

## Valoración de la actividad colinesterásica plasmática en la vigilancia epidemiológica de población expuesta a pesticidas

Por Paviotti, Fabián Daniel<sup>1\*</sup>, Guglielmo, Ricardo<sup>2</sup>

### RESUMEN

El uso masivo de pesticidas ha propiciado la contaminación permanente del ambiente con efectos nocivos sobre la salud humana y el ecosistema regional. Entre los pesticidas empleados se encuentran herbicidas, insecticidas, fungicidas y nematocidas. Muchos de ellos son compuestos órgano-fosforados y carbamatos que presentan actividad inhibitoria de la actividad de colinesterasas (plasmática, sináptica y eritrocitaria). Dentro de los marcadores de exposición, los productos de biotransformación en sangre son difíciles de determinar debido a que se hidrolizan rápidamente y la medición de productos en orina tiene limitaciones y su análisis aislado no evalúa la magnitud de la exposición. Por ello, la actividad colinesterásica plasmática se ha constituido en la principal prueba de laboratorio para la vigilancia de la población expuesta.

En el presente trabajo se compararon los valores basales de actividad de colinesterasa plasmática en población urbana y rural de la localidad de Cerrito (Entre Ríos). Los resultados arrojaron diferencias significativas, con valores de actividad colinesterásica plasmática en la población rural menores a los registrados en la población urbana tanto de varones como de mujeres.

Debido a la marcada individualidad biológica de la enzima colinesterasa, se determinaron los porcentajes de inhibición que resultaron significativos, compatibles con la exposición a pesticidas inhibidores de colinesterasas (Delta Check). Se calcularon intervalos de referencia propios para la enzima con el fin de poder observar una adecuada vigilancia epidemiológica.

**PALABRAS CLAVE:** pesticidas\* inhibición\* actividad colinesterásica\* Delta Check\* intervalos de referencia.

### Abstract

*The massive use of pesticides has promoted the permanent pollution of the environment with noxious effects not only on human health but also on the whole regional ecosystem. Among the numerous pesticides in use we find herbicides, insecticides, fungicides and nematocides. Most of which are organ-phosphorous compounds and carbonates that present an inhibiting activity of the cholinesterase (Plasma, synaptic and eritrocitaria). Within the exposition markers, the products of biodegradation in blood are difficult to determine due to their quick hydrolysis and the measurement of products in urine has limitations and an isolated analysis does not evaluate the magnitude of the exposition. That is why an effect indicator like the cholinesterase activity has become the main laboratory proof for the surveillance of the exposed population.*

1 Bioquímico. Sarmiento 128, CP 3122, Cerrito, Entre Ríos, Argentina. [fabianpaviotti@gmail.com](mailto:fabianpaviotti@gmail.com). Alumno de la Carrera de Especialización en Química Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC. Córdoba, Argentina.

2 Bioquímico Especialista. Laboratorio Central Sanatorio Allende. [rguglielmo@hotmail.com](mailto:rguglielmo@hotmail.com)

Tutor de la Carrera de Especialización en Química Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC. Córdoba, Argentina.

*In this work, baseline values of plasmatic activity were compared in an urban and rural population of Cerrito, Entre Ríos. The result of the determinations gave significant differences with values of plasmatic cholinesterase activity in rural areas lower than the registered in an urban population of men and women.*

*Owing to the marked individuality of the cholinesterase enzyme the percentage of inhibition were determined as significant and very significant compatible with the exposition to pesticides inhibiting the cholinesterase (Delta Check).*

*Beside, intervals of reference were calculated in particular for the enzyme so as to be able to observe an adequate epidemiologic surveillance.*

**Key words:** *pesticides\* inhibition\*cholinesterase activity\*delta check\* intervals of reference.*

## INTRODUCCION

El gran desarrollo agrícola en nuestro país trajo consigo la utilización de productos agroquímicos que han posibilitado aumentar notablemente la producción agrícola, así como también controlar o erradicar vectores de enfermedades. No obstante el uso masivo de estos compuestos ha propiciado la contaminación permanente del ambiente con efectos nocivos no solo sobre la salud humana sino también en todo el ecosistema regional. (1)

Entre los numerosos pesticidas utilizados se encuentran herbicidas, insecticidas, fungicidas y nematocidas. Muchos de ellos son compuestos órgano-fosforados y carbamatos que presentan una actividad inhibitoria de la actividad de colinesterasas (plasmática, sináptica y eritrocitaria). (2)

