

COMUNICACIONES PREVIAS

UN NUEVO METODO DE DETERMINACION
DE LA COLINESTERASA SERICA

J. L. LUNA PÉREZ

Profesor Ayudante de Clases Prácticas
Clínica Quirúrgica Universitaria.
Facultad de Medicina de Madrid.
Profesor: VARA LÓPEZ.

La determinación de la colinesterasa del suero sanguíneo es una prueba que cada día va adquiriendo más importancia en la valoración de la función hepática.

Nosotros, con motivo de nuestra tesis doctoral, hemos tenido necesidad de hacer determinaciones de dicho enzima. Y ante la imposibilidad de utilizar un método ideal, por su exactitud, como es el manométrico (a causa de la dificultad de montaje de dicha técnica), nos decidimos por el método titrimétrico de MORAND y LABORIT (ARELLANO y VILLASANTE, *Rev. Clín. Esp.*, XIV, 31 julio 1953). Método con el que hicimos numerosas determinaciones y al que encontramos el defecto de que es muy subjetivo y, por tanto, sujeto a fuerte posibilidad de error el momento en el que el cambio de color de amarillo limón a amarillo sucio indica el viraje de la reacción. Este método se basa en la titulación, con sosa, del ácido acético liberado al hacer actuar el suero problema sobre un substratum de acetilcolina.

Más tarde conocimos otro método basado en el mismo principio, que nos pareció de una más aceptable exactitud. Nos referimos al método de CLAUDIO CERVINI (OLGA ZAVALET, *Rev. Laborat.*, núm. 118, 1955), en el que el ácido acético liberado por un substrato de acetilcolina cambia el color violeta (alcalino) a amarillo (ácido), de una serie de tubos, en los que se coloca dicho substrato, el indicador conveniente y el suero problema a distintas concentraciones. Este método mide el *tiempo* que tarda en tener lugar la reacción (velocidad de hidrólisis) y que es directamente proporcional a la cantidad de colinesterasa contenida en el problema. Tiene también el inconveniente de que es difícil apreciar en qué tubo ha tenido lugar el cambio completo de color y en el cual no ha habido más que un cambio parcial, estando esta apreciación sujeta a un factor personal susceptible, por tanto, también, de fuerte error.

El procedimiento que presentamos, y que creamos original, tiene en parte un fundamento similar a los anteriores; es decir, basado en el cambio de color (de violeta a amarillo), que tiene lugar al desprenderse ácido acético (acidificación del medio) de una solución de acetilcolina,

sobre la que se hace actuar el suero problema más o menos rico en colinesterasa. Pero nosotros, utilizando diluciones conocidas de *prostigmine* tratamos de *inactivar* la colinesterasa contenida en el suero, de modo que al no actuar ésta sobre el substrato de acetilcolina y, por tanto, no desprenderse ácido acético, no tenga lugar la acidificación del medio y no se efectúe el cambio de color del mismo.

Lógicamente, cuanto más rico en colinesterasa sea un suero determinado, más concentrada (más rica en *prostigmine*) ha de ser la solución empleada para inactivarlo; postulado que también es cierto en el caso inverso. Luego de esto se deduce que se puede establecer un paralelismo o proporcionalidad directa entre la riqueza en colinesterasa de un suero y la concentración en *prostigmine* de la disolución capaz de inhibir el poder enzimático del mismo. Y que, por tanto, conociendo la concentración de la solución de *prostigmine*, que ha sido capaz de inhibir el fenómeno, tenemos una medida bastante exacta del contenido de colinesterasa del suero inhibido.

Esta medida hemos podido comprobar que, dada la gran sensibilidad del sistema, es susceptible de llevarse a grados extremos de exactitud, pues todo se reduce a emplear diluciones progresivas que, como se comprende, pueden hacerse tan grandes o pequeñas como se deseé.

A continuación exponemos la técnica empleada y el modo de interpretar los resultados obtenidos.

TÉCNICA.

Comprende las siguientes partes:

1. *Extracción de sangre.*—Ha de hacerse en ayunas y en cantidad aproximada a unos 6 centímetros cúbicos. Ha de cuidarse de manera especial el que no haya hemólisis, ya que el suero no debe contener la colinesterasa de los hematíes. Una vez extraída la sangre se centrifuga a 2.000 revoluciones durante diez minutos. Luego se separa el suero, se comprueba si está limpio y transparente y se procede a

II. *Selección de los materiales necesarios.*—Han de emplearse siempre substancias de la máxima pureza y garantía:

1. Solución salina fisiológica.
2. Solución de sosa N/100.
3. Solución al 0,04 por 100 del reactivo indicador, rojo de cresol.
4. Solución de cloruro de acetilcolina *Roche*.

