Taller sobre pastos y forrajes. Enfermedades metabólicas del ganado vacuno.

18. Reed, A., Henry, R., Mason, W. 1971. **Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range.** Clinical Chemistry. 17(4): 275-284.

19. **SPSS for Windows.** Versión 11.1

20. Waine, D. 2002. **Bioestadística. Base para el análisis de ciencias de la salud.** Editorial LIMUSA WILEY. 4ta. Edición .España.

21. WIENER LAB 2002. **Colinesterasa. Método Cinético a 405 nm.** Rosario, Argentina.

22. Wingfield, W. 1997. **Secretos de la Medicina de Urgencia en Veterinaria.** Editorial McGraw-Hill Interamericana.