El indicador biológico de exposición humana comprende cualquier sustancia o subproducto de biotransformación, así como cualquier alteración bioquímica precoz, cuya determinación en los fluidos biológicos, tejidos o aire exhalado, evalúe la intensidad de la exposición al agente químico contaminante ambiental u ocupacional. Para el caso de los pesticidas inhibidores de colinesterasa (PICs) los productos de biotransformación en sangre son difíciles de determinar debido a que se hidrolizan rápidamente. La medición de productos en orina tiene limitaciones y su análisis aislado no evalúa la magnitud de la exposición. Dentro de los indicadores de "efecto" hasta ahora los más importantes corresponden a la actividad colinesterásica y a la esterasa neurotóxica.

Las colinesterasas de vertebrados se clasifican dependiendo de sus características bioquímicas y fisiológicas en dos grupos principales, que son codificadas por dos genes distintos: (a) la colinesterasa verdadera o acetilcolinesterasa (AChE, acetilcolina hidrolasa, acetilcolina acetilhidrolasa), que hidroliza a la acetilcolina mucho más rápido que a otros ésteres de colina y es mucho menos activa sobre butirilcolina y (b) la colinesterasa plasmática o sérica (ChE), pseudocolinesterasa o butirilcolinesterasa (BChE, acilcolina acilhidrolasa), que hidroliza a la butirilcolina, pero también a la acetilcolina. (3,4,5).

La AChE es una enzima esencial con un alto grado de especificidad en cuanto al sustrato. Está presente 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 post ganglionar y las terminaciones motoras de los músculos, así como en las sinapsis postganglionar parasimpáticas y los eritrocitos. Esta enzima tiene la función fisiológica de desdoblar rápidamente la acetilcolina neurotransmisora en colina y ácido acético y, de esta manera inactivarla. En tanto, las ChE plasmáticas forman un grupo de isoenzimas, son menos específicas y están presentes en todo el organismo. Las ChE plasmáticas difieren en la especificidad por los sustratos, pH óptimo, movilidad electroforética y cinética. Una de sus funciones farmacológicas es desdoblar ciertos fármacos como la procaína, la

succinilcolina y el ácido acetilsalicílico, así como participar en la detoxificación de fosfatos y carbamatos. (6)

La medición de la actividad colinesterásica se ha constituido en la principal prueba de laboratorio para la vigilancia de la población expuesta.

Tanto la ChE plasmática como la colinesterasa intraeritrocitaria (AChE) son enzimas caracterizadas por sus grandes fluctuaciones interindividuales, reflejadas en los amplios rangos de referencia habitualmente aceptados.(7)

Hay dos situaciones que alteran los valores de la ChE plasmática. Una de ellas es de origen genético y la otra es por exposición a sustancias tóxicas o medicamentosas. En este último caso, la actividad de la enzima se ve inhibida, ya sea por exposición a tóxicos ambientales o por la administración de alguna medicación que disminuye o inhibe la actividad de la colinesterasa. (8,9,5,7)

Desde el punto de vista toxicológico, como estas enzimas se alteran por múltiples causas, es de gran interés clínico y epidemiológico contar con intervalos de referencia específicos para distintos tipos de población, debido a los escasos datos en la bibliografía. (2)

Es por ello, que es necesario una correcta interpretación clínica y bioquímica de los resultados que aportan las determinaciones de colinesterasas. Fundamentalmente en los casos de intoxicaciones agudas por compuestos organofosforados, donde por lo general no se dispone de valores previos del paciente.

Después de la reacción con los inhibidores reversibles (carbamatos), la actividad inicial de las colinesterasas se recupera en unas pocas horas. Sin embargo con bloqueadores irreversibles (alquilfosfatos) la actividad esterásica se recupera fundamentalmente después de producirse una nueva síntesis de las enzimas (en un período de varias semanas). (2)

La determinación de la actividad de ChE plasmática es útil para la detección temprana de los efectos agudos de la

intoxicación por compuestos organofosforados, mientras que la determinación de la actividad de AChE es útil para evaluar exposición crónica o pasada. (7)

Conocer la población expuesta a los plaguicidas posibilita orientar la prevención y fomentar medidas de precaución en los grupos de mayor riesgo. (2)