(Disolvemos el contenido de una ampolla en 8 centímetros cúbicos de solución salina fisiológica.)

5. Solución madre de prostigmine *Roche*. (Disolvemos una ampolla de 1 c. c., que contiene 0,50 miligramos de substancia, en 99 c. c. de solución salina fisiológica.)

III. *Modus operandi*.

1. En una gradilla se colocan, convenientemente numerados del cero al diez, once tubos de ensayo, de los cuales el cero va a servir de testigo, es decir, *no va a llevar solución de prostigmine*.

2. A cada uno de los tubos se le añade (precisamente en el orden que se indica para evitar reacciones prematuras):

- a) Sol. salina fisiológica, 1 c. c.
- b) Sol. indicadora rojo cresol, 1 gota.
- c) Sol. sosa N/100, 1 c. c.
- d) Sol. de cloruro acetilcolina, 0,50 c. c.
- e) Sol. de prostigmine, 1 c. c. a las siguientes diluciones:

Tubo	Disolución prostigmine
Número 0	No lleva
" 1	1/100
" 2	1/200
" 3	1/300
" 4	1/400
" 5	1/500
" 6	1/600
" 7	1/700
" 8	1/800
" 9	1/900
" 10	1/1.000

- f) Suero humano a investigar, 0,25 c. c.

Los tubos ofrecen todos inmediatamente un color violeta uniforme.

3. Incubación de los tubos al bañomaría a una temperatura constante de 35 a 37 grados.

4. Periódicamente (de tres a cinco minutos, por ejemplo), observación del tubo testigo, marcado con el número cero para ver si vira de color. (Fenómeno que, según nuestra experiencia, suele comenzar a los cinco o diez minutos, para estar acabado a los diez o quince.)

5. Cuando el tubo testigo tenga un color francamente amarillo (amarillo canario) se da por terminada la incubación, se saca la gradilla y se procede a la lectura.

6. Lectura.

Se observará que, dependiendo del contenido en colinesterasa, hay tubos que no han variado de color (aquellos en los que la concentración de prostigmine es mayor); otros, que tienen un color sucio, de viraje intermedio, y otros, de color amarillo, comparable al del tubo testigo, en los que la reacción no ha sido inhibida, ni parcial, ni totalmente.

Se considera como *inhibida* la reacción en todos aquellos tubos que no exhiben un franco color amarillo, y entonces se puede decir que

en el suero problema hay un contenido en colinesterasa expresado en *valor prostigmine* del 1/x, siendo x la dilución del último tubo que no ha virado; o sea, que hay una cantidad equivalente al 1/x de prostigmine.

Fuede darse el caso de que con las diluciones que hemos empleado (1/100 a 1/1.000) viren todos los tubos, lo cual quiere decir que en el suero en cuestión hay una cantidad excesiva de colinesterasa. Entonces se pueden emplear concentraciones más fuertes para hacer la determinación (del 1/10 al 1/100), procediéndose como en el caso anterior.

También puede ocurrir que empleando las diluciones comprendidas entre el 1/100 y el 1/1.000 no vire ningún tubo, es decir, que haya una cantidad muy escasa de colinesterasa. Entonces se recurrirá a emplear concentraciones más débiles de prostigmine (del 1/1.000 al 1/10.000), actuándose por lo demás como en el caso anterior.

De todos modos, y en los casos de nuestra experiencia, aún demasiado escasa para poder sentar conclusiones, las diluciones de prostigmine capaces de inhibir la reacción en sujetos normales eran las comprendidas entre el 1/100 y el 1/1.000.

RESULTADOS.

Repetimos que nuestra experiencia con este método es aún demasiado reciente para poder hablar de resultados definitivos.

Hasta ahora en los sujetos normales, estudiados en número de veinte, hemos observado que la inhibición más frecuente es en el tubo número 5, o sea del 1/500. Es decir, que a partir del tubo número 6 se observa un franco viraje al amarillo.

Muy recientemente hemos tenido ocasión de hacer esta determinación en un sujeto afecto de *niastenia grave*. (S. J. A. Sala de hombres del profesor GILSANZ, cama 14), observando que con diluciones comprendidas entre el 1/100 y el 1/1.000 no viraba ningún tubo; es decir, que aquel suero era extraordinariamente rico en colinesterasa. Desgraciadamente no hemos podido repetir la prueba utilizando diluciones más concentradas.