Contar con intervalos de referencia propios de poblaciones urbanas y rurales posibilitará establecer mecanismos de vigilancia epidemiológica y establecer un monitoreo continuo de individuos expuestos en mayor o menor medida en forma continua a la acción de pesticidas, permitiendo de esta manera junto con valores históricos del paciente establecer no solo límites biológicos de tolerancia sino también la variación (Delta Chek) que el metabolito puede sufrir; para así poder predecir cuadros que cursan con cambios normales de esta enzima que pueden corresponderse a casos de intoxicación con pesticidas. (10,2,8,9). En este contexto, el objetivo del presente trabajo estuvo dirigido a (1) realizar la verificación del sistema analítico para la determinación de actividad de colinesterasa plasmática; (2) comparar los valores basales de colinesterasa en población urbana y rural de la localidad de Cerrito, provincia de Entre Ríos; (3) Determinar los intervalos de referencia para actividad de ChE plasmática en una población expuesta a la acción de pesticidas; (4) Calcular las variaciones intraindividuales en los valores de actividad de la colinesterasa plasmática (delta check).

## ANALISIS METODOLOGICO

En general, los reactivos comerciales para la determinación de analitos no ofrecen detalles sobre los sistemas analíticos utilizados para la medición de los mismos. Tampoco informan las características de la población elegida para la determinación de los intervalos de referencia.

Estas situaciones ponen de manifiesto la necesidad de establecer intervalos de

referencia propios, los cuales también son sugeridos por los fabricantes de reactivos.

La guía C28-A2 en su cap. 8 propone cómo establecer de intervalos de referencia. (11)

Las personas seleccionadas deben ser representativas de la población sugerida (en este caso rural y urbana) y deben además cumplir con los criterios de inclusión sugeridos por la guía y definidos en el estudio en particular.

Para establecer "intervalos de referencia propios" se evaluaron el sistema analítico utilizado y las características biológicas de las poblaciones estudiadas.

La guía establece los diferentes pasos para la determinación final de intervalos de referencia, procedimiento que se respetó en el presente trabajo.

## MATERIALES Y METODOS

### 1- Verificación del sistema analítico para la determinación de actividad de Colinesterasa plasmática.

Se siguieron los pasos establecidos por la Guía EP 15A2 para el cálculo de Imprecisión y Veracidad. (12).

Se utilizaron calibradores Cfás, Preci control ClinChem 1 y Preci control ClinChem 2 trazables de la marca Roche.

Se utilizaron reactivos para la determinación de ChE marca Biosystem Se utilizó para el procesamiento un analizador automático Mindray BS 120.

### 2- Diseño de la muestra.

#### 2a- Criterios de inclusión de individuos.

Se siguieron los criterios establecidos por la guía C28-A2 en su sección 5. -Participaron sujetos de la localidad de Cerrito, zona urbana y rural, que cumplieron con los criterios establecidos específicamente conforme al cuestionario de inclusión propuesto para la selección.

Se obtuvo de cada sujeto el consentimiento informado escrito donde figura claramente la información de su participación en el presente estudio.

Se clasificó la muestra por sexo (hombre o mujer) y procedencia geográfica (urbana o

rural) y situaciones fisiológicas (embarazadas). Posteriormente se analizó la conveniencia de particionar las muestras.

#### 2b- Tipo de selección y tiempo

Se realizó una selección directa (a priori): los individuos fueron seleccionados de una población utilizando los criterios de selección acordados al mismo tiempo que se tomaron las muestras de sangre.

La selección, recolección y procesamiento de las muestras se realizaron en el transcurso del año 2014 y 2015.

#### 2c- Determinación de Valores basales e Intervalos de Referencia propios de actividad de colinesterasa plasmática.

Se aplicó un diseño similar tanto para la determinación de valores basales de actividad de ChE plasmática como para el establecimiento de Intervalos de referencia, siguiendo los pasos establecidos en la guía C28-A2.

#### 3- Método de determinación de actividad de colinesterasa plasmática e instrumentos.

La determinación se fundamentó en el método de la butirilcolina, siguiendo las especificaciones del fabricante (Biosystem). Brevemente, la ChE plasmática presente en la muestra de suero del individuo reacciona con el sustrato presente en el reactivo, que en este caso corresponde a butirilcolina, que es hidrolizada a tiocolina. Esta tiocolina reduce otro reactivo incluido en la determinación, el hexacianoferrato III en hexacianoferrato II. Este proceso es monitorizado mediante espectrofotometría a 400 nm y 37 °C. Esta reacción presenta ventajas como su automatización, ser independiente del operador y de las variables fisiológicas del paciente. Los resultados de la actividad de ChE fueron expresados en U/L (Unidades por Litro).

#### 4- Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico Med Calc.

**RESULTADOS**

Se procedió a la Verificación de Imprecisión y Cálculo de Veracidad (CV) del método:

En lo que se refiere a imprecisión se obtuvo para:

Nivel 1 CV 0,7 % (vs) CV1% del fabricante  
 Nivel 2 CV 0,6 % (vs) CV 0,6 % del fabricante (13)

En lo que se refiere a veracidad se logró:  
 Nivel 1 BIAS 3,5 % (el fabricante no aportaba datos)

Nivel 2 BIAS 4,4% (el fabricante no aportaba datos)

(Se encuentran las tablas de valores a disposición).

Se realizó el muestreo conforme a lo establecido en el diseño lográndose un total de 191 muestras clasificadas de la siguiente manera:

- Hombres procedentes zona urbana: 70;
- Mujeres procedentes zona urbana: 96;
- Hombres procedentes zona rural: 12;
- Mujeres procedentes zona rural: 11;
- Embarazadas: 13.

Para la comparación de valores se confeccionaron tablas clasificadas en:

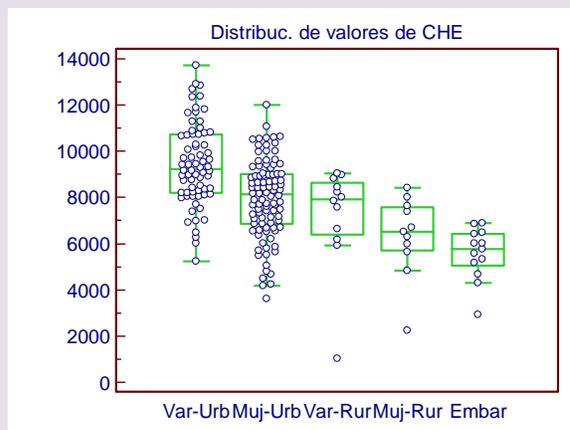
- Valores de ChE Mujeres zona urbana,
- Valores de ChE Hombres zona urbana,
- Valores de ChE Mujeres zona rural,
- Valores de ChE Hombres zona rural y
- Valores de ChE Mujeres embarazadas.

Analizados con programa estadístico Med Calc, los diferentes grupos arrojaron los siguientes datos como se observa en la Tabla1 y Figura 1.

Variab le	n	Media	D.E.	Mín	Máx
<b>Hombr . Z.Urba n</b>	<b>70</b>	<b>9431.30</b>	<b>1773.03</b>	<b>5250</b>	<b>13721</b>
<b>Hombr . Z. Rural</b>	<b>12</b>	<b>7229.08</b>	<b>2222.51</b>	<b>1017</b>	<b>9055</b>

<b>Mujer Z. Urbana</b>	<b>96</b>	<b>7943.92</b>	<b>1699.21</b>	<b>3629</b>	<b>12007</b>
<b>Mujer Z. Rural</b>	<b>11</b>	<b>6336.00</b>	<b>1728.30</b>	<b>2244</b>	<b>8424</b>
<b>Embar.</b>	<b>13</b>	<b>5572.15</b>	<b>1117.87</b>	<b>2928</b>	<b>6884</b>

**Tabla 1. Resumen estadístico de niveles de actividad de ChE plasmática (U/L) en poblaciones urbana y rural de hombres y mujeres y actividad de ChE plasmática en embarazadas: n, media, desviación estándar, valores mínimos y máximos.**



**Fig. 1. Valores de actividad de CHE plasmática en hombres y mujeres de población urbana y rural y embarazadas.**

Realización de test t para muestras independientes.