Nos proponemos hacer un estudio de las variaciones de esta prueba en grupos de enfermos hepáticos y de otras afecciones.

RESUMEN.

Se presenta un nuevo método de determinación de la colinesterasa sérica utilizando para su valoración el poder inhibidor que la prostigmine tiene sobre dicho enzima.

Se hace una descripción detallada de la técnica y manipulación de dicho procedimiento.

La valoración de los resultados es forzosamente escasa dado el reciente empleo que venimos haciendo de este procedimiento.

SUMMARY

A new method is reported for the estimation of serum cholinesterase. The assay is based on the inhibitory action of prostigmin on that enzyme.

A detailed description of the technique and course to be followed is given.

The fact that the procedure has been in use for a short time necessarily limits the evaluation of results.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine neue Methode zur Bestimmung der Cholinesterase im Serum beschrieben, welche sich, zur Bewertung, der hemmenden Wirkung des Prostigmins auf das erwähnte Enzym bedient.

Es wird eine genaue Beschreibung der Technik und der Handhabung des genannten Verfahrens angegeben.

Angesichts der Tatsache, dass wir erst seit kurzer Zeit mit diesem Verfahren arbeiten, ist die Bewertung der Ergebnisse natürlich beschränkt.

RÉSUMÉ

On présente une nouvelle méthode de détermination de la cholinestérase sérique, utilisant pour sa valorisation le pouvoir inhibiteur que la prostigmine a sur cet enzyme.

On fait une description détaillée de la technique et manipulation de ce procédé. La valorisation des résultats est forcément rare étant donné qu'il n'y a pas longtemps que nous réalisons ce procédé.

NOTAS CLINICAS

ULCERAS PEPTICAS EN RELACION CON TRATAMIENTOS POR LA FENILBUTAZONA (*)

T. GUIASOLA PÉREZ.

Gijón.

Como es bien sabido, se hace actualmente un gran empleo de los preparados de la fenilbutazona para el tratamiento de variados procesos, de un modo especial de los encuadrados en el amplio campo de las llamadas enfermedades reumáticas, debido, sobre todo, a sus excelentes resultados en la mayoría de los casos. Es también conocido de todos que su empleo, sin embargo, puede dar lugar a accidentes tóxicos, algunos incluso de suma gravedad; pero dichos accidentes, ya sea porque se cree poco en ellos o porque, en realidad, los verdaderamente graves no suelen ser muy frecuentes, son a veces poco valorados en la práctica. En la presente comunicación, y con motivo de la observación de cinco casos de *ulcus péptico* en relación evidente con la droga que fueron vistos por nosotros, queremos dar una nueva voz de alarma contra su empleo alegre e indiscriminado, voz que ya viene siendo dada desde hace varios años por diver-

sos autores, especialmente anglosajones y franceses.

A modo de recordatorio diremos que la droga en cuestión es un derivado de la antipirina, de la que también se deriva el pirazol. Empleada primeramente su sal sódica como disolvente de la antipirina o piramidón, pronto se vió que sus beneficiosos efectos terapéuticos eran debidos más al disolvente, esto es, a la fenilbutazona, que al mismo piramidón, y de ahí que en la actualidad, si bien aún siguen preparándose medicamentos con la citada asociación, predominen los fármacos con dicha sustancia como único o primordial agente medicamentoso.

Los principales efectos de la droga sobre el organismo son antiflogísticos, antitérmicos y analgésicos. La primera parece ser su propiedad más importante, debiéndose a su poder de disminuir la permeabilidad capilar. El mecanismo de acción de la fenilbutazona no es aún bien conocido, si bien HARWETH y HEILMEYER lo creen debido a una acción directa sobre el metabolismo celular. La similitud de efectos entre ella y la cortisona y el ACTH (retención de agua, sodio y cloro, activación de *ulcus*, indicaciones terapéuticas parecidas, etc.), hizo que se pensase en un principio en un mecanismo de acción similar entre los tres productos citados. No obstante, desde que se comprobó que la fenilbutazona no influye sobre la eliminación del potasio, no produce eosinopenia y no aumenta la elimi-

(*) Comunicación presentada en la Academia Médico-Quirúrgica de Gijón, en la sesión del día 11 de mayo de 1955.