Comparación de valores de actividad de ChE plasmática (U/L) entre:

A- Hombres zona urbana y Hombres zona rural. P= 0,0003

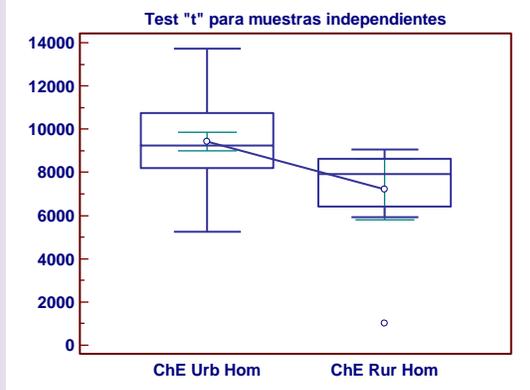
B- Mujeres zona urbana y Mujeres zona rural. P=0,0037

C- Hombres y Mujeres zona urbana. P< 0,0001

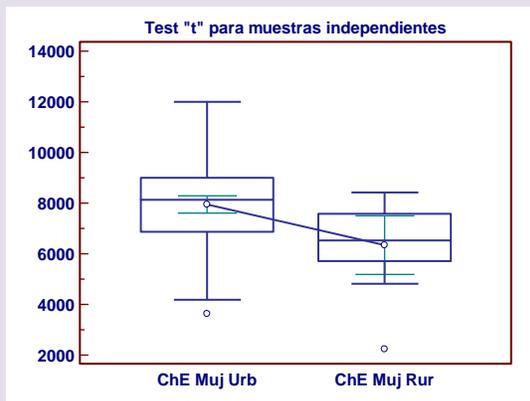
D- Hombres y Mujeres zona rural. P= 0,294

E- Mujeres zona urbana y embarazadas. P< 0,0001

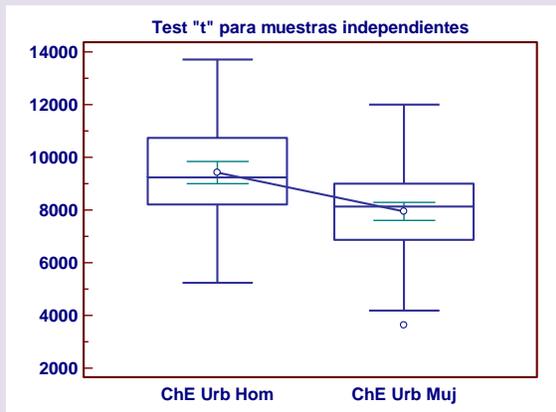
En las Figuras 3-6, se puede observar los Test "t" para muestras independientes realizados entre las diferentes poblaciones.



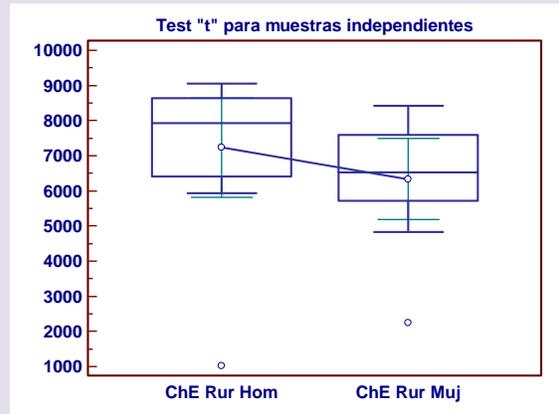
**Fig. 2. Test t para muestras independientes de actividad de ChE plasmática (U/L) entre Hombres zona urbana vs. Hombres zona rural.**



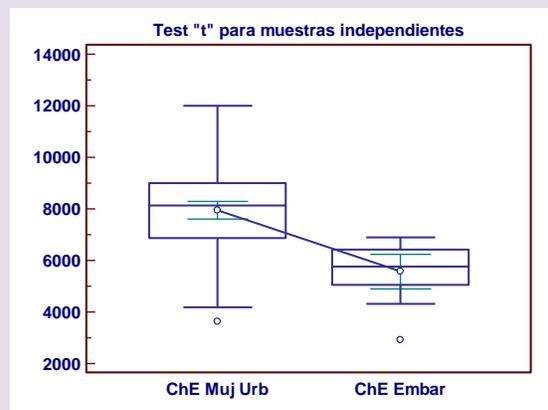
**Fig. 3. Test t para muestras independientes de actividad de ChE plasmática (U/L) entre Mujeres zona urbana vs. Mujeres zona rural.**



**Fig. 4. Test T para muestras independientes de actividad de Che plasmática (U/L) entre Hombres zona urbana vs. Mujeres zona urbana.**



**Fig. 5. Test t para muestras independientes de actividad de Che plasmática (U/L) entre Hombres zona rural y Mujeres zona rural.**



**Fig. 6. Test t para muestras independientes de actividad de Che plasmática (U/L) entre Mujeres zona urbana y población de embarazadas.**

La determinación de Intervalos de Referencia para la actividad de ChE plasmática se realizó en población urbana (Mujeres zona urbana y Hombres zona urbana) por contar con la cantidad de muestras suficientes.

Se procedió también a realizar los cálculos correspondientes para establecer la conveniencia de particionar las muestras por sexo. Las operaciones efectuadas

arrojaron un Z calculado de 5,3 frente a un Z crítico de 2,4. Al resultar Z calculado mayor a Z crítico se procedió a particionar las muestras por sexo. (14,11)

En tanto, el intervalo de referencia de actividad de ChE plasmática (95%) para Mujer zona Urbana fue 4613 a 11274 U/L y de 5956 a 12906 U/L para Hombres zona Urbana (Método basado en distribución normal).

El índice de individualidad biológica está dado por la relación entre la variabilidad biológica intraindividual e interindividual. Los valores son obtenidos de las tablas de Variabilidad Biológica. Para la ChE plasmática los datos son:

Individualidad biológica de ChE plasmática  $CV_i / CV_w = 0,34$ . (15).  
Esto lo convierte en un analito con marcada individualidad biológica.

En referencia al cálculo del cambio en el valor de referencia (RCV), para el mismo se utilizó la ecuación:

$$RCV = 2^{1/2} \times Z \times (CVA^2 + CVI^2)^{1/2}$$

siendo:

RCV cambio en el valor de referencia (usado como Delta Check).

CV A Coeficiente de variación analítico

CV I Coeficiente de variación intra individuo (de tablas de Variabilidad Biológica)

Z = 1,96 Cambio significativo (95%)

Z = 2,58 Cambio altamente significativo (99%).

Teniendo en cuenta un CV analítico de 0,7 % y un CV intraindividuo de 6,1 (para Variabilidad Biológica deseable) el cálculo arrojó el siguiente resultado:

**RCV = 17 % para un cambio significativo (95%).**

**RCV = 22,4 % para un cambio altamente significativo (99%). (13)**

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El análisis estadístico de los valores de actividad de ChE plasmática obtenidos arrojó diferencias según los grupos considerados. Si bien el tamaño de la

muestra (n) para cada grupo han sido diferentes, del análisis múltiple se observó una clara diferencia en los valores medios de ChE, dados por medias aritméticas o medianas. El grupo que arrojó los mayores valores fue el de Hombres urbanos, seguido por el de Mujeres urbanas, Hombres rurales, Mujeres rurales y Embarazadas, que por su estado fisiológico mostraron valores notablemente menores de actividad de ChE plasmática.

Se registraron diferencias significativas entre los siguientes grupos:

- a- Hombres urbanos vs. Mujeres urbanas presentando los varones una media aritmética y mediana por encima del valor de las mujeres.
- b- Hombres urbanos vs. Hombres rurales, presentando diferencias significativas entre las medias de ambos grupos arrojando valores de actividad de ChE plasmática en Hombres urbanos mayores a los de residencia rural.
- c- Mujeres urbanas vs. Mujeres rurales, presentando diferencias significativas entre las medias de ambos grupos y arrojando valores de actividad de ChE plasmática en Mujeres urbanas mayores a las de residencia rural.

Existen diferencias, pero no significativas entre Hombres rurales vs. Mujeres rurales

Como la actividad de ChE plasmática es un "marcador de efecto", los valores basales mostraron un grado de inhibición de los valores observados en zona rural respecto a los de zona urbana. Uno de los factores que se ha estudiado a lo largo de estos años es precisamente la inhibición por parte de los PICs (3).

Con respecto a la conveniencia del uso de intervalos de referencia debemos tener en cuenta que es necesario establecer intervalos de referencia que contemplen los sistemas analíticos usados en particular, así como también los diferentes grupos

poblacionales estudiados fijando valores o intervalos adecuados. En este caso en particular se fijaron intervalos de referencia respetando las guías recomendadas para tal efecto, verificando las condiciones analíticas utilizadas para la determinación de actividad de ChE plasmática.

Si bien la ChE plasmática es un analito con marcada individualidad biológica, es importante contar con límites referenciales que permitan observar alteraciones en aquellos casos en los que no disponemos de valores basales. (intoxicaciones agudas o colinesterasas de estructura atípica).

Resulta conveniente la utilización del RCV, utilizado en este caso como Delta Check. El cálculo del mismo permitió concluir que para nuestro sistema analítico, cambios en los valores basales de actividad de ChE plasmática del orden del 17 % son "significativos" para el paciente y a su vez, alteraciones en el orden del 22,4 % son cambios "altamente significativos".

De los resultados también se concluye que sería necesario y muy beneficioso conocer como dato epidemiológico los valores basales de la actividad de ChE plasmática para un eficaz seguimiento de la salud de la población.

#### **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba por darme la posibilidad de realizar mi Especialización en Química Clínica.

A la Dra. Lilian Canavoso por su capacidad, disposición y compromiso como Directora de la Carrera.

Al Dr. Ricardo Guglielmone por sus aportes y colaboración.

#### **BIBLIOGRAFIA**

(1) Sarabia Nuñez C., Negrón Bailarte L. Estudio Bioquímico-Clinico en personas ocupacionalmente expuestas a la acción de agroquímicos y efectos de su uso frecuente sobre la salud. Ciencia e investigación. (1998) Vol 1 N°1. 1-10.

(2) Pineda J. Plaguicidas. Monitoreo efectivo de la exposición a carbamatos y organofosforados. Cienc Trab. (2007) 9(26):178-181.

(3) Carmona Fonseca J., Henao S., Garcés R. Valores de referencia de actividad colinesterásica sanguínea en población laboral activa no expuesta a plaguicidas inhibidores de colinesterasa. Rev. Fac. Nac. Salud Pública. (2000) 18 (2): 55-72.

(4) Jimenez Diaz M, Schosinsky-Neveermann K. Valores de referencia de colinesterasa plasmática y eritrocitaria en población costarricense. Comparación del desempeño clínico de ambas enzimas. Edit Nacional de Seguridad Social. Rev Cienc Med 2000; 21 (3-4).

(5) Vidal Moreno C. Colinesterasas séricas. De partamento Interfacultativo de Bioquímica Ciencias-Medicina. Universidad de Murcia. Nogues. Platería. 1981- 39 (233-252).

(6) Ibarra Fernandez de la Vega E.J., Linares Fernandez T.M. La inhibición de la colinesterasa sanguínea como biomarcador de exposición a organofosforados y carbamatos. Una revisión crítica. Revista Cubana de Salud y Trabajo; (2012); 13 (3): 59-65.

(7) Guerra MB, Cargnel EG, Osta V, Osinde ME, Schkair JC. Determinación de valores de referencia de colinesterasa plasmática e intraeritrocitaria en niños de una población hospitalaria. Arch. Argent. Pediatr. (2005); 103(6):486-490.

(8) Fernandez López E., Regueiro Unzaga S.D., Pérez Giliberti J.D., Rojas González, C. Pseudocolinesterasas plasmáticas. A propósito de un caso. Mediciego (2012) 18 (N°Esp.)

(9) Carmona Fonseca J. Valores de referencia de colinesterasa plasmática con los métodos de Michel, EQM y Monotest en población laboral activa del departamento de

Antioquía, Colombia. Biomédica. (2003) 23: 437-55.

(10) Hofmann J.N., Keifer M.C, Checkoway H., De Roos , A.J.,Farin F.M., Fenske R.A. y col. Biomarkes of sensitivy and exposure in Washington State pesticide handlers. NIH Public Acces, Adv. Exp. Med. Biol. (2010) 660:19-27.

(11) NCCLS, C28-A2. How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline – Second Edition. Vol 20 N° 13

(12) NCCLS, EP15-A2. User Verification of Performance for Precision and Truessnes; Approved Guideline – Second Edition. Vol 25 N° 17.

(13) Hofmann J.N., Keifer M.C., de Roos A.J., Fenske R.A., Furlong C.E.,Van Belle G y col. Occupational determinants of serum cholinesterase inhibition among organophosphate-exposed agricultural pesticide handlers in Washington State. NHI Public acces, Occup. Envirom. Med. (2012) 67(6): 375-386.

(14) Graham J., Barker A. Reference Intervals. Clin Biochem Rev (2008) Vol 29 Suppl (i).

(15) Ceriotti Ferruccio. Prerequisites for use of common reference intervals. Clin Biochem Rev (2007) Vol 28.

(16) Araoud M., Neffeti F., Douki W., Ben Hfaied H., Akrouit M.,Najjar M.F. y col. Factors influencing plasma butyryl cholinesterase activity in agricultural workers. Ann. Biol. Clin. (2011) 69(2): 159-66.

(17) Khan D.A., Bhatti M.M., Khan F. A., Naqvi S. T., Karam A., Adverse effects of pesticides residues on biochemical markers in pakistani tobacco farmers. Int. J. Clin. Exp. Med. (2008) 1:274-282.

(18) López Guarnido O. Influencia de la exposición crónica a plaguicidas sobre

diversos marcadores bioquímicos (esterasas y enzimas antioxidantes) a trabajadores de invernaderos de la costa oriental de Andalucía. (Marzo de 2005).

(19) Varona M., Morales L.,Ortiz J.,Sánchez J.F.,Cárdenas O.,de la Hoz,F. Panorama epidemiológico de exposición a plaguicidas inhibidores de colinesterasa en 17 departamentos del país. Biomédica (1998); 18(1): 22-29.

(20) Sanchez Chávez G., Salceda R. Enzimas polifuncionales: el caso de la acetilcolinesterasa. (2008), REB 27(2): 44-51.

(21) Sand G., Nanni N., Pedreira G. Transferencia de intervalos de referencia biológicos en determinaciones de bioquímica clínica. Ciencia y Etica ALAC (2013) 1: 24-25.

(22) Callum Fraser. Biological Variation: from principles to practice (2001).

(23) Perez M.J., Olivera A.M., Ruiz O.M., Villar A.D., Giraldo E.C. Uso de la actividad colinesterásica para el diagnóstico de intoxicaciones por insecticidas organofosforados y carbamatos. Rev MVZ Córdoba (2012) 17 (2): 3053-3058.

(24) Jiménez Díaz M., Martínez-Mage V. Validación de la determinación decolinesterasa plasmática humana a 340 nm. Rev Biomed (2000); 1: 91-98

(25) Pineda Jorge. Plaguicidas. Monitoreo efectivo de la exposición a carbamatos y organofosforados. Ciencia & Trabajo. [www.cienciaytrabajo.cl](http://www.cienciaytrabajo.cl). Año 9.N° 26. Octubre/Diciembre (2007): 178-181.

(26) Díaz V, Pistilli N., Guillén R., Melgarejo M.V, Velazquez G. Valores hematológicos en individuos expuestos accidentalmente a insecticidas organofosforados. Mem Inst. Investig. Cienc. Salud. (2001/2002) Vol 1(1)

(27) Khan DA, Bhatti M. Adverse effects of pesticides residues on biochemical markers

in Pakistani tobacco farmers. *Int. Clin. Exp. Med.* (2008) 1: 274-282.

(28) Sarabia Núñez C., Bailarte L.N. Estudio bioquímico-clínico en personas ocupacionalmente expuestas a la acción de agroquímicos y efectos de su uso frecuente sobre la salud. *Ciencia e investigación*: (junio 1998).Vol 1 N°1.

(29) Fayssal M., Farahat Corie A Ellison. Biomarkers of chlorpyrifos and effects in Egyptian cotton field workers. *Enviromental Health Perpectives*, (june 2011). Vol 119 N°6: 801-806.

(30) Quandt, S.A., Chen H., Grzywacz J.G., Vallejos Q.M.,Galvan L., Arcury T.A. Cholinesterase depression and its association with pesticides exposure across the agricultural season among latino farm workers in north Carolina. *Enviromental Health Perspectives* (2010). Vol 118 N°5.

(31) Khaled A-H, Sinead O Mahony M. Relationship between age and plasma esterases. *Age and Ageing*. British Geriatrics Society (2001); 30:41-45.

(32) Sanchez Chavez G., Salceda R. Enzimas polifuncionales: el caso de la acetilcolinesterasa. (2008) *REB* 27(2): 44-51.

(33) Varona M., Morales L. Panorama epidemiológico de exposición a plaguicidas inhibidores de colinesterasa en 17 departamentos del país. *Biomedica* (1998) 18(1): 22-29

(34) Medina, J. R. Las colinesterasas del suero humano. Universidad de Murcia. *Nogues. Platería*, 39 (1978): 85-146.

(35) Hernandez AF, Gómez M.A. Effect of long-term exposure to pesticides on plasma esterases from plastic greenhouse workers. *J. Toxicol. Environment. Health. Part A.* (2004) 67:1095-1108.